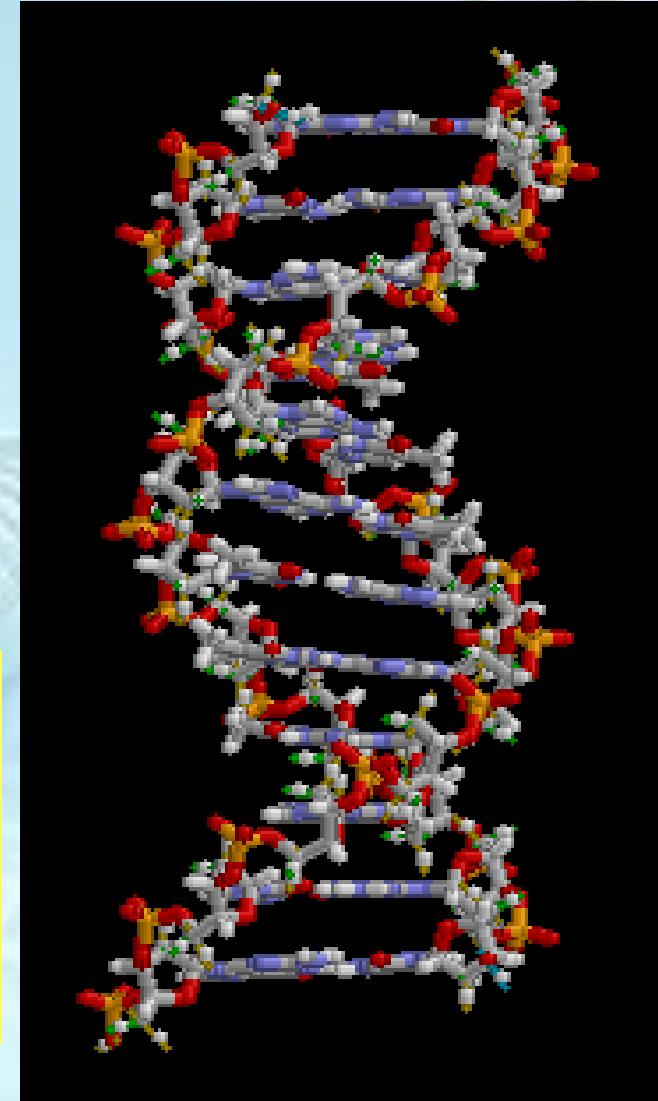




Межфакультетский курс лекций  
Химический факультет МГУ  
имени М.В. Ломоносова



**«Геном человека: страхи и надежды»**

# Генетическая дактилоскопия: установление родства, поиск преступников

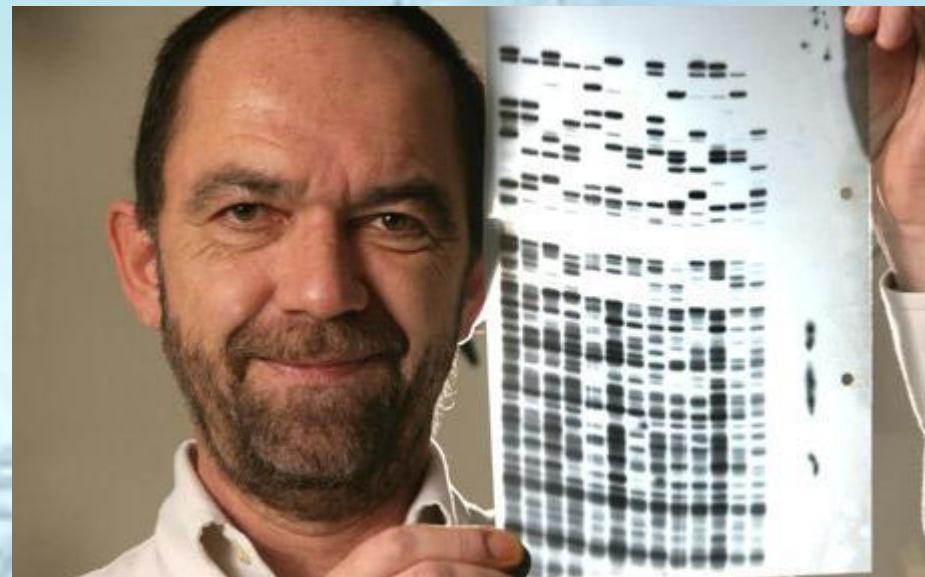
Готтих Марина Борисовна  
профессор кафедры химии природных соединений  
Химического факультета МГУ



## **Individual-specific 'fingerprints' of human DNA**

**A. J. Jeffreys, V. Wilson & S. L. Thein**

Simple tandem-repetitive regions of DNA which are dispersed in the human genome frequently show substantial length polymorphism arising from unequal exchanges which alter the number of short tandem repeats. A hybridization probe consisting of the core repeated in tandem can detect many highly polymorphic repeats simultaneously to provide a set of genetic markers of general use in human linkage analysis and to produce somatically stable DNA 'fingerprints' which are completely specific to an individual (or to his or her identical twin) and can be applied directly to problems of human identification, including parenthood testing.



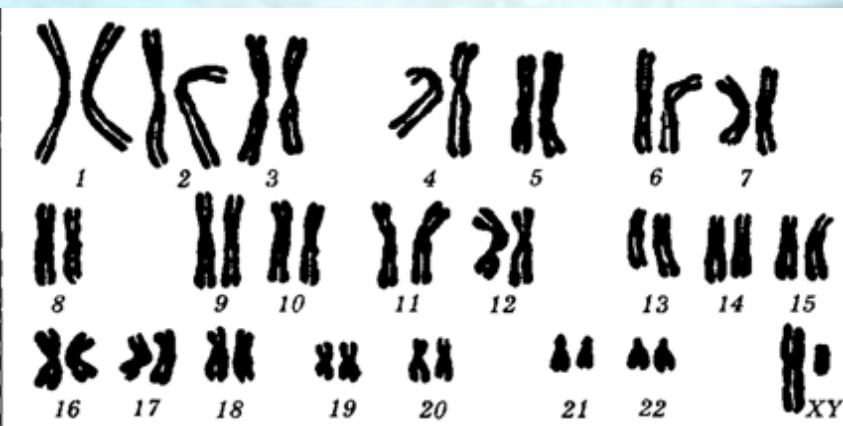
1. Почему геномы разных людей различаются?
2. В чем эти различия?
3. Как обнаружить различия геномов?

Геном человека – набор генов в гаплоидном наборе, распределен по 24 линейным молекулам ДНК, организованным в 22 аутосомы и 2 половые хромосомы.

В соматических клетках хромосомы присутствуют в 2-х экземплярах – 46 хромосом



Представленный в них набор генов тоже присутствует в 2-х экземплярах



**Генотип** – набор генов организма в диплоидном наборе

**Локусы** – одинаковые участки гомологичных хромосом

**Аллели** — различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых локусах и определяющие альтернативные варианты развития одного и того же признака.

**ДНК полиморфизм** [греч. *poly* — много, многое и *morphe* — вид, форма, образ] — существование в популяции двух или большего числа альтернативных форм (аллелей) определенного локуса хромосомы (гена), которые различаются нуклеотидной последовательностью или различным числом повторяющихся нуклеотидных последовательностей.

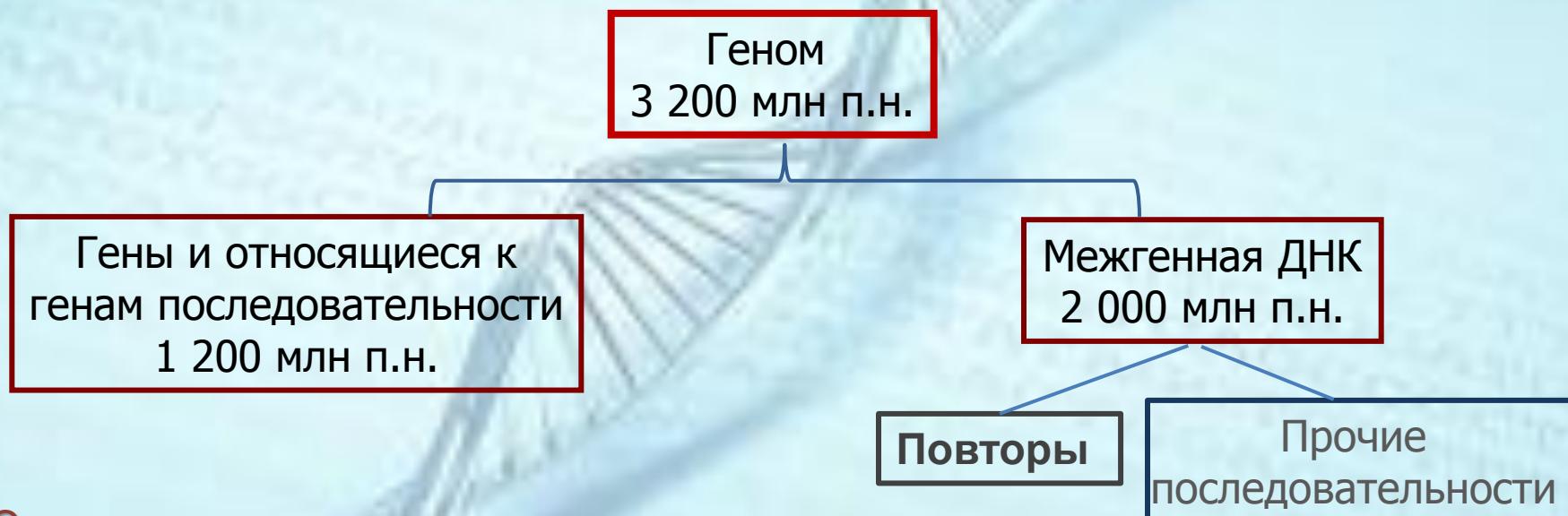
Половые хромосомы X и Y несут гомологичный ген, который находится в них в разных аллельных состояниях - ген в Y-хромосоме на 6 пар нуклеотидов длиннее, чем в X-хромосоме. Этот ген кодирует компонент зубной эмали амелогенин

# Геном – совокупность всей наследственной информации организма

Геномы двух человек  
(не родственников) идентичны на 99,9%



Разница в 0,01% составляет  
около 3 млн п.н.  
и делает каждого человека уникальным



Основные отличия геномов:

1. однонуклеотидные замены (95%)
2. число и состав повторяющихся последовательностей

# Однонуклеотидные замены Однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP)

Общее число SNP (однонуклеотидных полиморфизмов) в геноме человека составляет приблизительно 10 миллионов.

Полиморфизм нуклеотидных последовательностей ДНК возникает в результате мутаций единичных нуклеотидов (точечных мутаций) в определенных областях генома. Является результатом *замен* одного нуклеотида на другой (G на A) или *делеций* единичных нуклеотидов.

Однонуклеотидный полиморфизм встречается в пределах генов, в некодирующих участках или в участках между генами. Однонуклеотидные полиморфизмы кодирующих участков бывают двух типов: синонимические и несинонимические. Синонимические SNPs оставляют аминокислотную последовательность белка без изменения, тогда как несинонимические SNPs изменяют ее.

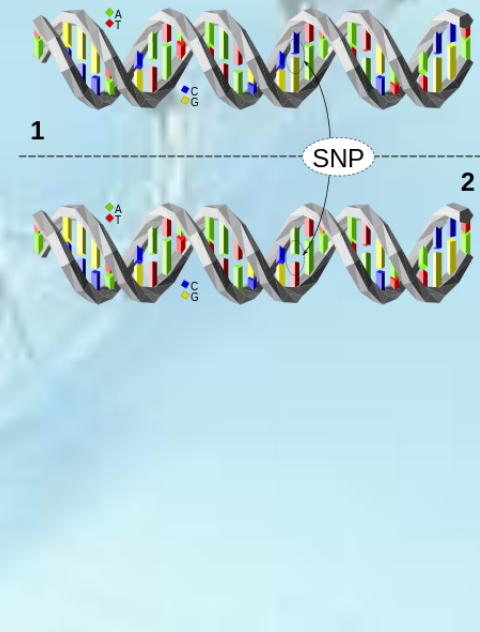
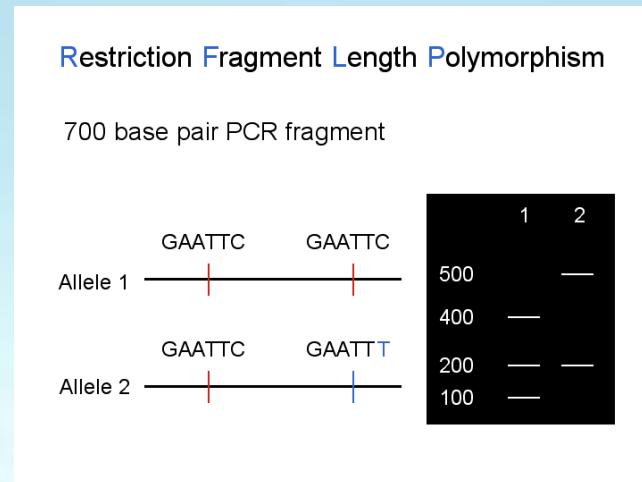
Несинонимические SNPs могут приводить к возникновению генетических заболеваний – **серповидноклеточная анемия**: пара **G-C** заменена на **A-T**

Однонуклеотидный полиморфизм, встречающийся в некодирующих участках гена, возможно, влияет на сплайсинг, деградацию мРНК, связывание транскрипционных факторов.

Замены в межгенных областях не проявляются фенотипически, но могут вызывать замены в сайтах узнавания эндонуклеаз рестрикции

# Однонуклеотидный полиморфизм

SNPs в сайтах узнавания эндонуклеаз рестрикции изменяют длину образующихся при расщеплении ДНК фрагментов - **Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов**

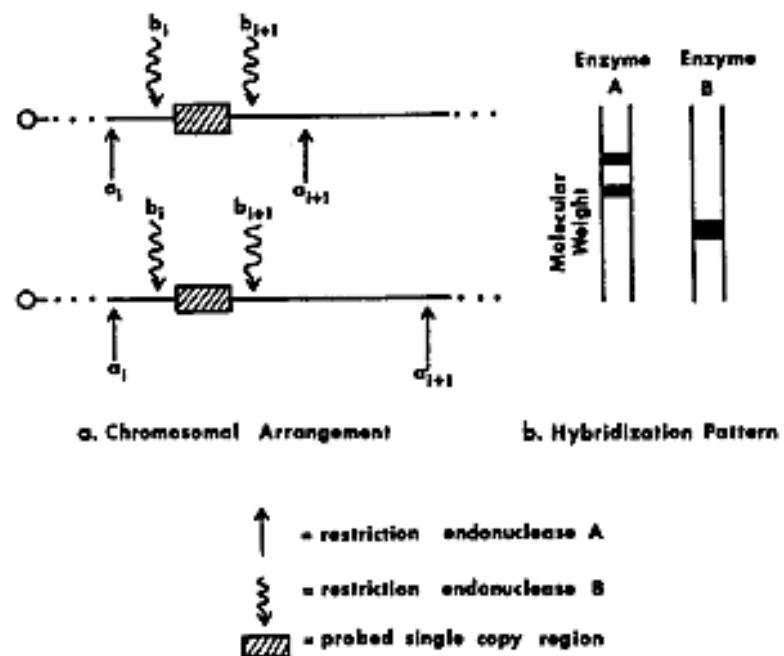


Использование однонуклеотидного полиморфизма для картирования генома

Am. J. Hum. Genet. 1980, 32(3): 314–331.

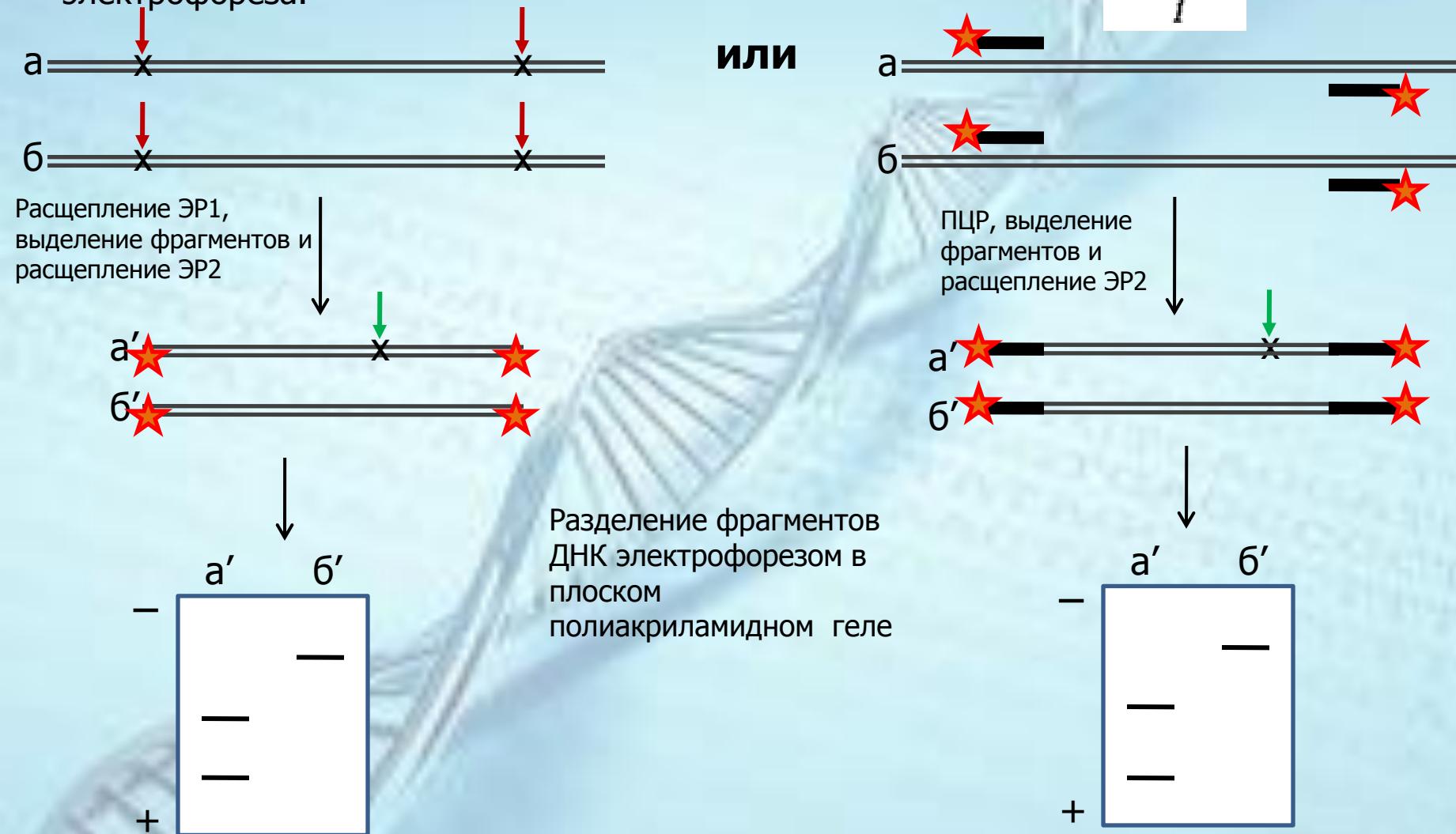
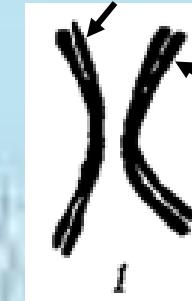
**Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.**

D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, R. W. Davis



# Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ, Restriction fragment length polymorphism, RFLP) —

способ исследования геномной ДНК, путем ее разрезания эндонуклеазами рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов путем гель-электрофореза.

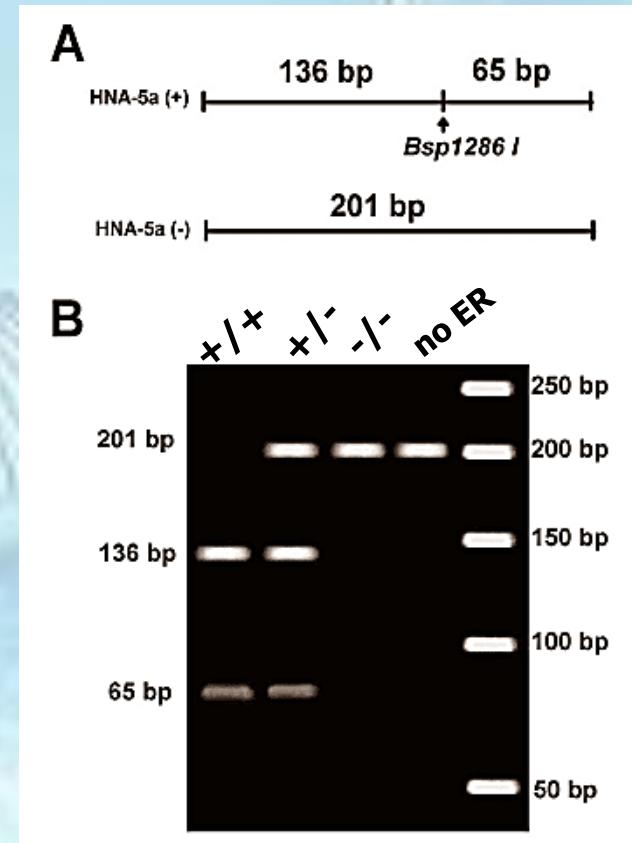


# Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Полиморфные сайты рестрикции образуют маркерные локусы на той хромосоме, где они присутствуют. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, локализации генов, ответственных за генетические заболевания, определения риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства

## Ограничение метода

Метод основан на появлении или исчезновении сайтов рестрикции в результате SNP, но ПДРФ локусов не так много, они расположены очень неравномерно и часто очень далеко друг от друга.



Обнаружены тысячи локусов для полиморфизма однонуклеотидных замен и КТП. На основании их анализа построены карты сцепления полиморфных участков в хромосомах.

# Различия геномов, обусловленные числом и составом повторяющихся последовательностей

Повторяющиеся последовательности занимают около 50% всей последовательности ДНК человека. Общее число повторов в геноме человека приблизительно 5 миллионов.

-ACA-TTT-ACA-TTTTTT-ACA-

-ACA-ACA-ACA-ACA-ACA-

ACGT-TGCA

## ОСНОВНЫЕ КЛАССЫ ПОВТОРОВ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА

### Диспергированные повторы



### Тандемные повторы



### Обращенные повторы



**Тандемные повторы** — последовательности повторяющихся фрагментов ДНК. В зависимости от размера подразделяются на три класса: сателлитная ДНК, минисателлиты и микросателлиты

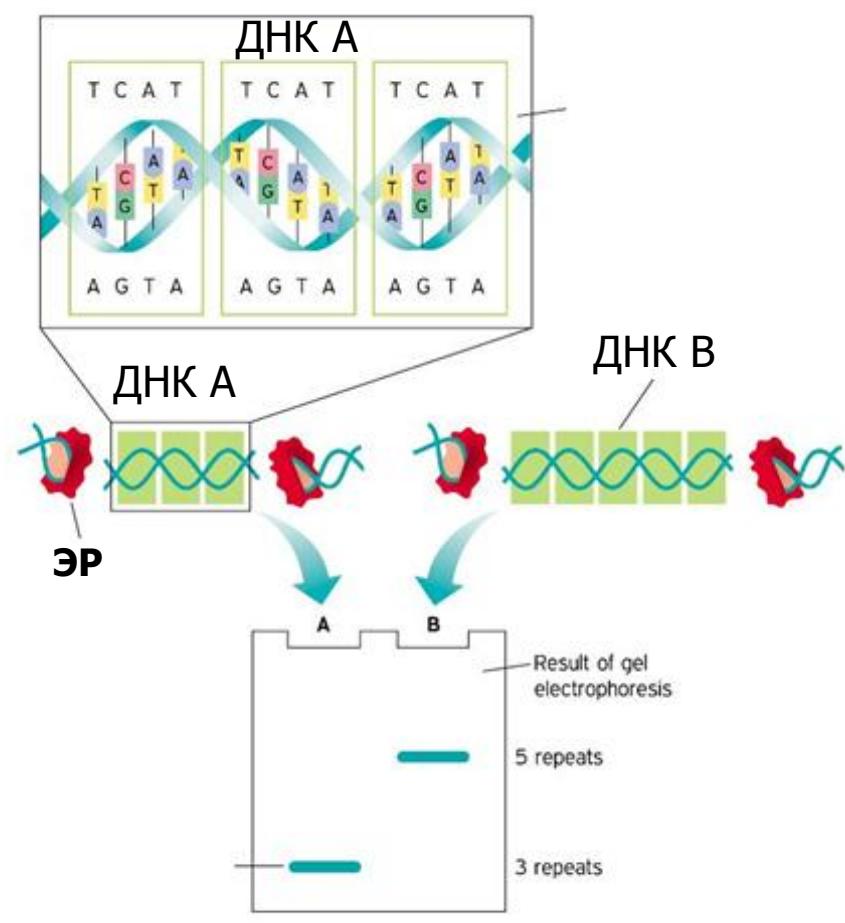
**Сателлитная ДНК** - повторяющаяся последовательность, как правило, составляет более 100 пар оснований.

**Минисателлиты** - от 7 до 100 пар оснований. Встречаются более чем в 1000 местах генома человека, но в основном в районе теломер и центросомы. Один из видов минисателлитов — гипервариабельные минисателлиты (*variable number of tandem repeats*), расположены в некодирующих регионах ДНК.

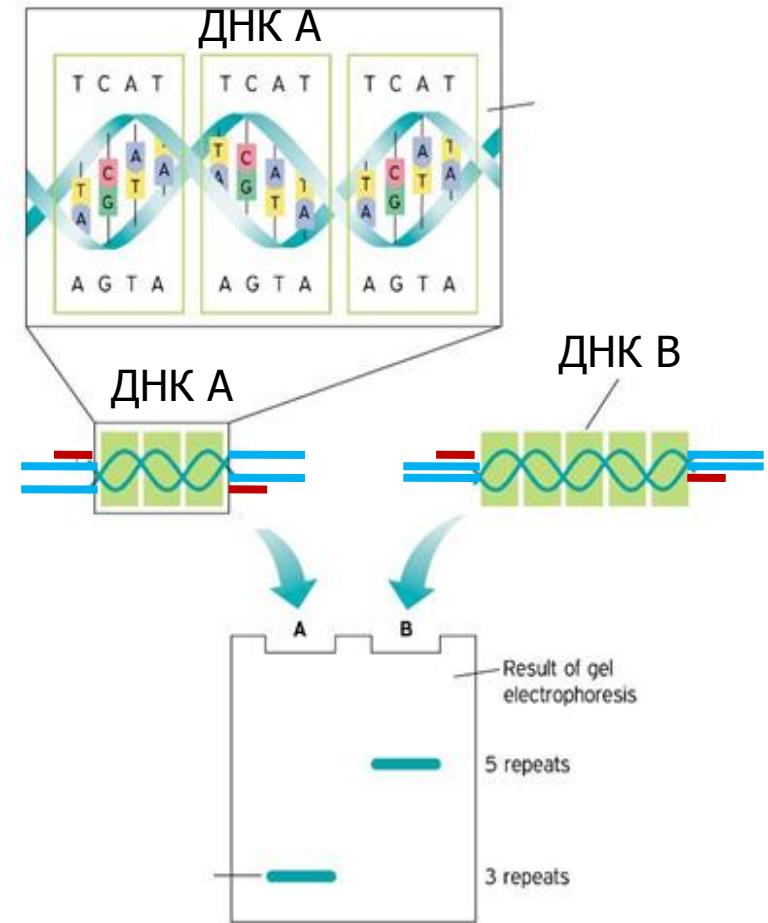
**Микросателлиты** (или простые короткие tandemные повторы - КТП) — от 1 до 6 пар оснований, образующие последовательности менее 1 тысячи пар оснований. Локализованы в эухроматиновой части генома. Увеличение числа повторяющихся элементов микросателлитов, локализованных в экзонах либо в нетранслируемых или регуляторных участков генов может быть причиной развития некоторых заболеваний. Микросателлиты характеризуются высокой скоростью изменения последовательностей, обусловленной «проскальзыванием» при репликации ДНК и точечными мутациями.

# Анализ полиморфизма длин коротких tandemных повторов

## Расщепление ЭР



## ПЦР-анализ

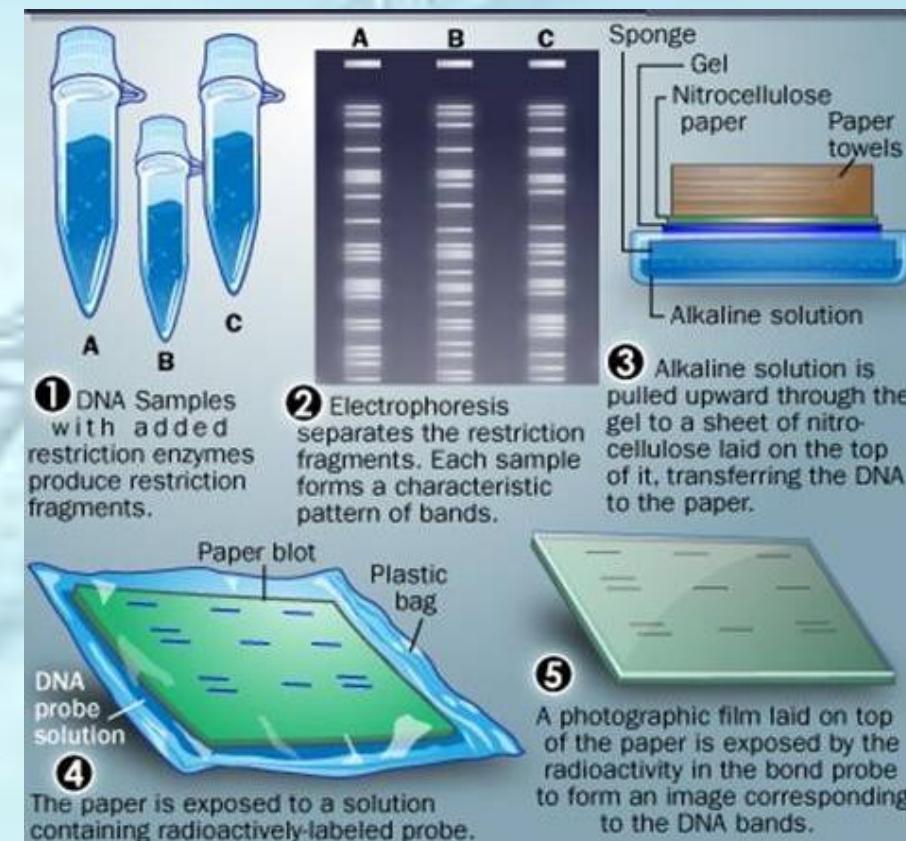


# ДНК-фингерпринтирование (DNA fingerprinting, DNA fingerprint technique)

[англ. *finger* — палец и *print* — печать, оттиск, отпечаток] — метод создания генетических «отпечатков пальцев», основанный на анализе полиморфизма ДНК.

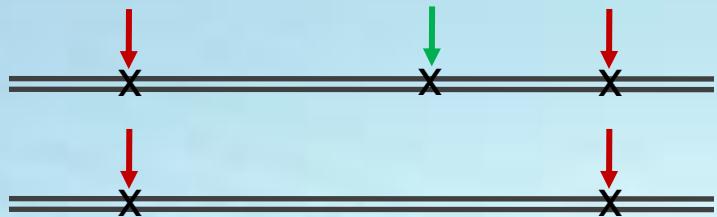
Геномная ДНК расщепляется эндонуклеазами рестрикции, затем образующиеся фрагменты разделяются при помощи электрофореза в геле и переносятся на нитроцеллюлозные фильтры. После этого фильтры гибридизуют со специфическими меченными ДНК-зондами. Зонды гибридизуются с комплементарными последовательностями ДНК, возникают полиморфные полосы гибридизации, спектр которых специфичен для каждого индивидуума, поэтому метод может быть использован для генетической идентификации разных индивидуумов одного вида.

ДНК-ф. применяется при картировании генов, определении родства, в криминалистике.



# Принцип ДНК-фингерпринтирования

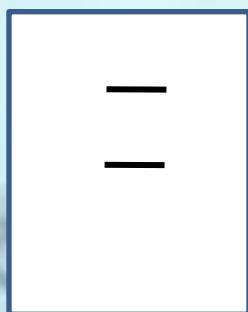
Расщепление ЭР1,  
выделение фрагментов и  
расщепление ЭР2



Электрофорез,  
перенос на  
мембрану



Гибридизация с зондом

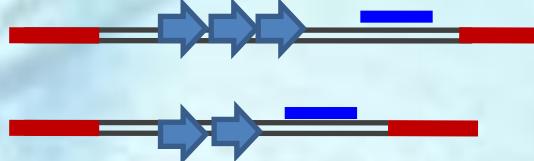


Наличие двух полос  
указывает на гетерозиготный  
по данному аллелю  
организм, т.е. в двух  
гомологичных хромосомах  
локусы различаются по числу  
повторов или характеру  
сайтов рестрикции

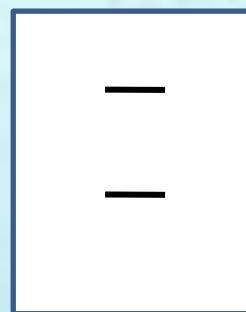
ПЦР с праймерами, комплементарными  
уникальным последовательностям генома по  
обе стороны от области повторов



Электрофорез и  
перенос на мембрану



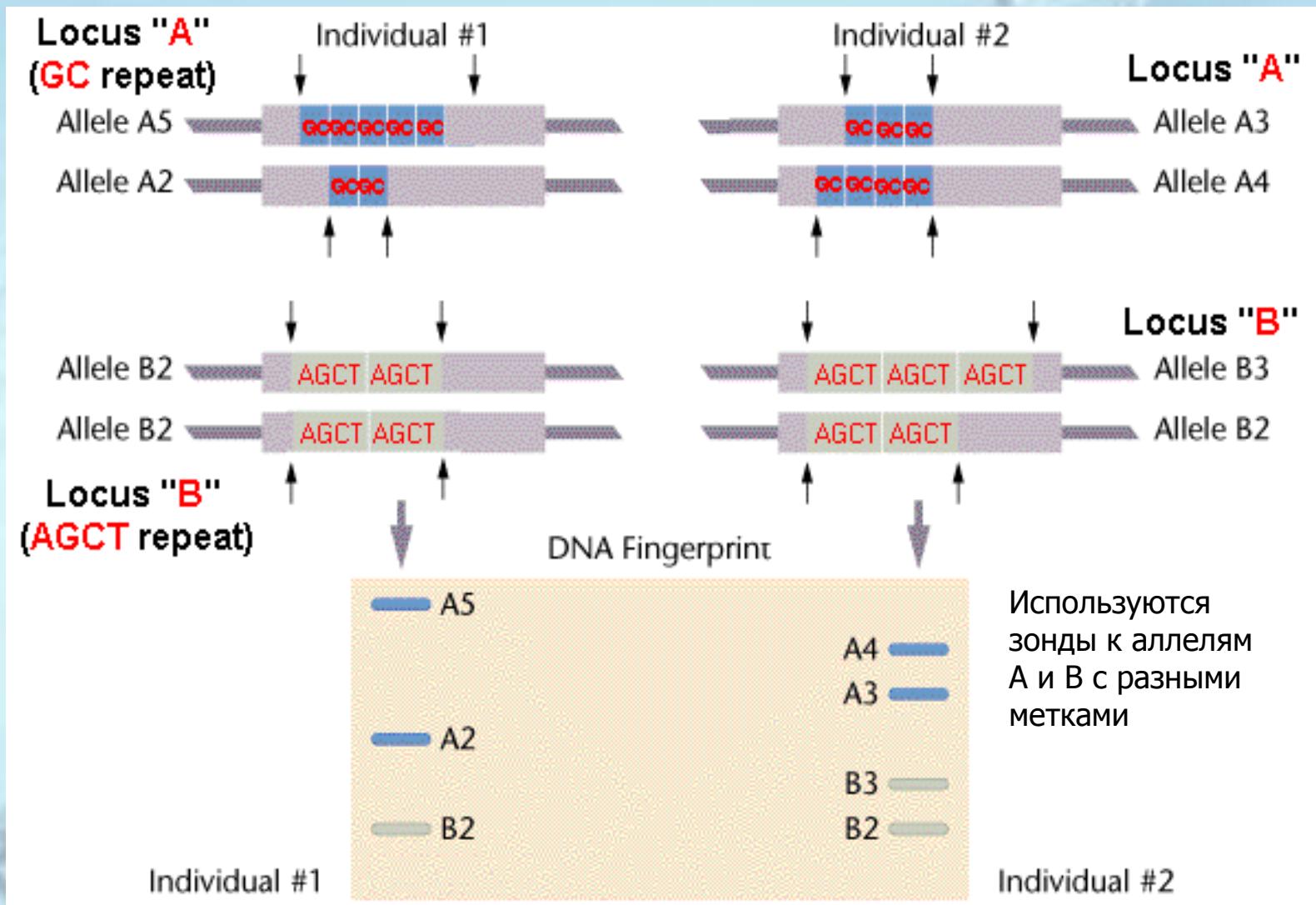
Гибридизация с зондом



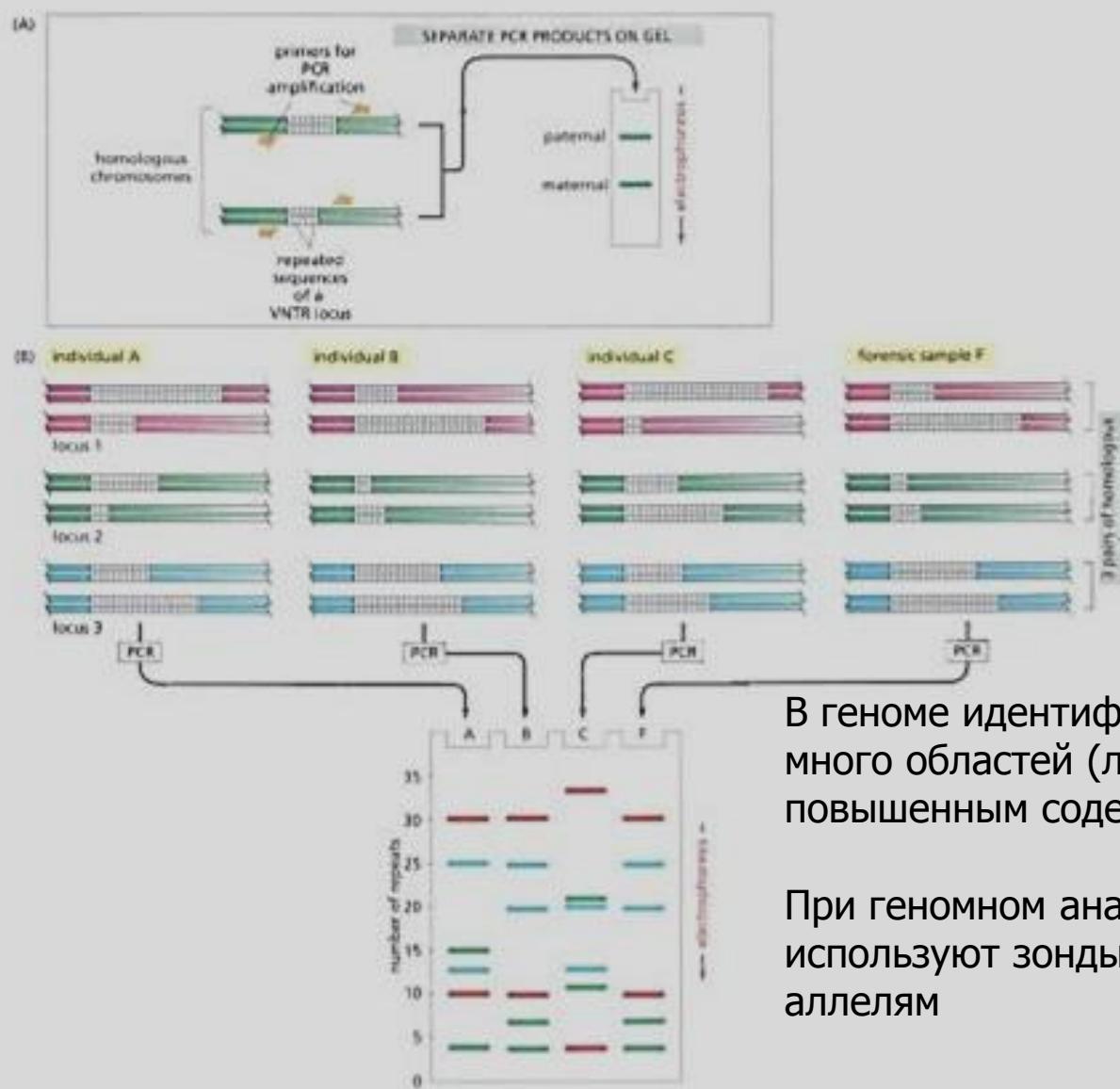
Зонды делаются на  
уникальные  
последовательности  
генома,  
расположенные  
рядом с повторами

# Принцип ДНК-фингерпринтирования или ДНК-дактилоскопии

## **с помощью эндонуклеазного расщепления**



# Принцип ДНК-дактилоскопии с помощью ПЦР

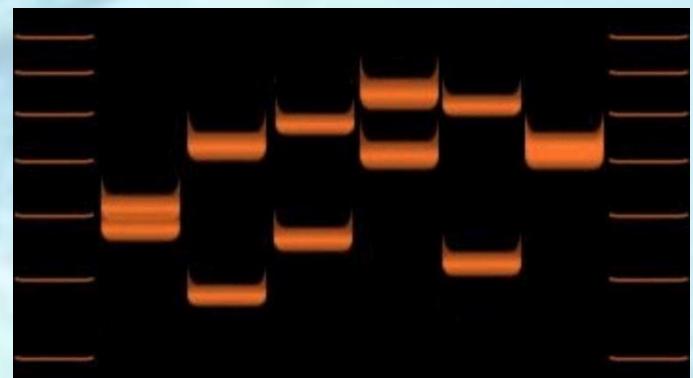


# Принцип ДНК-фингерпринтирования

В хромосомах человека идентифицировано множество локусов для разных КТП. В США было выделено 13 локусов коротких tandemных повторов в качестве основы для построения генетического профиля человека.

В России 3 декабря 2008 года Госдума приняла Федеральный закон «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации». По этому закону создана федеральная база данных ДНК, содержащая информацию об осуждённых за тяжкие и особо тяжкие преступления, за преступления против половой неприкосновенности, а также о неопознанных трупах и о биологических следах, изъятых с мест совершения преступлений. Оператором базы данных является МВД России.

Вариации одного tandemного повтора длин аллелей шести индивидуумов

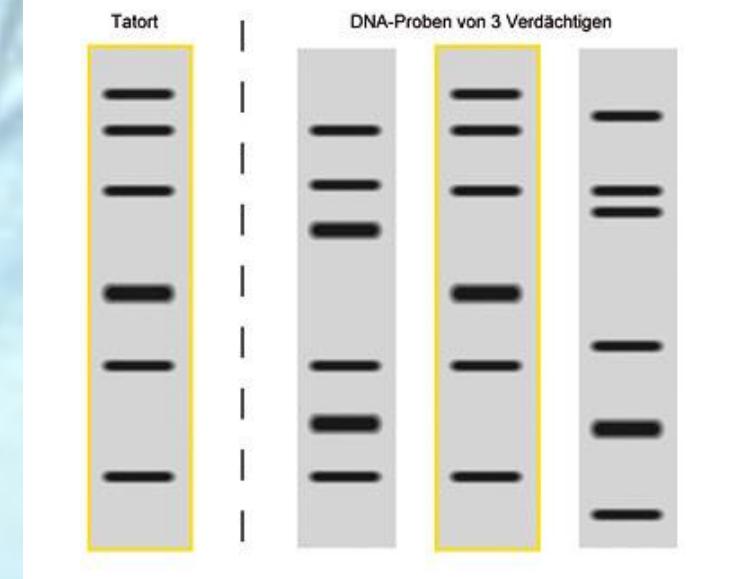


# Использование ДНК-фингерпринтирования в криминалистике

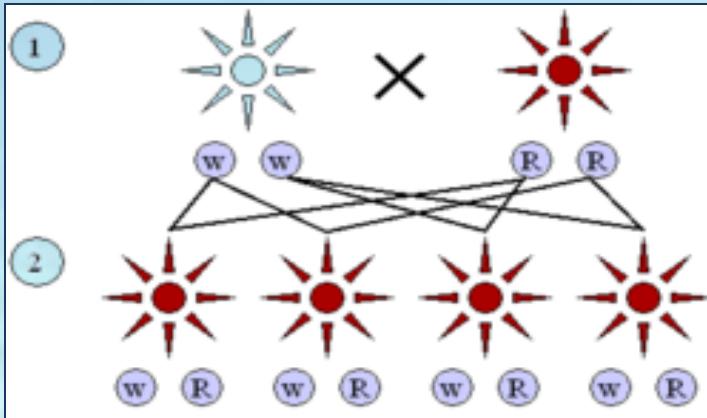
Летом 1986 года в зарослях близ деревни Нарборо было найдено тело 15-летней девочки. Ее изнасиловали и задушили. Расследование привело полицию к санитару Ричарду Бакленду, который признался в преступлении. Однако Бакленд отказывался признаться в весьма похожем изнасиловании и убийстве юной девушки в Нарборо, которое случилось тремя годами раньше. Решив раскрыть и это преступление, полиция обратилась к Алеку Джейфрису с просьбой помочь ей опознать в Бакленде убийцу первой жертвы? Получив образцы спермы из обоих тел и немного крови Бакленда, Джейфрис взялся за работу. ДНК из разных образцов спермы, размноженная при помощи полимеразной цепной реакции, оказалась одинаковой, но когда Джейфрис приступил к анализу ДНК крови, он пришел к выводу, что имеет дело с генетическим материалом другого человека. Выходило, что Бакленд никакой не убийца. Полиция отнеслась к результатам с недоверием и отправила образцы в криминалистическую лабораторию Министерства внутренних дел, где к тому времени уже освоили метод Джейфриса. Выводы были теми же, и Бакленда с неохотой выпустили на свободу. Несколько месяцев спустя у жителей Нарборо стали отбирать образцы крови. Из 5500 образцов ДНК ни один не совпадал с ДНК убийцы. Но однажды работник пекарни в Лейчестере донес: его коллега попросил другого работника сдать кровь вместо него. Полиция заинтересовалась этим и арестовала Колина Питчфорка, жителя Нарборо, который признался в обоих убийствах. На сей раз все образцы ДНК совпадали.

У кого из подозреваемых полоски в образце крови совпадут с образцом крови, оставленным на месте преступления - тот и преступник. Или, по крайней мере, тот, кто был на месте преступления

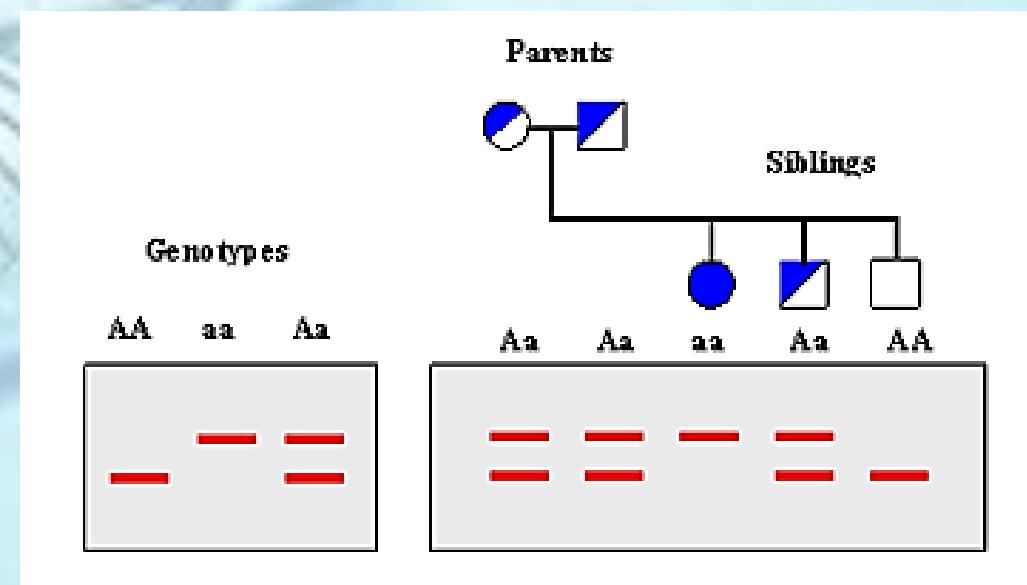
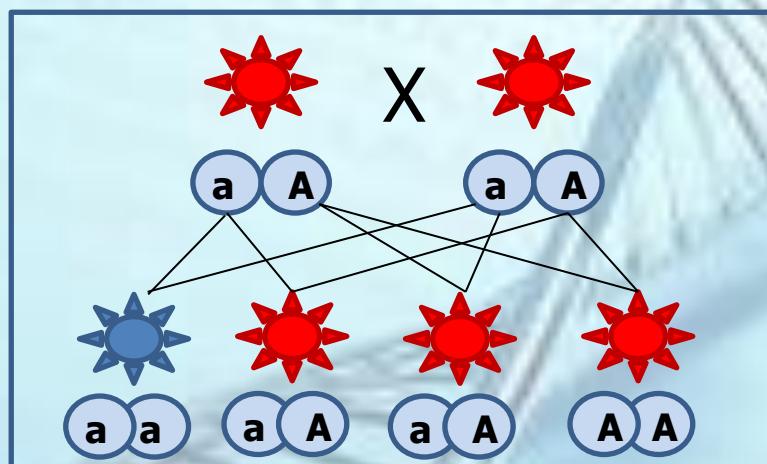
ДНК убийцы      ДНК 3-х подозреваемых



# Использование ДНК-фингерпринтирования для установления родства

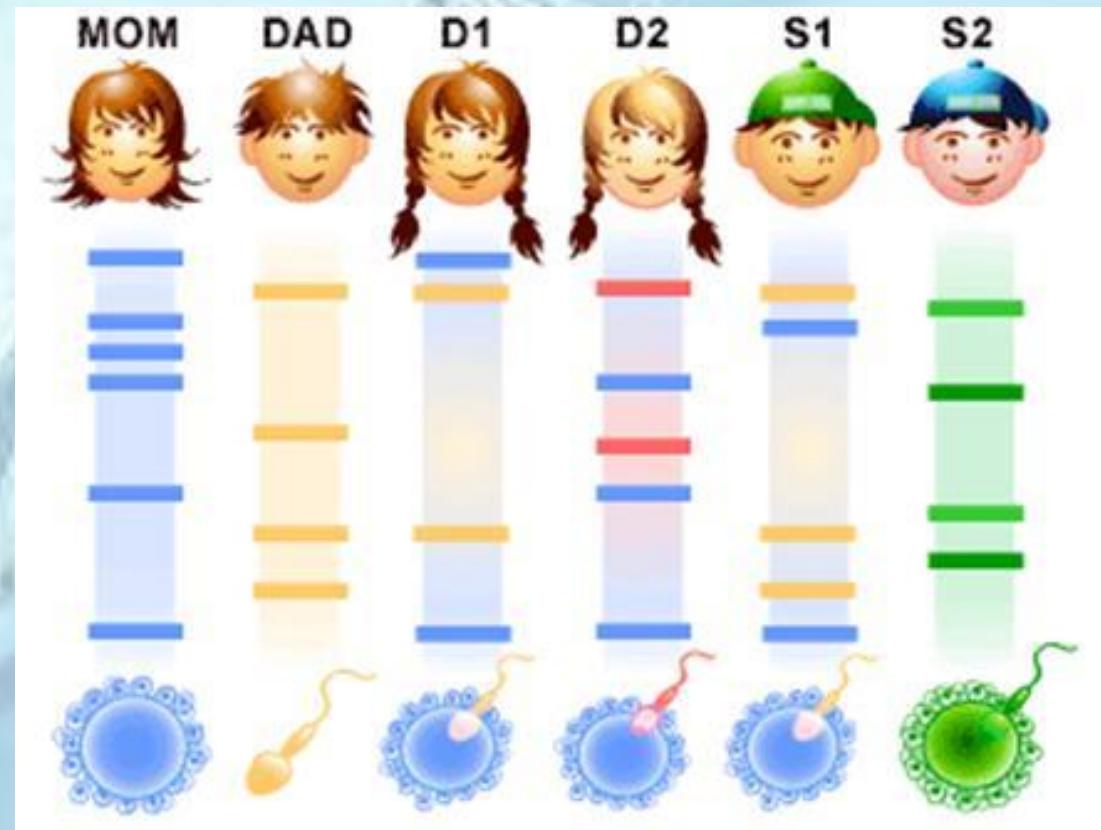


**Законы Менделя —**  
это принципы передачи наследственных признаков, а также полиморфных маркеров от родительских организмов к их потомкам



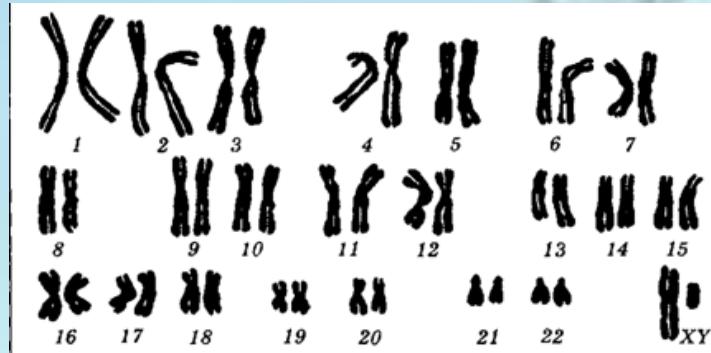
# Использование ДНК-дактилоскопии для установления родства

При ДНК-дактилоскопии проводят анализ по нескольким повторам. Одни и те же КТП могут быть расположены в нескольких локусах, поэтому при анализе одного типа КТП образуются не две полосы, а несколько.



Кто из детей чей ребенок?

# Явление кроссинговера и связанные с ним проблемы в установлении родства



## Сравнение двух способов деления клеток

### МИТОЗ



### репликация ДНК

### МЕЙОЗ

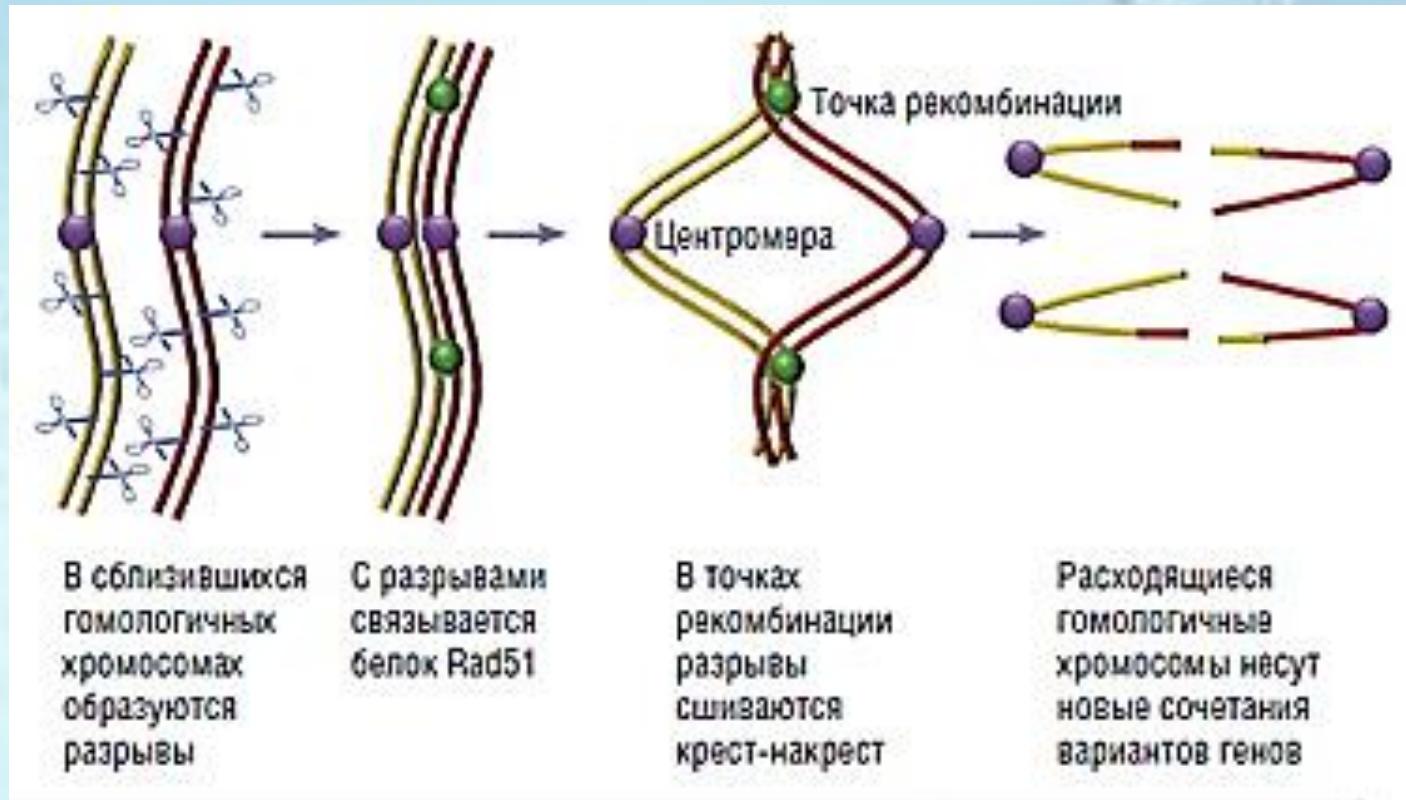


### Деление клетки

Дочерние клетки (2n)

Мейоз - вид деления клеток, в результате которого образуются гаметы - половые клетки с гаплоидным набором хромосом. Слияние гаплоидных клеток при оплодотворении восстанавливает в зиготе диплоидный набор хромосом.

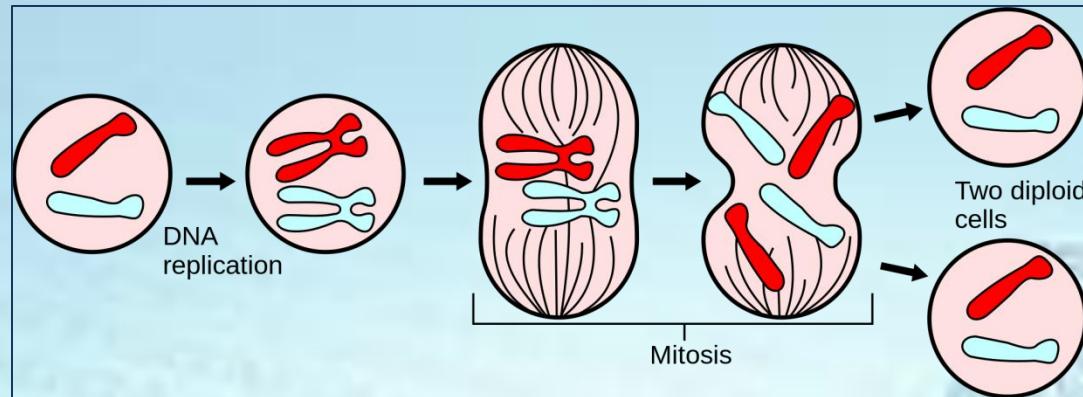
Перед первым делением клетки в мейозе происходит удвоение ДНК. Затем начинается спирализация хромосом и хромосомы каждой гомологичной пары соединяются друг с другом по всей длине и переплетаются. Этот процесс называется конъюгацией. Во время конъюгации может происходить обмен участками генов гомологичных хромосом (**кроссинговер**)



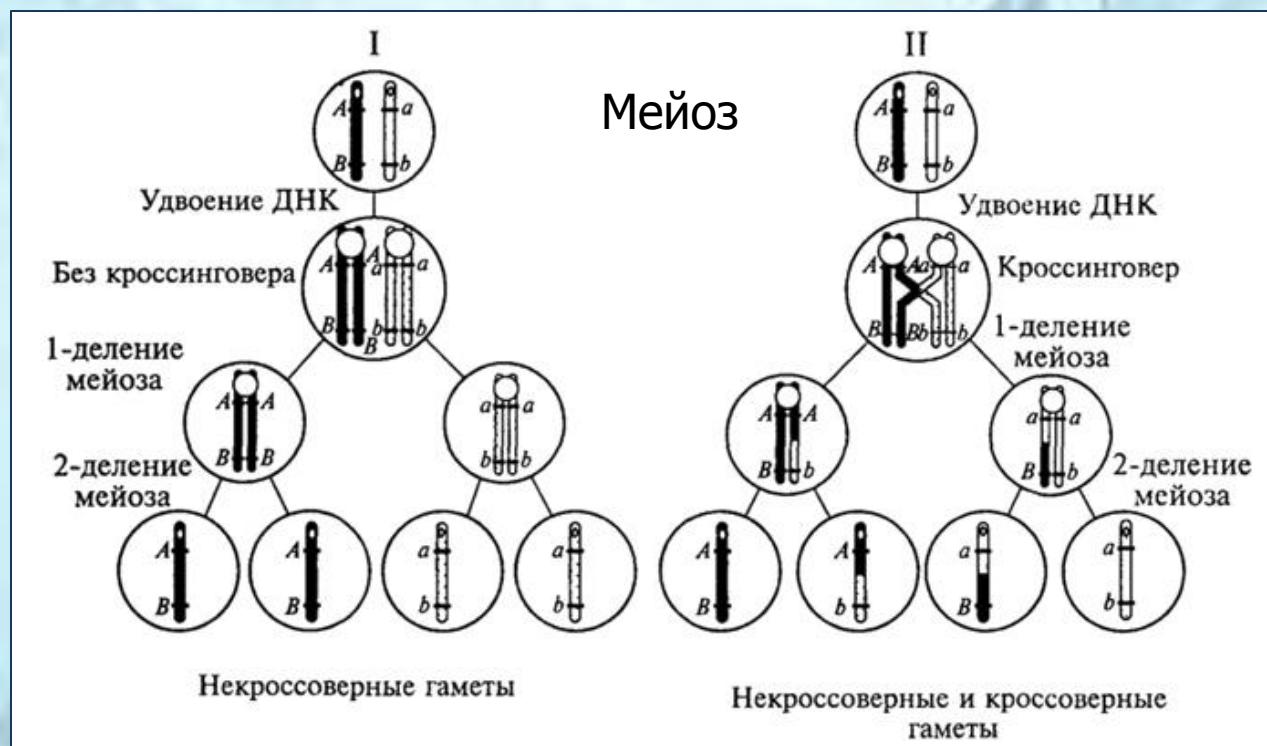
Кроссинговер или **рекомбинация** генов, осуществляемая в мейозе, приводит к внутривидовой изменчивости

Рекордсменами по частоте кроссинговера считаются кошки

Гены, расположенные на одной хромосоме, при митозе передаются дочерней клетке сцепленно. Кроссинговер нарушает сцепление генов.

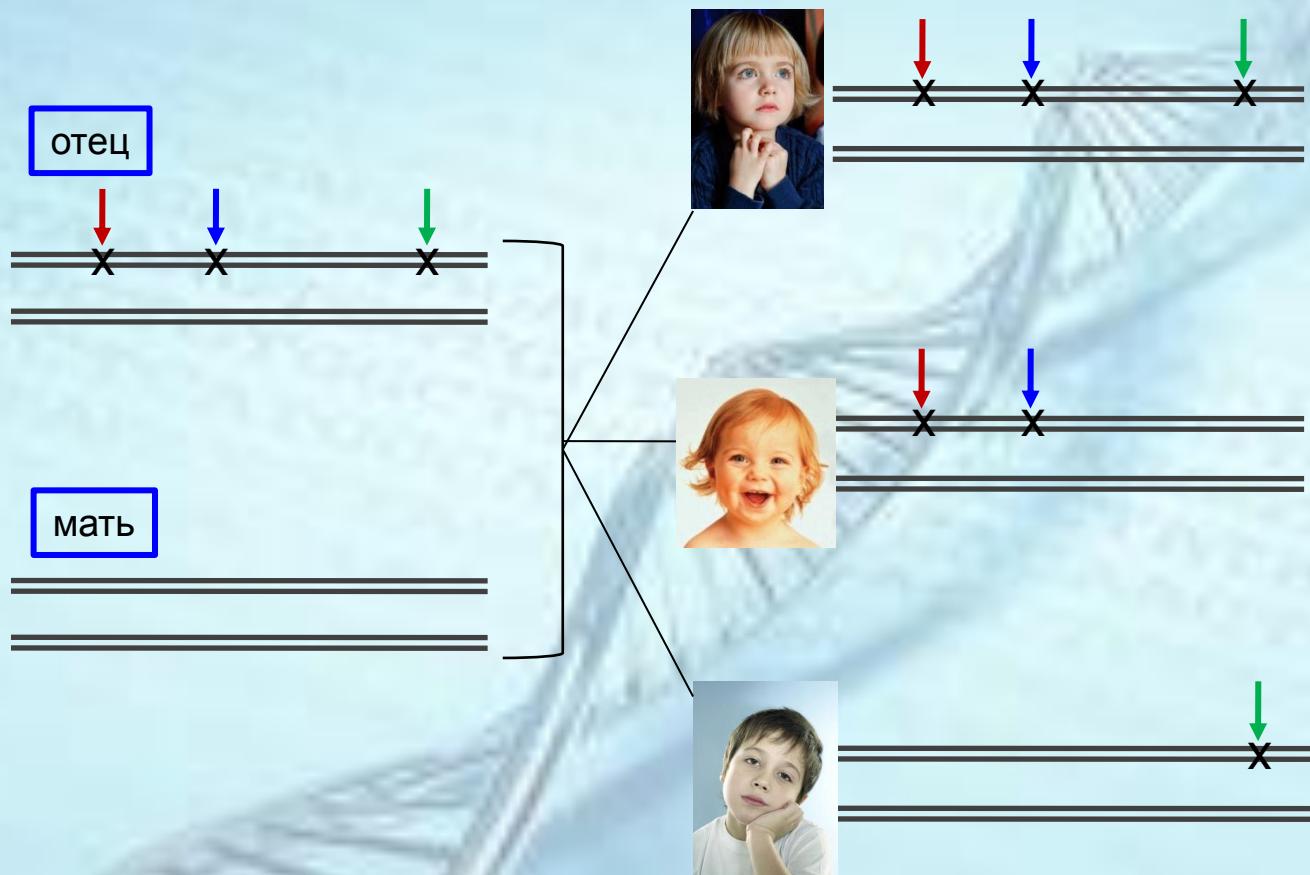


В результате рекомбинации может нарушаться картина распределения повторов в составе гомологичных хромосом

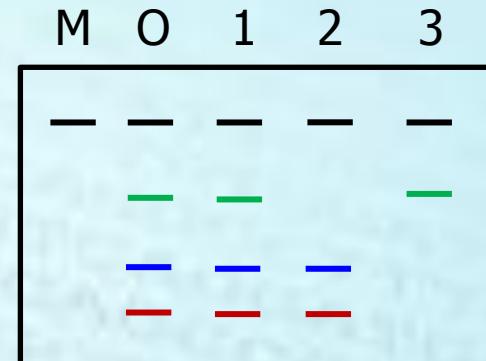


# Выявление рекомбинации при изучении наследования нескольких ПДРФ-локусов

Гетерозиготен по всем локусам,  
Мать гомозиготна



В исследовании определяются 3 локуса, расположенные на одной хромосоме



При анализе родства исследуются несколько локусов на нескольких хромосомах

# Митохондриальный анализ -

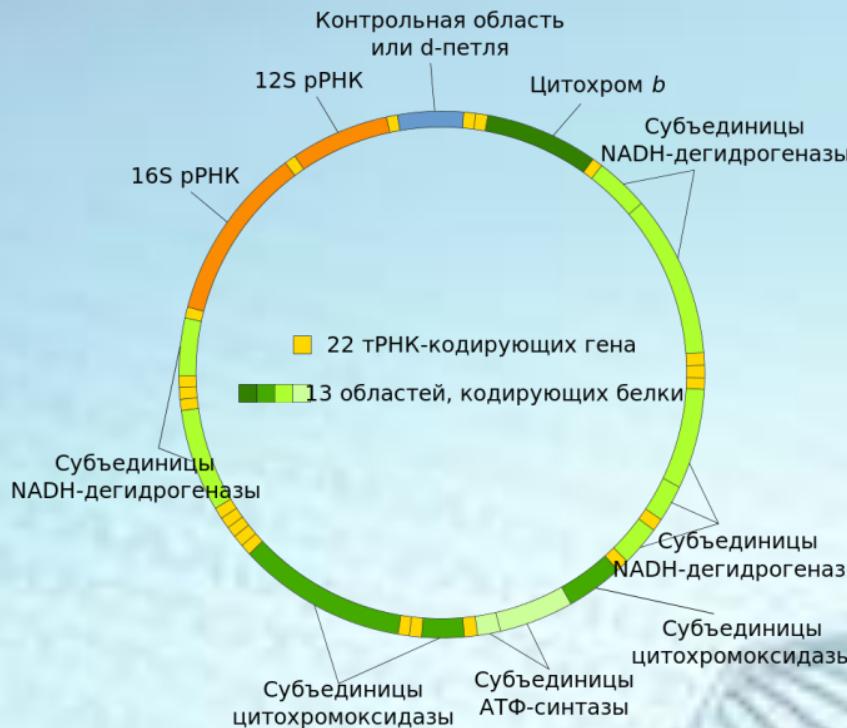
Для сильно деградированных био-образцов иногда бывает невозможно получить полную информацию о коротких tandemных повторах. В таких ситуациях анализируется митохондриальная ДНК (мтДНК)

Сперматозоид передает яйцеклетке  
только свою ядерную ДНК



Ядерная ДНК передается человеку и от отца, и от матери, а митохондриальная только от матери. Митохондриальный анализ является полезным дополнением в определении чёткой идентификации в таких случаях, как поиск пропавших без вести лиц, когда имеются только родственники, связанные по материнской линии.

# Митохондриальная ДНК человека



У человека митохондриальная ДНК обычно присутствует в количестве 100—10000 копий на клетку, тогда как хромосомной ДНК не более 2 копий. Мутации в ДНК митохондрий могут вызывать передаваемые по материнской линии наследственные заболевания.

Митохондриальная ДНК не подвергается рекомбинации, изменения в ней могут происходить исключительно посредством случайных мутаций. Путём сравнения последовательности митохондриальной ДНК и возникших в ней со временем мутаций можно не только определить степень родства ныне живущих людей, но и приблизительно вычислить время, необходимое для накопления мутаций в той или иной популяции людей. Таким образом можно также изучать эволюционное родство живых организмов. Для этого определяют последовательности митохондриальной ДНК у разных видов и сравнивают их при помощи специальных компьютерных программ и получают эволюционное древо для изученных видов. Исследование митохондриальных ДНК собак позволило проследить происхождение собак от диких волков.

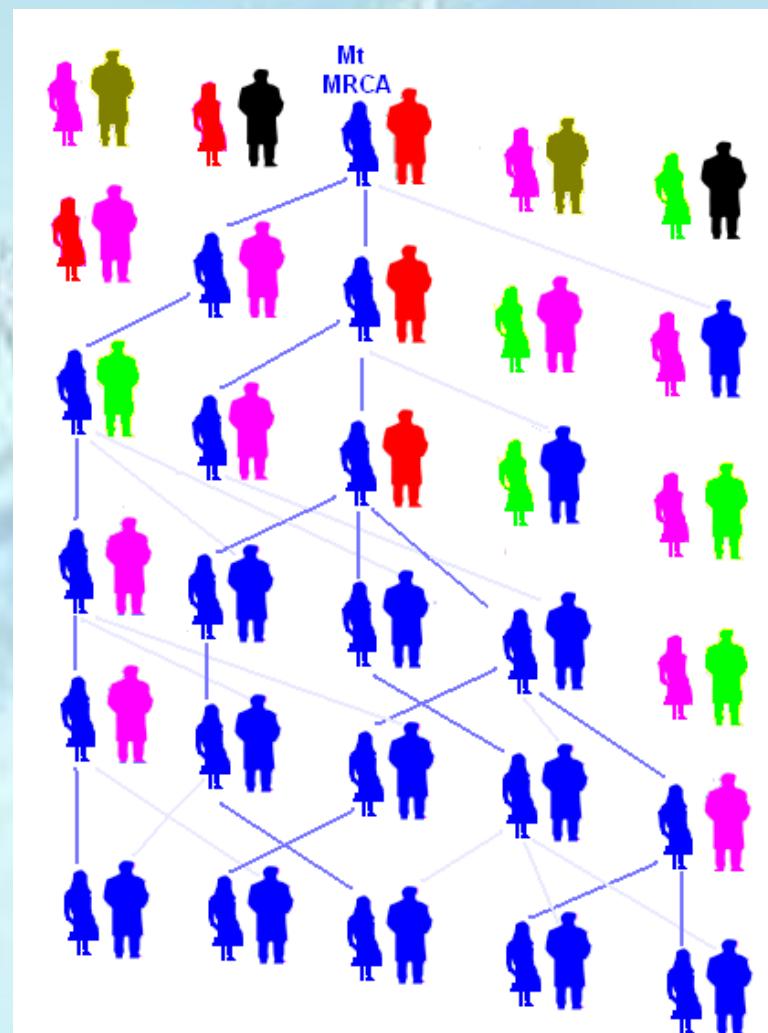
Исследование митохондриальной ДНК в популяциях человека позволило вычислить «митохондриальную Еву», гипотетическую праородительницу всех живущих в настоящее время людей.

В 1987 году Ребекка Канн с коллегами предположили, что митохондриальная Ева могла жить между 140 тыс. и 280 тыс. лет назад в Восточной Африке. Современные оценки дают диапазон возраста Евы 140 тыс. — 230 тыс. лет с максимумом вероятности на значениях порядка 180—200 тыс. лет.

Речь идёт об относительно однородной генетической популяции, среди потомков которой большинство ныне живущих людей получили митохондриальную ДНК от одной женщины, в то время как потомки других женщин по прямой женской линии той же предковой популяции не дожили до наших дней.

Если у женщины нет ни одной дочери, то её митохондриальная ДНК не будет передана потомкам далее её собственного сына, хотя половину генов из хромосомной ДНК унаследуют и сыновья, и их потомство

## Передача мтДНК от одной женщины ее потомкам

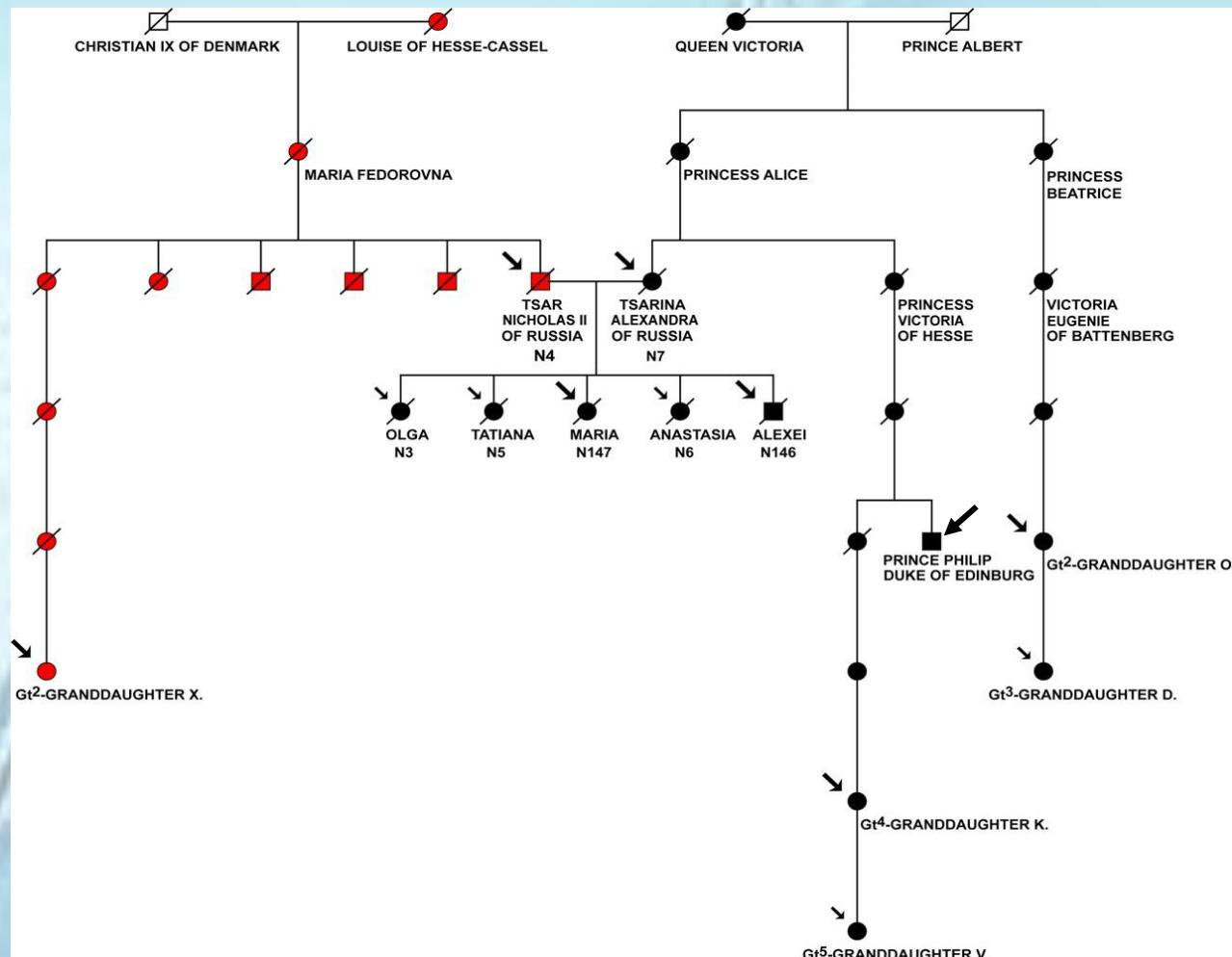


# Идентификация останков царской семьи

Evgeny I. Rogaev, Anastasia P. Grigorenko, Yuri K. Moliaka, Gulnaz Faskhutdinova, Andrey Goltsov, Arlene Lahti, Curtis Hildebrandt, Ellen L. W. Kittler and Irina Morozova  
Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family.  
Proc Natl Acad Sci U S A. — 2009. — № 106(13). — C. 5258-5263

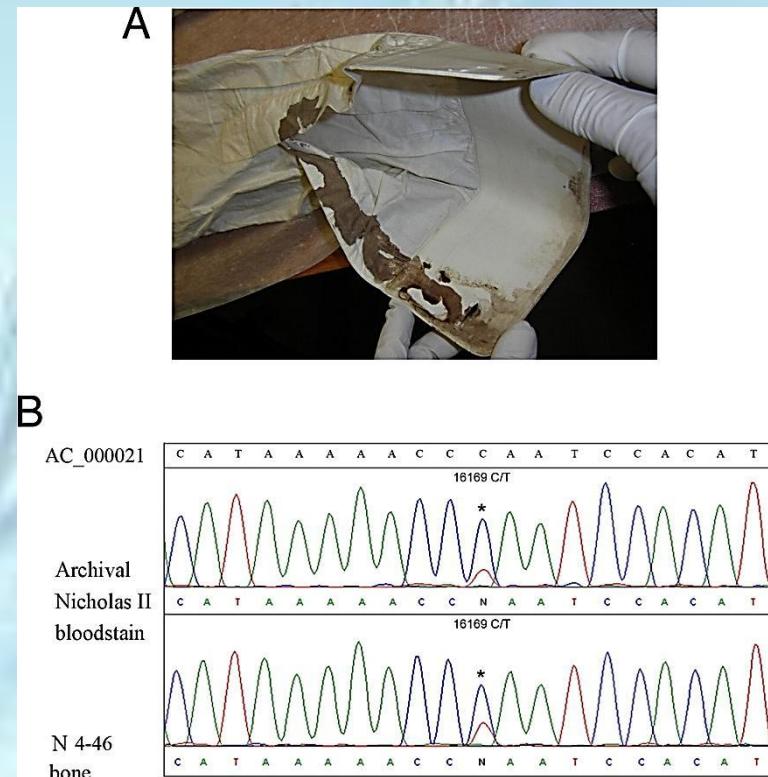
## Установление родства с помощью мтДНК

Митохондриальная ДНК может быть получена из таких биоматериалов, как волосы (с корнем), старые кости или зубы



# Идентификация останков царской семьи

При расшифровке ДНК Николая II экспертов ожидал неожиданный сюрприз — последовательность царского генома содержит новые мутации в определенной позиции мтДНК, при которой данное состояние называется гетероплазмией — наличием более чем одного митохондриального типа в клетках организма, то есть наличием нормальных и мутантных мтДНК у одного отдельного лица. Останки брата царя — Георгия Романова (ум. в 1899), которые также были эксгумированы при исследовании, помогли определить идентичность, в том числе и в гетероплазмии.

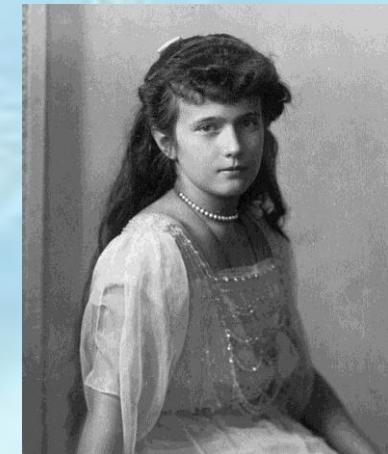


Анализ мтДНК, взятой из образцов крови Николая II и остатка скелета. (А) Рубашка Николая II со следами его крови. (В) Сравнение нуклеотидной последовательности образцов крови и кости. Гетероплазмия была обнаружена в обоих образцах

# Установление родства с помощью мтДНК



Анализ мтДНК был использован в установлении того факта, что одна из наиболее известных в мире самозванок **Анна Андерсон** на самом деле не являлась великой русской княжной Анастасией Николаевной Романовой, за которую она себя выдавала.



Сравнение митохондриальной ДНК останков царской семьи с образцами, взятыми у принца Филиппа, герцога Эдинбургского, чья бабушка по матери принцесса Виктория Гессен-Дармштадтская была сестрой императрицы Александры Федоровны. Совпадение ДНК помогло опознать императрицу Александру Федоровну и трёх её дочерей.

В госпитале Марты Джейферсон (Шарлоттсвилль, штат Виргиния) были найдены образцы тканей Анны Андерсон, взятые при её жизни для медицинских анализов. ДНК из этих образцов сравнили с ДНК принца Филиппа и останков императорской семьи. В результате было доказано, что между ними нет ничего общего.

