



## ГЕНДЕРНЫЕ ЛОКУСЫ В ДНК-КРИМИНАЛИСТИКЕ И ЖЕНСКОМ СПОРТЕ

<sup>1</sup>Гарафутдинов Р.Р., <sup>1</sup>Сахабутдинова А.Р., <sup>2,3</sup>Алексеев Я.И., <sup>1</sup>Чемерис А.В.

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября 71, E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

<sup>2</sup>ООО «Синтол», Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

<sup>3</sup>Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Россия, 198095, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, д. 31/33

### Резюме

В судебной медицине существует необходимость установить для анализируемого биологического материала половую принадлежность их владельца. Для этого необходимо с помощью ПЦР выявлять специфичные последовательности ДНК, характерные только для Y-хромосомы. Для этих целей используется целый ряд локусов, располагающихся как на Y- и X-хромосомах и несущих при этом определенные различия в нуклеотидных последовательностях (альфонидные сателлиты *DYZ* и *DXZ*; амелогениновые локусы *AMELY* и *AMELX*; гены стероидной сульфатазы *STS*; гены нейрוליгина *NLG4Y* и *NLG4X* и др.), так и находящиеся только на Y-хромосоме (пол-определяющий регион *SRY*; ген специфического белка семенника *TSPY* и др.). При этом эксперты-криминалисты часто имеют дело с поврежденными или старыми образцами, в которых ДНК подверглась разрушению и протяженных фрагментов может не быть; при анализе такого материала могут быть получены ложноотрицательные результаты. Таким образом, в ДНК-криминалистике при детекции гендерных локусов нужно стремиться к детекции ампликонов минимально возможных размеров. В данном обзоре определенный акцент делается на размерах ампликонов и, как показывает практика, для большинства локусов их минимизация оказывается востребованной. Причем подобный ПЦР анализ в ряде случаев (у XX-мужчин, XY-женщин, у лиц с другими аномалиями половых хромосом, у людей, сознательно сменивших свою половую принадлежность) способен приводить к ложному определению фенотипического пола из-за генетических особенностей таких индивидов и в результате расследование преступления, сориентированное на поиск представителя конкретного пола, может пойти по ложному пути. Кардинальным решением данной проблемы в ДНК-криминалистике может стать всеобщая ДНК-регистрация всего населения, которая позволит по биологическим следам с высокой точностью устанавливать конкретного человека, кому эти следы принадлежа(т)ли, и его реальный пол уже будет неважен и определять его с помощью ПЦР будет не актуально. Помимо судебной медицины проблема установления пола существует и в женском спорте. На протяжении целого десятилетия для этого использовался метод ПЦР с некоторыми из перечисленных выше локусов, но с 2011 г. от проведения ПЦР отказались, и вместо нее стали определять уровень мужского гормона тестостерона. Однако с полом у спортсменок гораздо больше этических вопросов, нежели генетических.

**Ключевые слова:** ДНК, ПЦР, ДНК-криминалистика, гендерные локусы, пол

**Цитирование:** Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Алексеев Я.И., Чемерис А.В. Гендерные локусы в ДНК-криминалистике и женском спорте // *Biomics*. 2021. Т.13(1). С.54-74. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-6

© Авторы

## GENDER LOCI IN DNA FORENSICS AND WOMEN'S SPORTS

<sup>1</sup>Garafutdinov R.R., <sup>1</sup>Sakhabutdinova A.R., <sup>2,3</sup>Alekseev Ya.I., <sup>1</sup>Chemeris A.V.

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,  
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

<sup>2</sup>Syntol Ltd, 42 Timiryazevskaya str., 127550, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute for Analytical Instrumentation RAS, 31/33 Ivana Chernyh str., 198095, St. Petersburg, Russia

### Resume

In forensic medicine, it is necessary to establish the sexual identity of the owner of the analyzed biological material. To do this, it is necessary to use PCR to detect specific DNA sequences that are characteristic only of the Y chromosome. For these purposes, a number of loci are used, located on both the Y and X chromosomes but carrying certain differences in the nucleotide sequences (alpha satellites DYZ and DXZ; amelogenin loci AMELY and AMELX; STS steroid sulfatase genes; the genes of the neurologin NLG4Y and NLG4X, etc.), and those located only on the Y-chromosome (sex-determining region SRY; gene of the specific testicular protein TSPY, etc.). At the same time, forensic experts often deal with damaged or old samples in which the DNA has been destroyed and extended fragments in it may simply not be, as a result of which false negative results will be formed. Thus, in DNA forensics, when detecting gender loci, the sizes of amplicons should tend to the minimum possible. Therefore, in this review article, a certain emphasis was placed on the size of amplicons, and as practice shows, for most loci, their minimization is in demand. Moreover, such a PCR analysis in a number of cases (in XX-men, XY-women, in persons with other sex chromosome abnormalities, in people who deliberately changed their gender identity) it can lead to a false definition of the phenotypic sex due to the genetic characteristics of such individuals. As a result, the ongoing investigation of a crime, focused on the search for a representative of a particular gender, can go down the wrong path. A cardinal solution to this problem in DNA criminology can be a universal DNA registration of the entire population, which will allow for the biological traces with high accuracy to establish a specific person to whom these traces belong and his real sex will no longer be important and it will not be relevant to determine it with the help of PCR. In addition to forensic medicine, the problem of establishing gender also exists in women's sports. For a whole decade, the PCR method and some of the loci listed above were used for this purpose, but since 2011 PCR has been abandoned and instead the level of the male hormone testosterone has become determined. However, with the gender of female athletes, there are much more ethical issues than genetic ones.

**Keywords:** DNA, PCR, DNA forensics, gender loci, sex

**Citation:** Garafutdinov R.R., Sakhabutdinova A.R., Alekseev Ya.I., Chemeris A.V. Gender loci in DNA forensics and women's sports. *Biomics*. 2021. V.13(1). P.54-74. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-6

### © The Authors

#### Введение

В судебной медицине согласно пункту 84.10 приказа №346н Минздравсоцразвития РФ от 12.05.2010 г. «Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации», гласящему, что установление половой принадлежности биологических следов и объектов являются одним из основных видов исследований при молекулярно-генетической индивидуализации человека, требуется определять для анализируемого биологического материала половую принадлежность их владельца, поскольку это практически наполовину (когда

ожидание мужчин и женщин равнозначно) сужает круг тех, кому эти следы (останки) могли бы принадлежать. Для этого необходимо выявлять специфичные последовательности ДНК, характерные только для Y-хромосомы. Но из-за случающихся нарушений половых хромосом, приводящих, в частности, к XX-мужчинам или XY-женщинам, а также к другим хромосомным аномалиям [Asi n, Asi n, 2020], это не всегда дает однозначный результат, однако подобные тесты проводятся. Несмотря на то, что Y-хромосома является одной из самых мелких хромосом в кариотипе человека и меньше другой половой X-хромосомы почти в три раза, тем не менее, она несет присущие только ей

повторяющиеся участки, а также в ней находятся некоторые парные гены, несколько отличающиеся от гомологичных им и находящимся на X-хромосоме, а также уникальные гены, присущие в норме только Y-хромосоме, благодаря чему появляется возможность детектировать пол исследуемого образца. Помимо ДНК-криминалистики проблема установления пола существует и в женском спорте, и некоторое время использовался непрямой способ установления пола, заключающийся не в детекции Y-хромосомы, а в присутствии в анализируемом образце X-хромосом в двойном количестве, что опять-таки работает при отсутствии хромосомных нарушений.

Для выявления присутствия какого-либо генетического материала в неких образцах требуется подбор праймеров, отжигающихся на конкретных участках ДНК, фланкирующих искомым фрагмент для его амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для повышения специфичности процесса в реакцию может быть добавлен меченный подходящими флуорохромами гибридационный зонд, приходящийся на последовательности ДНК между праймерами, что также обеспечивает возможность контроля за протеканием реакции в реальном времени. Поэтому для выявления искомого генетического материала достаточно наличия в исследуемом образце фрагментов ДНК с приблизительными размерами 40-50 п.н. при детекции ампликонов по конечной точке или 55-80 п.н. при детекции в режиме реального времени. И здесь заключается коренное отличие от выявления применяемых при ДНК-идентификации личности STR-локусов, поскольку в их случае именно последовательность нуклеотидов между праймерами, несущая различное число повторяющихся мотивов, является информативной. Поэтому размер ампликонов для STR-локусов определяется как протяженностью такого информативного участка, так и расположением подходящих мест для отжига праймеров. Зачастую эксперты-криминалисты имеют дело с поврежденными или старыми образцами, в которых ДНК подверглась разрушению, и относительно протяженных фрагментов (обломков молекул) в ней может просто не быть, и ПЦР-анализ даст ложноотрицательный результат, на самом деле не свидетельствующий об отсутствии искомого мишеней. Таким образом, применительно к детекции гендерных локусов нужно стремиться к тому, чтобы размеры ампликонов приближались к минимально возможному, безусловно принимая во внимание вероятные инделы, служащие в том числе идентификаторами того или иного локуса из разных половых хромосом. Исходя из вышесказанного, при рассмотрении в данной статье используемых для установления пола образцов различных генов определенный акцент делался на

размерах ампликонов и, как показывает практика, для большинства локусов тенденция к их минимизации явно прослеживается и оказывается востребованной.

#### **Альфаидная сателлитная ДНК**

До появления метода ПЦР присутствие Y-хромосомы для криминалистических целей предлагалось проводить с помощью молекулярной дот-блот гибридизации с радиоактивно-меченными зондами, комплементарными фрагментам Y-хромосом [Tyler et al., 1986]. В цитируемой работе для этого была использована проба в виде рекомбинантной плазмиды, несущей содержащий повторы клонированный фрагмент Y-хромосомы человека размером около 3,4 т.п.н., использованный ранее для пренатального определения пола будущего ребенка [Lau et al., 1984]. Для обнаружения Y-хромосомы в дот-блот или слот-блот гибридизациях предлагалось использовать и иные гибридационные пробы, в том числе без применения радиоактивности [Gill, 1987; Stalvey, Erickson, 1987; Fukushima et al., 1988; Kobayashi et al., 1988; Yokoi, Sagisaka, 1989; Fattorini et al., 1991], но такие подходы не очень производительны и весьма трудоемки.

После разработки метода ПЦР появились новые уникальные возможности детекции Y-хромосомы путем быстрой наработки в достаточных для визуализации количествах определенных участков ДНК, и поэтому стали появляться статьи, в которых сообщалось о проведении амплификации специфичных для X- и Y-хромосом последовательностей, в том числе содержащих повторы. Среди таковых оказался все тот же участок ДНК размером 3,4 т.п.н., выявленный ранее как специфичный для мужских особей [Cooke, 1976], клонированный [Lau et al., 1984] и затем секвенированный [Nakahori et al., 1986]. В результате определения нуклеотидной последовательности данного фрагмента ДНК, получившего название DYZ1, выяснилось, что он преимущественно состоит из 713 tandemно расположенных пентануклеотидных повторов, среди которых преобладают несущие TTCCA-мотив. Столь значительное внимание этому участку ДНК уделено здесь не случайно, поскольку впоследствии разными авторами он неоднократно использовался для определения гендерной принадлежности образцов ДНК. Так, были подобраны праймеры, ограничивающие 149 п.н.<sup>1</sup> фрагмент этой последовательности, с помощью которых в ПЦР он был детектирован у плода с подозрением на гемофилию [Kogan et al., 1987]. Эта работа примечательна еще и тем, что она стала одной из

<sup>1</sup> В подписи к рисунку в той статье упоминается его размер как 154 п.н.

первых, в которых при проведении ПЦР использовалась термостабильная *Taq* полимеразы [Mullis, Faloona, 1987], еще до появления в журнале *Science* статьи, на которую в настоящее время ссылаются, как на первую публикацию, в которой описан принцип метода ПЦР [Saiki et al., 1988]. Позже на основе этой последовательности DYZ1 были выбраны другие праймеры, ограничивающие участок в 102 п.н., также послуживший для определения пола будущего ребенка путем обнаружения в циркулирующей крови матери соответствующих фетальных клеток [Lo et al., 1989]. Хотя эти работы не имели непосредственного отношения к ДНК-криминалистике, они заложили почву для дальнейшего развития данного подхода. Чуть позже уже в профильном журнале была опубликована статья, в которой источниками ДНК явились свежая кровь, пятна крови и разложившиеся ткани, а мишенью на Y-хромосоме послужила та же DYZ1 последовательность, но праймеры были выбраны иные, ограничивающие четыре участка A, B, C и D с размерами 900, 1024, 1086 и 647 п.н. соответственно [Akane et al., 1991]. Здесь нужно заметить, что ампликоны таких больших размеров мало пригодны для ДНК-криминалистики, но в данной работе еще для одного локуса, также используемого для детекции Y-хромосомы<sup>2</sup>, выбранные праймеры вели в целом к наработке достаточно протяженных ампликонов длиной 800 - 1000 п.н.

На основе известной последовательности сателлитной ДНК альфоидного типа, располагающейся в центромерной части хромосом, были подобраны специфичные праймеры, ограничивающие для Y-хромосомы участок в 170 п.н., а для X-хромосомы – в 130 п.н., что позволило с помощью ПЦР определить половую принадлежность у образцов в виде сухих пятен крови [Witt, Erickson, 1989]. Позже, используя эту праймерную систему, другим авторам удалось установить пол образцов, представляющих собой костные останки 12-летней давности, а также полугодовой, годовой и трехлетней давности пятна слюны, волосные луковицы и капли крови соответственно [Fattorini et al., 1993]. Этот же комплект праймеров позволил установить и подтвердить пол нескольких мумий, насчитывающих около 1300 лет [Lin et al., 1995]. Применимость этой альфоидной последовательности для определения половой принадлежности образцов была показана также при исследовании ДНК из пятен крови, вагинальных мазков, сигаретных окурков, костей и корней волос [Neeser, Liechti-Gallati, 1995]. В другой работе источником ДНК послужили кровь и зубы, в

которых по методу Witt и Erickson [1989] также успешно были выявлены ампликоны альфоидного сателлита размерами 131 п.н. для X-хромосомы и 172 п.н. для Y-хромосомы [Hanaoka, Minaguchi, 1996].

На примере использования для установления гендерной принадлежности ДНК сателлитной последовательности Y-хромосомы DYZ1 с числом копий свыше 3,5 тысяч можно наблюдать эволюцию подобных экспериментов в плане укорочения продуктов ПЦР, которые первоначально предлагалось нарабатывать размером около 1000 п.н. [Akane et al., 1991]. Затем в одной из работ при анализе пятен крови и вагинальных мазков для детекции Y-хромосомы использовались комплекты праймеров к последовательности DYZ1, приводящие к появлению ампликонов размерами 149 и 102 п.н., а для детекции X-хромосомы применялись праймеры к альфоидной сателлитной ДНК, ограничивающие фрагмент размером 130 п.н. [Pascal et al., 1991]. Позже другими авторами детекция DYZ1 велась с помощью ПЦР с праймерами, ограничивающими фрагмент ДНК размером 102 п.н. [Pfitzinger et al., 1993]. Относительно недавно были предложены праймеры к другим участкам DYZ1, которые приводили к образованию ампликонов длиной 143 п.н. и 60 п.н., причем детекция их накопления проводилась с помощью ПЦР в режиме реального времени и методом пиросеквенирования [Fazi et al., 2014]. Детекция пола с помощью другого альфоидного сателлита DXZ4, находящегося на X-хромосомах, основана на метилировании цитозинового остатка в нем, которое можно выявить комбинацией расщепления тотальной ДНК чувствительной к метилированию рестрикционной эндонуклеазой *HpaII* и ПЦР с последующим разделением ампликонов размером 80 п.н. методом гель-электрофореза [Naito et al., 1993; 1994]. Еще один альфоидный сателлитный повтор DYZ5 был использован для выявления Y-хромосомы путем амплификации 137 п.н. участка, в том числе в режиме реального времени [Nicklas, Buel, 2006].

#### **ZFY и ZFX-локусы**

В 1987 и 1989 гг. были клонированы и секвенированы гены белков цинковых пальцев *ZFX* и *ZFY*, расположенные на половых X- и Y-хромосомах соответственно [Page et al., 1987; Schneider-Gadicke et al., 1989], что затем позволило применить их для выявления гендерных различий образцов с помощью ПЦР. Так, в одной из работ подобранные праймеры приводили к амплификации фрагмента гена *ZFY* размером 400 п.н. [Ebensperger et al., 1989]. Был предложен способ детекции пола путем амплификации участков как *ZFY*, так и *ZFX* генов, при этом специфичный для Y-хромосомы ампликон имел

<sup>2</sup> Имелся ввиду амелогенин, о котором пойдет речь дальше.

размер 447 п.н., а для X-хромосомы таковой был немного меньше – 445 п.н. [Aasen, Medrano, 1990]. Другие авторы использовали праймеры, ограничивающие фрагмент этого гена размером 1131 п.н. [Norby, Eriksen, 1992]. Иной подход к определению пола криминалистических образцов с помощью генов *ZFY* и *ZFX* основан на методе ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) за счет присутствия в нарабатываемом ампликоне размером 209 п.н. дополнительного сайта рестрикционной эндонуклеазы *HaeIII* у мужских особей, что при разделении конечных продуктов геле-электрофорезом приводит к образованию трех фрагментов ДНК размерами 88, 84 и 37 п.н. против двух фрагментов в виде 172 и 37 п.н. у женщин [Stacks, Witte, 1996]. Другие авторы показали, что для определения пола метод ПЦР-ПДРФ генов *ZFY* и *ZFX* может быть преобразован в вариант обратной дот-блот-гибридизации и совмещен с использованием наборов HLA DQA1+PM [Reynolds, Varlaro, 1996]. Поскольку еще у высших обезьян в последний интрон гена *ZFX* внедрился *Alu*-элемент, то с помощью одной пары праймеров можно в ПЦР получать ампликоны разной длины у мужчин и женщин [Wilson, Erlandsson, 1998]. В этой работе было показано, что подобранные праймеры приводят к амплификации 1151 п.н. фрагмента для *ZFX* и 422 п.н. фрагмента для *ZFY*.

В еще одной работе был использован вариант детекции пола с помощью специально изготовленных ДНК-чипов, несущих вместе с 30 аутосомными маркерами с однонуклеотидными заменами для идентификации личности еще маркеры с тремя SNP в генах *ZFY* и *ZFX* (размер ампликонов составил 220 п.н.), а также с тремя SNP в генах *AMELY* и *AMELX* (к описанию которых переходим), что позволило установить пол у почти тысячи индивидов [Kim et al., 2010].

#### ***AMELY* и *AMELX*-локусы**

В начале 1990-х гг. были клонированы и секвенированы два гена амелогенина, расположенные на половых хромосомах человека и имеющие между собой в целом около 90% гомологии [Nakahori et al., 1991a]. Была установлена их экзон-интронная структура и выяснено, что эти гены, кодирующие белок зубной эмали, экспрессируются на обеих X- и Y-хромосомах, но транскрипты последней составляют лишь около 10% [Salido et al., 1992]. Учитывая различия в их нуклеотидных последовательностях, этот локус также стал использоваться для установления пола с помощью ПЦР [Nakahori et al., 1991] и фактически со временем стал даже основным для этой цели, хотя с ним не все так просто, как будет видно из дальнейшего изложения. Поначалу была подобрана пара праймеров, отжигающихся на

консервативных участках амелогениновых генов и обеспечивающая наработку одного ампликона размером 977 п.н., специфичного для X-хромосомы, а для Y-хромосомы – на 189 п.н. меньше (788 п.н.) [Nakahori et al., 1991]. В цитируемой статье размеры ампликонов не приводятся, однако указывается, что этот участок амелогенинового гена Y-хромосомы несет большую делецию размером 177 п.н., но кроме нее в амплифицируемый участок попадают и другие инделы, дающие в итоге разницу этого участка двух генов амелогенина в 189 п.н. В своей следующей статье эти авторы [Akane et al., 1992] подобрали другую систему праймеров (два прямых для X- и Y-хромосом на одном и том же месте амелогенинового гена, но с заменами нуклеотидов в них, и один общий праймер), включающие в ампликоны те же инделы, что и раньше, при этом уменьшив их размеры для *AMELX* и *AMELY* до 863 и 674 п.н. соответственно, что все равно довольно много для анализа деградированной ДНК.

Для того, чтобы уменьшить размеры амелогениновых ампликонов, сохранив при этом хромосомоспецифичность, был проведен анализ нуклеотидных последовательностей данных генов из разных половых хромосом, позволивший выявить в первом интроне место, амплификация которого приводила к образованию фрагментов ДНК размерами всего 106 и 112 п.н. для X- и Y-хромосом соответственно, а использование флуоресцентно меченных праймеров позволяло проводить детекцию в агарозном геле с помощью автоматического 362A Gene Scanner или в автоматическом ДНК-секвенаторе [Sullivan et al., 1993; Mannucci et al., 1994]. Успешность этой пары праймеров, ставших затем наиболее популярными, была продемонстрирована при исследовании крови 100 доноров (50 мужчин и 50 женщин), а также человеческих останков, включая кости, пролежавшие в земле более 70 лет.

Довольно крупные фрагменты ДНК амелогениновых генов с помощью аллель-специфичной ПЦР выявлялись в 18 археологических образцах возрастом от 200 до 8000 лет, где один праймер был общим, а два других отжигались на фактически соседних участках этих генов, но из-за протяженной делеции в гене *AMELY* ампликоны составили 330 и 218 п.н. [Faerman et al., 1995]. Также крупные ампликоны, охватывающие третий экзон и частично прилегающие интроны, размерами 194 п.н. (*AMELY*) и 188 п.н. (*AMELX*) предлагалось детектировать при анализе костных останков [Gibbon et al., 2009]. В этой же работе был предложен метод детекции амелогениновых генов на основе однонуклеотидных замен, выявляемых путем секвенирования 199 п.н. ампликонов. Описываются относительно крупные ампликоны размерами 219 и

225 п.н. для *AMELX* и *AMELY* соответственно [Steinlechner et al., 2002]. Также удалось подобрать иные комплекты специфичных праймеров для этого гена, которые вели к образованию ряда ампликонов – 212 и 218 п.н.; 92 и 91 п.н.; 80 и 83 п.н. для X- и Y-хромосом соответственно [Haas-Rochholz, Weiler, 1997]. Более короткие ампликоны, отличающиеся однонуклеотидными заменами и происходящие из 6-го экзона гена амелогенина длиной всего 78 п.н., предложили другие авторы [Zoledziewska, Dobosz, 2003]. Для обнаружения половой принадлежности сильно фрагментированной ДНК были подобраны праймеры с таким расчетом, что для локусов *AMELY* и *AMELX* нарабатывались ампликоны размерами 60 и 56 п.н. соответственно [Masuyama et al., 2017]. Пожалуй, самые короткие мишени в амелогениновом гене были найдены двумя группами авторов [Tschentscher et al., 2008; Li et al., 2012]. В первой работе размеры ампликонов составили 45/48 п.н., а во второй – еще короче – 44/45 п.н. для X/Y-хромосом соответственно, что лишь ненамного превышает принципиальный минимум для высокоспецифичной амплификации в ПЦР. Общим для этих работ явилось также то, что детекция амелогениновых ампликонов велась в них с помощью пиросеквенирования. Причем в первой работе между используемыми для амплификации *AMELX* праймерами оставалось всего три нуклеотида (CAT), тогда как для *AMELY* между праймерами за счет небольшой инсерции в этом месте гена располагалось шесть нуклеотидов (в дополнение к совпадающим у них CAT еще имелась GAT последовательность), но поскольку оба варианта с разных хромосом секвенировались одновременно, то в силу специфики метода пирограмма представляла собой некий гибрид прочтений этих нуклеотидов. Схожая ситуация характерна и для второй работы, за исключением того, что праймеры, подобранные к иному месту амелогениновых генов, были чуть короче, а участок гена между ними был больше – 7 и 8 нуклеотидов для *AMELX* и *AMELY* соответственно.

Другой, не электрофоретический метод выявления амелогениновых локусов заключался в их детекции с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в денатурирующих условиях (DHPLC – Denaturing High-Performance Liquid Chromatography), позволяющей уловить различия не только в длине, но и в последовательности нуклеотидов [Shinka et al., 2001]. Так, в данной работе, наряду с известными праймерами, амплифицирующими участки генов *AMELX/Y* отличающихся размеров, была выбрана пара праймеров, фланкирующая последовательность длиной 45 нуклеотидов, но несущая однонуклеотидное отличие между генами с разных хромосом. Причем на такой анализ оказалось достаточным всего 8 минут. В этом случае между 3'-

концами праймеров располагалось по четыре нуклеотида для обоих вариантов генов.

Описан способ детекции амелогениновых локусов у 20 скелетов, захороненных в Иллинойсе ориентировочно около 1300 года н.э., с помощью ПЦР с последующей дот-блот-гибридизацией с меченными биотином зондами [Stone et al., 1996], что сильно напоминает метод детекции *HLA DQ1* локусов. В этой работе амплифицировался фрагмент размером 112 п.н., происходящий из шестого экзона амелогенинового гена, несущий между *AMELX* и *AMELY* несколько отличий преимущественно в виде однонуклеотидных замен, в том числе две таких замены приходились на гибридационные зонды. Пожалуй, нужно заметить, что размер этого единого ампликона для двух вариантов генов в 112 п.н., не имея больше ничего общего, просто совпадает по размеру с одним из ампликонов из первого интрона гена *AMELY*, упоминавшегося выше. Довольно оригинальный вариант детекции обоих амелогениновых генов заключается в лигировании специальных меченных разными флуорохромами для *AMELY* и *AMELX* олигонуклеотидов на матрицах, образованных в ходе ПЦР [Zoledziewska, Dobosz, 2003]. Причем в этой работе был выбран тот же участок шестого экзона, что и в статье [Stone et al., 1996], с тем отличием, что он был укорочен до 78 п.н. Для такого анализа после завершения ПЦР ампликоны денатурировались и на них происходил отжиг и лигирование соответствующих олигонуклеотидов, после чего продукты лигирования разделялись капиллярным гель-электрофорезом.

Помимо гель-электрофореза, хроматографии, пиросеквенирования и прочих многостадийных способов, с помощью ПЦР в реальном времени можно непосредственно в ходе амплификации получать информацию о наличии того или иного локуса амелогениновых генов. Так, для ставших классическими ампликонов длиной 106 и 112 п.н. в ПЦР были добавлены гибридационные TaqMan MGB зонды, меченные разными флуорохромами для *AMELX* и *AMELY*, что позволило устанавливать их присутствие, в том числе в древних образцах [Alonso et al., 2004; Alonso, Martin, 2005]. В результате проведения ПЦР в реальном времени детекция амелогениновых генов у большого числа исследуемых образцов как современной, так и древней ДНК (возрастом от 100 до 10 тысяч лет) осуществлялась путем плавления специфичных продуктов, соответствующих *AMELX* (184 п.н.), *AMELY* (190 п.н.) и *AMELY* (92 п.н.) [Kim et al., 2013]. Причем ампликон укороченного размера *AMELY* оказался более пригоден для подобного анализа, в том числе, будучи не так подверженным ингибирующему эффекту гуминовой кислоты. Детекция еще более коротких

ампликонов размерами 69 п.н. (*AMELX*) и 77 п.н. (*AMELY*) также осуществлялась в реальном времени [Fazi et al., 2014].

Так как режим реального времени позволяет с помощью ПЦР количественно оценивать копийность тех или иных генов, то появляется возможность при сравнении с подходящим референсным геном из X-хромосомы детектировать количество копий амелогенинового гена *AMELY* (по сути - количество X-хромосом) [Nakanishi et al., 2015]. В этой работе таким непрямым способом была точно установлена половая принадлежность образцов ДНК, взятых у 20 мужчин и 20 женщин. Другими авторами, напротив, был предложен подход, рассчитанный на детекцию в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I только *AMELY* локуса, в норме свидетельствующим о наличии Y-хромосомы [Roccazzello et al., 2004]. Причем в этой работе исследуемая ДНК извлекалась из широкого спектра объектов – слюны, в том числе слюны с почтовой марки, волос, кости, спермы, крови, мочи, сигаретных окурков и др.

В одной из работ проводилась детекция по отдельности локусов *AMELY* и *AMELX* с помощью изотермической LAMP амплификации в реальном времени, контролируемая по изменению мутности реакционной смеси [Nogami et al., 2008]. Авторы сообщили, что для регистрации результатов амплификации было достаточно приблизительно получаса, но если ими использовались дополнительные Loop праймеры, то это время сокращалось наполовину. В этом методе ампликоны представляют собой некую лесенку полос ДНК, если их наблюдать с помощью гель-электрофореза, и поэтому для оценки пригодности данного метода для анализа разрушенной ДНК следует обратить внимание на места отжига крайних праймеров, которые были разнесены для *AMELY* на 202 п.н., а для *AMELX* – на 213 п.н. и в этом случае происходили из разных частей амелогениновых генов.

Еще одни авторы подобрали комплект праймеров к *AMELY*-локусу, обеспечивающие наработку ампликонов размерами 208 и 211 п.н., при этом прямой праймер был общим, а обратные праймеры отжигались на одном и том же месте с небольшим трехнуклеотидным сдвигом [Falconi et al., 2001]. Особенностью данной работы было то, что в ней анализировались искусственно смешанные образцы мужской и женской ДНК в пропорциях 1:1000, 1:10000 и 1:100000, и для всех вариантов детектировался *AMELY*-ампликон при отсутствии в контрольном образце из одной женской ДНК какой-либо амплификации. Ранее на некоторые проблемы анализа смешанных образцов с использованием амелогениновых генов обращали внимание

отечественные авторы [Исаенко, Иванов, 2000]. В другой работе было изучено влияние присутствия ДНК некоторых животных на точность определения пола человеческой ДНК в смешанных образцах [Земскова и др., 2003].

Несмотря на широкое использование амелогениновой системы генов для определения пола образцов и большое количество подобранных праймеров к разным участкам этих генов оказалось, что у некоторых мужчин амелогениновый ген на Y-хромосоме не выявляется. Впервые внимание на это было обращено, когда при исследовании 350 мужчин с помощью двух праймерных систем, нацеленных на разные участки данного гена, у двух индивидов соответствующие ампликоны не образовались, что явилось следствием делеционного полиморфизма, но при этом SRY-локус (о котором будет говориться ниже) дал у них ампликон ожидаемого размера 93 п.н. [Santos et al., 1998]. Через некоторое время после этого сообщения появились публикации других авторов, использующих иные праймерные системы [Roffey et al., 2000; Brinkmann, 2002; Steinlechner et al., 2002; Thangaraj et al., 2002; Michael, Brauner, 2004; Lattanzi et al., 2006; Mitchell et al., 2006 и др.], и стало ясно, что проблема, по крайней мере, для некоторых популяций, стоит довольно остро. В отдельных работах было показано, что проблемы с амплификацией амелогенинового гена могут быть вызваны не его делецией, а заменами отдельных нуклеотидов в местах, приходящихся на 3'-конец отжигающихся праймеров [Shadrach et al., 2004; Maciejewska, Pawlowski, 2009]. Но главной причиной ошибок при установлении пола с помощью амелогенинового локуса все же является делеция данного участка Y-хромосомы, весьма часто встречающаяся в индийской популяции [Kashyap et al., 2006; Davis et al., 2012; Ma et al., 2012; Tozzo et al., 2013 и др.]. Но «лидерами» в этом являются Шри Ланка (8,333%) и Непал (по одним данным - 6,494%), тогда как в Индии всего 1,852% мужчин несут такую делецию [Butler, Li, 2014]. Из приведенной в цитируемой статье таблицы можно видеть, что высокие значения также характерны для Малайзии (для одной из популяций - 3,175%), Израиля (1,042%), Сингапура (для одной из популяций - 1,714), Японии (0,2%), тогда как в Европе подобные мутации встречаются гораздо реже – сотые доли процента). Относительно недавно опубликована статья, в которой сообщено об обнаруженных в Белоруссии за 15-летнюю экспертную практику 9 случаях отсутствия у мужчин амелогенинового гена на Y-хромосоме [Borovko et al., 2015].

Учитывая приведенные выше данные о не выявлении у некоторых людей из разных частей Планеты гена *AMELY*, неудивительно, что большее внимание стало уделяться другим локусам,

позволяющим устанавливать половую принадлежность образцов.

### **SRY-локус**

Еще одним гендероспецифичным локусом служит *SRY* (Sex-determination Region Y), обнаруженный впервые в 1990 г. на краю короткого плеча Y-хромосомы около границы псевдоаутосомной области [Sinclair et al., 1990]. Ген *SRY* не имеет интронов и кодирует белковый фактор развития семенников (Testis-Determining Factor – TDF), инициирующий развитие мужского организма. Одним из доказательств этому послужила работа, в которой были созданы трансгенные мыши-самки, но несущие аналогичный мышинный ген *Sry*, приведший к изменению у них пола на мужской тип [Коорман et al., 1991].

Внимание на *SRY* локус как на мишень для установления пола с помощью ПЦР было обращено практически сразу после его обнаружения, и в 1992 г. сообщалось о детекции для этой цели ампликона размером 418 п.н. [Norby, Eriksen, 1992]. Тогда же *SRY*-локус стал использоваться при определении пола у спортсменов перед Олимпиадой в Барселоне, но об этом дальше будет говориться отдельно. Впоследствии произошло некоторое укорочение искомым ампликонов данного гена – до 267 п.н. [Palmirotta et al., 1997], до 254 п.н. [Cui et al., 1994] и до 139 п.н. [Finch et al., 1996]. Причем в первой работе из этих трех публикаций ген *SRY* служил мишенью для установления пола захоронений, датировка которых радиоуглеродным анализом была определена как 800 – 1200 годы. Праймеры для детекции еще более короткого ампликона длиной 93 п.н. были подобраны чуть позднее [Santos et al., 1998]. Но эта уже упоминавшаяся выше статья примечательна еще и другим, поскольку именно в ней были отмечены проблемы с выявлением 106/112 п.н. фрагментов амелогенинового гена. В еще одной работе предлагалось детектировать отличающийся фрагмент *SRY* локуса чуть большего размера - 96 п.н. [Drobnić, 2006]. Для повышения чувствительности обнаружения *SRY* локуса была предложена вложенная ПЦР с размерами ампликонов 102 п.н. и 85 п.н. (внешний и внутренний ампликоны соответственно) [Luptakova et al., 2011]. Для установления половой принадлежности костных останков 3500 летней давности были подобраны праймеры, амплифицирующие участок гена *SRY* размером 52 п.н. [Masuyama et al., 2017].

В литературе можно встретить и иные размеры ампликонов *SRY*-локуса и подобранные разными авторами другие комплекты праймеров. Так, в одной из статей упоминается амплификация для криминалистических целей фрагмента гена *SRY* размером 197 п.н. [Tozzo et al., 2013]. Ранее

предлагалось детектировать ампликон длиной 609 п.н. [Choi et al., 1999] и 231 п.н. [Gold et al., 2001]. Для одного общего прямого праймера была подобрана целая серия обратных праймеров, образующих *SRY*-ампликоны размерами 107, 137, 193, 313, 392 и 524 п.н., при этом было обнаружено, что короткие ампликоны (включая 313 п.н.) показывают лучшие результаты при выявлении циркулирующей в крови матери ДНК плода [Chan et al., 2004]. В другой работе были подобраны два комплекта праймеров для амплификации гена *SRY* с размерами ампликонов в 130 и 77 п.н., при этом отмечалась небольшая гомология мест отжига этих праймеров с последовательностями, находящимися на X-хромосоме и 7 хромосоме соответственно [Morikawa et al., 2011]. В серии статей одной группы авторов сообщается о детекции *SRY*-генов в режиме реального времени с помощью одного и того же гибридизационного зонда и комплекта праймеров, обеспечивающих наработку ампликона довольно крупного размера – 500 п.н. [George et al., 2010; Vikham Simha Reddy et al., 2011; Naik et al., 2012]. В этих работах ДНК выделялась из эпителиальных клеток с зубной щетки, с зубного протеза или непосредственно из зубной пульпы. В одном из профильных журналов по судебной медицине *SRY*-ампликон составил даже 778 п.н. [Mohamed, Tayel, 2005].

Определенным недостатком *SRY*-локуса является то, что он присущ только Y-хромосоме (его транслокацию на X-хромосому, о которой будет говориться ниже, здесь в виду не имеем), и поэтому при проведении ПЦР в качестве контроля пригодности для процесса амплификации выделенной ДНК требуется дополнительно использовать какие-нибудь другие маркерные гены, расположенные на других хромосомах, тогда как, например, амелогениновые гены даже с одной праймерной системой, обеспечивающей различия в размерах ампликонов у локусов *AMELX* и *AMELY*, выявляются и у мужчин, и у женщин. Поэтому в большинстве цитируемых выше работ детекция *SRY*-локуса обычно велась параллельно с обнаружением иного подходящего локуса. Однако это не является серьезной проблемой, и посему мы сочли обязательным упоминать такие локусы, тем более что с детекцией гена *SRY* и с установлением с его помощью истинного пола индивида или анализируемого образца дело обстоит гораздо сложнее.

Как известно, X- и Y-хромосомы в первом делении мейоза обмениваются генетическим материалом в норме в пределах псевдоаутосомной области, но иногда генетическая рекомбинация происходит и за ее границами, захватывая



близлежащие участки хромосом и приводят к двум относительно редким anomalies, когда появляются женщины XY и мужчины XX. У последних TDF-участки Y-хромосомы, несущие в том числе ген *SRY*, транслоцированы на короткое плечо X-хромосомы.

Причем ген *SRY*, как можно видеть из рис. 1, располагается очень близко к псевдоаутосомному региону, что способствует его переносу на X-хромосому чаще остальных локусов.



Рис. 1. Локализация генов *NLGNX/Y*, *AMELX/Y*, *ZFX/ZFY*, *SRY* на половых хромосомах относительно псевдоаутосомной области (ПАО)

Fig. 1. Localization of *NLGNX/Y*, *AMELX/Y*, *ZFX/ZFY*, *SRY* genes on sex chromosomes relative to the pseudoautosomal region (ПАО)

Что касается XY женщин, то у них этот TDF-участок делегирован или изменен настолько, что полноценно не выполняет своей функции. Считается, что обе эти anomalies происходят с частотой 1:20000. Соответственно, используя *SRY*-маркер, пол у таких людей будет с помощью ПЦР определен неверно; по крайней мере, не будет соответствовать фенотипическим проявлениям. В частности, в упоминавшейся выше статье, описывающей случаи отсутствия амелогенинового гена на Y-хромосоме в Белоруссии, также приводятся сведения и о других генетических anomalies, в том числе о выявлении *SRY*-локуса у трех мужчин с XX-синдромом [Borovko et al., 2015].

#### Прочие гендерные локусы

Помимо вышеприведенных наиболее часто используемых для определения пола маркеров, в ряде случаев применялись и иные гендерные локусы. Так, был обнаружен STR-локус с пентануклеотидным мотивом (TAAAA)<sub>n</sub>, расположенный на обеих половых хромосомах и у 72 индивидов было выявлено 7 аллелей, вместе с фланкирующими последовательностями, ограниченными подобранными праймерами, формирующими ампликоны размерами от 125 до 165 п.н. [Chen et al., 1994]. Позже выяснилось, что в этом находящемся на Y-хромосоме STR-локусе один из мотивов имеет дополнительный аденин (TAAAAA), что позволяет дискриминировать его от аналогичного локуса на X-хромосоме [Cali et al., 2002]. Учитывая, что данный локус мультиаллелен и имеет некоторые расовые отличия, авторы рекомендовали использовать его в STR-наборах для криминалистических, археологических и генеалогических применений. В дальнейшем его потенциал был подтвержден при

исследовании мексиканских популяций [Torre-Rodriguez et al., 2006].

При скрининге X- и Y-хромосом на предмет наличия в них *Alu*-последовательностей были найдены мономорфные инсерции в гомологичных нереккомбинирующих участках обеих хромосом (произошедшие еще до выхода первых людей из Африки), обозначенные как *AluSTXa* и *AluSTYa*, что дало возможность подобрать одну общую пару праймеров, фланкирующих эти области [Hedges et al., 2003]. При проведении ПЦР и последующем электрофорезе в агарозном геле для мужских особей становятся видны два ампликона с размерами 199 и 528 п.н., тогда как для женщин характерен один ампликон – 528 п.н. На основе этих данных позже другими авторами был разработан способ детекции результатов такой амплификации с помощью гель-электрофореза на микрочиповом устройстве [Njoroge et al., 2010].

Между высокогомологичными областями X- и Y-хромосом было обнаружено отличие в виде делеции из 90 нуклеотидов, характерной для X-хромосомы, что позволило подобрать специфичные праймеры для амплификации 69 и 77 п.н. участков Y- и X-хромосом, а также TaqMan-пробы к ним с целью дифференциации пола у исследуемых образцов [Walker et al., 2005]. С помощью ПЦР в реальном времени в этой работе на едином планшете был точно установлен пол 95 человек. В другой публикации для определения пола показано преимущество использования маркерного локуса *DYS14* из гена *TSPY*, число копий которого превышает 50; размер ампликона при этом составил 147 п.н. [Благодатских и др., 2010]. Позже другими авторами были подобраны праймеры для амплификации данного гена с детекцией по конечной точке, размер ампликона

которого составил 84 п.н., а для его детекции в реальном времени были выбраны гибридационный TaqMan зонд и другие праймеры, образующие ампликон размером 124 п.н. [Aghanoori et al., 2012]. Для дифференциации пола было предложено использовать locus STS (наряду со стандартными амелогенином и *SRY*), которым оказался фрагмент гена стероидной сульфатазы [Morikawa et al., 2011], причем праймеры были подобраны так, что Y-специфичный вариант ампликона имел размер 166 п.н., а X-специфичный – 158 п.н. Для установления пола исследуемых образцов также разработан четырехмаркерный метод, названный YFlag, рассчитанный на одновременную детекцию *SRY*, *TSPY1*, *TSPY2* и *BPY2* локусов путем однонуклеотидного удлинения матриц, образующихся в ходе предварительной ПЦР [Allwood, Harbison, 2015]. Другие авторы определение пола проводили с помощью 8-ми локусов (*SRY*, *DYZ1*, *DYZ3*, *DYS14*, *PABY*, *RPS4Y(SY16)*, *RPS4Y(SY17)*, *ZFY*), расположенных как на коротком, так и длинном плече Y-хромосомы, а также в ее центромерной области [Choi et al., 1999].

В рамках работы по оценке качества выделенной ДНК с помощью плавления ампликонов разной длины было показано, что для установления пола образца возможна детекция локуса *TBL1Y* (transducin beta-like), происходящего из Y-хромосомы [Ginart et al., 2019]. В этой работе были подобраны праймеры, фланкирующие участок данного гена размером 84 п.н., но не приводящие к амплификации гомологичного гена *TBL1X* из X-хромосомы, несмотря на их довольно высокую гомологию [Di Stazio et al., 2019]. Также для определения пола предложено использовать один из генов нейрוליгина – происходящих из разных половых хромосом *NLGN4X* и *NLGN4Y*, характеризующихся довольно высокой гомологией кодирующих областей – 96,9% [Maxeiner et al., 2019]. В качестве мишеней для определения пола образцов были выбраны нетранслируемые области первого экзона, отличающиеся довольно большим числом замен нуклеотидов, но главное их различие заключается в протяженной делеции у гена *NLGN4Y*, что приводит к наработке его ампликона уменьшенного размера – 187 п.н. против 381 п.н. для *NLGN4X*. Было показано, что этот подход определения пола пригоден для разных этнических групп. Нужно отметить, что в данной работе для выявления однонуклеотидного полиморфизма был применен относительно новый метод – РНКазы Н зависимая ПЦР [Dobosy et al., 2011].

Как можно видеть из рис. 1, гены *NLGNX/Y* расположены относительно недалеко от псевдоаутосомного региона половых хромосом, при этом *NLGN4Y* находится довольно далеко от

рекомбинирующего участка – гораздо дальше, нежели локусы *AMELY*, *ZFY* и тем более *SRY*, который расположен чуть ли не вплотную к псевдоаутосомной области. Это делает гены *NLGNX/Y* теоретически более подходящими для установления пола, но размеры ампликонов с обеих хромосом все же велики.

### Гендерные локусы и женский спорт

Даже из вышеописанных хромосомных перестроек (опуская здесь XX/XXY мозаицизм и другие нарушения половых хромосом, а также искусственную смену пола) видно, что ситуация с полами у людей несколько сложнее и не вполне совпадает с классическими представлениями о мужчинах и женщинах как носителях XY- и XX-кариотипов соответственно. Поэтому считается, что с учетом того, что мужчины в целом характеризуются большей физической силой, наличие «мужского начала» в геноме отдельных женщин теоретически может давать им некоторое преимущество в спортивных дисциплинах, где требуется сила и выносливость. И история спорта знает немало примеров, когда чемпионами и рекордсменами становились именно такие представительницы «слабого пола». За прошедшие годы известны даже не единичные случаи лишения завоеванных наград и званий рекордсменов.

Впервые вопрос об установлении пола одной из участниц был поднят после Берлинской олимпиады 1936 г. По завершению Римской олимпиады 1960 г. он встал с новой силой, и при Международном олимпийском комитете (МОК) была создана специальная Медицинская Комиссия. В 1966 г. на чемпионате Европы по легкой атлетике, проводившемся в Будапеште, впервые в обязательном порядке был применен так называемый «секс-тест», осуществляемый путем визуального осмотра атлетов тремя врачами-гинекологами. Здесь можно заметить, что, зная о таком готовящемся тесте, несколько спортсменов мирового класса, включая пять держателей мировых рекордов, на те соревнования почему-то не приехали и, соответственно (возможно сознательно), такой тест не проходили [Ferguson-Smith, Ferris, 1991; Ferris, 1992]. Эта процедура, тем не менее, вызвала в целом негативный отклик и у спортсменов, и в средствах массовой информации, поскольку была сочтена унизительной. И в 1967 г. МОК перед Олимпиадой в Мехико принял решение - для установления пола проводить хромосомный тест на наличие телец Барра, для чего требовался цитологический анализ мазка из ротовой полости, специфичный на X-хромосому, точнее, определяющий их количество. При этом мужчины с синдромом Кляйнфельтера (XXY) этот тест могли легко проходить и выступать в соревнованиях под видом

женщин. Были и другие ошибочные результаты, в том числе из-за банального человеческого фактора, играющего в этом тесте не последнюю роль. Неудивительно, что в 1991 г. МОК отказался от анализа на наличие телец Барра, замененного на зимней и летней Олимпиадах 1992 г. в Альбервилле и Барселоне на выявление Y-хромосомы с помощью ПЦР. Так, среди проверенных в Барселоне 2406 спортсменов *DYZ1*-локус был выявлен у 11, которых затем проверили на наличие *SRY*-локуса и обнаружили его у пяти человек [Serrat, Garcia de Herreros, 1993; 1996]. Но проблема с точным определением пола тем самым все равно не была решена, к тому же многие спортсменки, отстраненные таким образом от соревнований, были не согласны с этим, в том числе по причине того, что не обладали некими мужскими чертами, дающими им преимущество в силе и выносливости, но несли эти злосчастные для себя локусы. Поэтому под давлением общественности МОК принял решение в 1999 г. отказаться от всех подобных тестов, и на Олимпиаде 2000 г. в Сиднее они уже не проводились [Elsas et al., 2000; Simpson et al., 2000]. Однако новые случаи побед на спортивных соревнованиях женщин, чей истинный пол вызывал сомнения, вновь заставили вернуться к вопросу его установления, или по некоторым другим показаниям не допускать некоторых спортсменок до соревнований. Так, с 2011 г. рекомендовано определять в сыворотке крови уровень тестостерона, который для женщин не должен быть выше 10 нмоль/л, что считается нижней границей нормы для мужчин [Martinez-Patino et al., 2016].

#### Заключение

Завершая данную статью, нужно констатировать, что ПЦР анализ обнаруженных вещдоков с помощью используемых ныне гендерных локусов в ряде случаев способен приводить к ложному определению фенотипического пола из-за генетических особенностей таких индивидов. Не говоря уже про людей, сознательно сменивших свой пол. В результате проводимое расследование какого-либо преступления, сориентированное на поиск мужчины, может пойти по ложному пути, поскольку нужно будет искать женщину (или наоборот), и об этом, безусловно, нужно помнить. Кардинальным решением данной проблемы в судебной медицине может стать ДНК-регистрация всего населения, которая позволит по биологическим следам с высокой точностью устанавливать конкретного человека, кому эти следы принадлежат(ли), и его реальный пол уже будет неважен и определять его с помощью ПЦР будет не актуально. При этом абсолютно ясно, что рано или поздно такая ДНК-регистрация непременно произойдет, и вопросы об этом уже неоднократно

поднимались в научной литературе [Williamson, Duncan, 2002; Kaye, Smith, 2003; Graham, 2007; Dedrickson, 2017; Hazel et al., 2018; Smith, 2018], в том числе и нами [Анисимов и др., 2019; Чемерис и др., 2020].

Что касается женского спорта, то проблема эта даже больше этическая, нежели генетическая, тем более если учесть, что в отдельных случаях достаточно фактически лишь одного транслоцированного с Y- на X-хромосому гена *SRY* или его неправильного функционирования, чтобы фенотип не соответствовал генотипу. Вряд ли молекулярные биологи могут посоветовать спортивным функционерам, как им поступать в подобных случаях.

#### Благодарности

Данная работа поддержана грантом РФФИ по проекту РФФИ-мк № 18-29-14076.

#### Литература

1. Анисимов В.А., Гарафутдинов Р.Р., Сагитов А.М., Сахабутдинова А.Р., Хуснутдинова Э.К., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. ДНК-криминалистика – зарождение, современность и перспективы // Биомика. 2019. Т.11(3). С. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26
2. Чемерис Д.А., Гарафутдинов Р.Р., Сагитов А.М., Сагитова М.А., Михайленко К.И., Зубов В.В., Васильев Р.Г., Сломинский П.А., Анисимов В.А., Хуснутдинова Э.К., Алексеев Я.И., Курочкин В.Е., Лавров Г.С., Воробьев А.А., Аминев Ф.Г., Чемерис А.В. Микродиплотипы как новые маркеры для ДНК-идентификации личности // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 300-317. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-17
3. Aasen E., Medrano J.F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats // *Biotechnology (N.Y)*. 1990. V.8(12). P.1279-81. doi: 10.1038/nbt1290-1279.
4. Abebe M., Brauner P. Erroneous gender identification by the amelogenin sex test // *J. Forensic Sci.* 2004. V.49(2) .P.258-259.
5. Acien P, Acien M. Disorders of Sex Development: Classification, Review, and Impact on Fertility // *J. Clin. Med.* 2020. V.9(11):3555. doi: 10.3390/jcm9113555
6. Aghanoori M.R., Vafaei H., Kavoshi H., Mohamadi S., Goodarzi H.R. Sex determination using free fetal DNA at early gestational ages: a comparison between a modified mini-STR genotyping method and real-time PCR // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012. V.207(3). P.202. e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2012.06.026.
7. Akane A., Seki S., Shiono H., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M., Matsubara K., Nakahori

- Y., Nagafuchi S., Nakagome Y. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene // *Forensic Sci. Int.* 1992. V.52(2). P.143-8. doi: 10.1016/0379-0738(92)90102-3.
8. Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., S Seki, Nagafuchi S., Yamada M., Nakagome Y. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods // *Forensic Sci. Int.* 1991. V.49(1). P.81-8. doi: 10.1016/0379-0738(91)90174-h.
  9. Allen C.K.C., Zhang J., Hui A.B.Y., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.-W., Huang D.W.S., Dennis Lo Y.M. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma // *Clin. Chem.* 2004. V.50(1). P. 88-92. doi: 10.1373/clinchem.2003.024893.
  10. Allwood J.S., Harbison S.A. "YFlag"--a single-base extension primer based method for gender determination // *J. Forensic Sci.* 2015. V.60(1). P.142-6. doi: 10.1111/1556-4029.12553.
  11. Alonso A., Martín P. A real-time PCR protocol to determine the number of amelogenin (X-Y) gene copies from forensic DNA samples // *Methods Mol. Biol.* 2005. V.297. P.31-44. doi: 10.1385/1-59259-867-6:031.
  12. Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., García O., Fernández de Simón L., García-Hirschfeld J., Sancho M., de La Rúa C., Fernández-Piqueras J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies // *Forensic Sci. Int.* 2004. V.139(2-3). P.141-9. doi: 10.1016/j.forsciint.2003.10.008.
  13. Blagodatskikh E.G., Nikitin A.G., Seregin Yu.A., Blagodatskikh K.A., Nosikov V.V. DYS14 marker and sex determination using biological samples // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2010. V. 44(4). P. 646-9.
  14. Borovko S., Shyla A., Korban V., Borovko A. Amelogenin test abnormalities revealed in Belarusian population during forensic DNA analysis // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V.15. P.98-104. doi:10.1016/j.fsigen.2014.10.014.
  15. Brinkmann B. Is the amelogenin sex test valid? // *Int. J. Legal Med.* 2002. V. 116(2). P.63. doi: 10.1007/s00414-001-0263-x.
  16. Butler E., Li R. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis // *J. Forens. Invest.* 2014. V.2(3).
  17. Cali F., Forster P., Kersting C., Mirisola M.G., D'Anna R., De Leo G., Romano V. DXYS156: a multi-purpose short tandem repeat locus for determination of sex, paternal and maternal geographic origins and DNA fingerprinting // *Int. J. Legal. Med.* 2002. V.116(3). P.33-8. doi: 10.1007/s00414-001-0272-9.
  18. Chen H., Lowther W., Avramopoulos D., Antonarakis S.E. Homologous loci DXYS156X and DXYS156Y contain a polymorphic pentanucleotide repeat (TAAAA)n and map to human X and Y chromosomes // *Hum. Mutat.* 1994. V.4(3). P.208-11. doi: 10.1002/humu.1380040306.
  19. Choi S.K., Kim J.W., Park S.Y., Kim Y.M., Kim J.M., Ryu H.M., Yang J.S., Yoon S.R. Retroactive DNA analysis for sex determination and dystrophin gene by polymerase chain reaction with archived cytogenetic slides // *Exp. Mol. Med.* 1999. V.31(1). P.36-41. doi: 10.1038/emm.1999.6.
  20. Cooke H. Repeated sequence specific to human males // *Nature.* 1976. V. 262(5565). P.182-6. doi:10.1038/262182a0.
  21. Cui K.H., Warnes G.M., Jeffrey R., Matthews C.D. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification // *Lancet.* 1994. V.343(8889). P.79-82. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90815-x.
  22. Davis C., Illescas M., Tirado C., Lopez R., Budowle B., Dawson Cruz T. A case of Amelogenin Y-null: a simple primer binding site mutation or unusual genetic anomaly? // *Leg. Med. (Tokyo)*. 2012. V.14(6). P.320-3. doi: 10.1016/j.legalmed.2012.05.002.
  23. Dobosy J.R., Rose S.D., Beltz K.R., Rupp S.M., Powers K.M., Behlke M.A., Walder J.A. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers // *BMC Biotechnol.* 2011. V.11. P.80. doi: 10.1186/1472-6750-11-80.
  24. Drobic K. A new primer set in a SRY gene for sex identification // *Int. Congress Series.* 2006. doi: 10.1016/j.isc.2005/08/020.
  25. Ebensperger C., Studer R., Eppelen J.Y. Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man // *Hum. Genet.* 1989. V.82(3). P.289-90. doi: 10.1007/BF00291174.
  26. Elsas L.J., Ljungqvist A., Ferguson-Smith M.A., Simpson J.L., Genel M., Carlson A.S., Ferris E., de la Chapelle A., Ehrhardt A.A. Gender verification of female athletes // *Genet. Med.* 2000. V.2(4). P.249-54. doi: 10.1097/00125817-200007000-00008.
  27. Faerman M., Filon D., Kahila G., Greenblatt C.L., Smith P., Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles // *Gene.* 1995. V.167(1-2). P.327-32. doi: 10.1016/0378-1119(95)00697-4.
  28. Falconi M., Pelotti S., Pappalardo G. A method for sex assignment in mixed samples // *Hum. Genet.* 2001. V.108(3). P.267-8. doi: 10.1007/s004390100478.

29. Fattorini P., Cacció S., Gustincich S., Wolfe J., Altamura B.M., Graziosi G. Sex determination and species exclusion in forensic samples with probe cY97 // *Int. J. Legal Med.* 1991. V.104(5). P. 247-50. doi: 10.1007/BF01369578.
30. Fattorini P., Cacció S., Gustincih S., Florian F., Altamura B.M., Graziosi G. Sex identification by polymerase chain reaction of alpha-satellite in aged tissue samples // *Electrophoresis.* 1993. V.14(1-2). P.23-6. doi: 10.1002/elps.1150140105.
31. Fazi A., Gobeski B., Foran D. Development of two highly sensitive forensic sex determination assays based on human DYZ1 and Alu repetitive DNA elements // *Electrophoresis.* 2014. V.35(21-22). P.3028-35. doi: 10.1002/elps.201400103.
32. Ferguson-Smith M.A., Ferris E.A. Gender verification in sport: the need for change? // *Br. J. Sports Med.* 1991. V.25(1). P.17-20. doi: 10.1136/bjism.25.1.17.
33. Ferris E.A. Gender verification testing in sport // *Br. Med. Bull.* 1992. V.48(3). P.683-97. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072571.
34. Finch J.L., Hope R.M., van Daal A. Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR) // *Sci. Justice.* 1996. V.36(2). P.93-5. doi: 10.1016/S1355-0306(96)72572-8.
35. Fukushima H., Hasekura H., Nagai K. Identification of male bloodstains by dot hybridization of human Y chromosome-specific deoxyribonucleic acid (DNA) probe // *J. Forensic Sci.* 1988. V.33(3). P.621-7.
36. George R., Sriram G., Saraswathi Tr., Sivapathasundharam B. Isolation of epithelial cells from acrylic removable dentures and gender identification by amplification of SRY gene using real time PCR // *J. Forensic Dent. Sci.* 2010. V.2(1). P.32-6. doi: 10.4103/0974-2948.71055.
37. Gibbon V., Paximadis M., Strkalj G., Ruff P., Sci C.P.F. Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene // *Int. Genet.* 2009. V.3(2). P.74-9. doi:10.1016/j.fsigen.2008.10.007.
38. Gill P. A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe // *Electrophoresis.* 1987. doi: 0173-0835/87/0101-0035.
39. Gold B., Bergeron J., Lachtermacher-Triunfol M., Dean M. Human duplex sex determination PCR // *Biotechniques.* 2001. V.31(1). P.28-30, 32, 35. doi: 10.2144/01311bm03.
40. Haas-Rochholz H., Weiler G. Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test // *Int. J. Legal Med.* 1997. V.110(6). P.312-5. doi: 10.1007/s004140050094.
41. Hanaoka Y., Minaguchi K. Sex determination from blood and teeth by PCR amplification of the alphoid satellite family // *J. Forensic Sci.* 1996. V.41(5).P.855-8.
42. Hedges D.J., Walker J.A., Callinan P.A., Shewale J.G., Sinha S.K., Batzer M.A. Mobile element-based assay for human gender determination // *Anal. Biochem.* 2003. V.312(1). P.77-9. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00430-x.
43. Isaenko M.V., Ivanov P.L. Features of the use of amelogenin test for sex of DNA in the analysis of mixed biological traces // *Sud. Med. Ekspert.* 2000. V. 43(4). P. 33-8.
44. Kashyap V.K., Sahoo S., Sitalaximi T., Trivedi R. Deletions in the Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population // *BMC Med. Genet.* 2006. V.7.P.3. doi: 10.1186/1471-2350-7-37.
45. Kim J.-J., Han B.-G., Lee H.-I., Yoo H.-W., Lee J.-K. Development of SNP-based human identification system // *Int. J. Legal Med.* 2010. V.124(2). P.125-31. doi: 10.1007/s00414-009-0389-9.
46. Kim K.-Y., Kwon Y., Bazarragcha M., Park A.-J., Bang H., Lee W.-B., Lee J., Lee K.-H., Kim B.-J., Kim K. A real-time PCR-based amelogenin Y allele dropout assessment model in gender typing of degraded DNA samples // *Int. J. Legal Med.* 2013. V.127(1). P.55-61. doi: 10.1007/s00414-011-0663-5.
47. Kobayashi R., Nakauchi H., Nakahori Y., Nakagome Y., Matsuzawa S. Sex identification in fresh blood and dried bloodstains by a nonisotopic deoxyribonucleic acid (DNA) analyzing technique // *J. Forensic Sci.* 1988. V.33(3). P.613-20.
48. Kogan S.C., Doherty M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A // *N. Engl. J. Med.* 1987. V.317(16). P.985-90. doi: 10.1056/NEJM198710153171603.
49. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry // *Nature.* 1991. V.351(6322). P.117-21. doi: 10.1038/351117a0.
50. Lattanzi W., Di Giacomo M.C., Lenato G.M., Chimienti G., Voglino G., Resta N., Pepe G., Guanti G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome // *Hum. Genet.* 2005. V.116(5). P.395-401. doi: 10.1007/s00439-004-1238-z.
51. Lau Y.F., Huang J.C., Dozy A.M., Kan Y.W. A rapid screening test for antenatal sex determination // *Lancet.* 1984. V.1(8367). P.14-6. doi: 10.1016/s0140-6736(84)90182-x.
52. Ledwith B.J., Manam S., Nichols W.W., Bradley M.O. Preparation of synthetic tandem-repetitive probes for DNA fingerprinting // *Biotechniques.* 1990. V.9(2). P.149-52.

53. Li S., Feng T., Fu L., Zhenhua L., Chunguang L., Xiaojing Z., Chunling M., Cong B. Pyrosequencing of a short fragment of the amelogenin gene for gender identification // *Mol. Biol. Rep.* 2012. V.39(6). P.6949-57. doi: 10.1007/s11033-012-1522-2.
54. Lin Z., Kondo T., Minamino T., Ohtsui M., Nishigami J., Takayasu T., Sun R., Ohshima T. Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912 // *Forensic Sci. Int.* 1995. V.75(2-3).P.197-205. doi: 10.1016/0379-0738(95)01789-5.
55. Lo Y.-M. D., Wainscoat J.S., Gillmer M.D.G., Patel P., Sampietro M., Fleming K.A. Prenatal sex determination by DNA amplification from material peripheral blood // *The Lancet.* 1989. V. 2(8676). P. 1363-5. doi: 10.1016/s0140-6736(89)91969-7.
56. Luptáková L., Bábelová A., Omelka R., Kolena B., Vondráková M., Bauerová M. Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene // *Forensic Sci. Int.* 2011. V.207(1-3). P.1-5. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.08.012.
57. Ma Y., Kuang J.-Z., Zhang J., Wang G.-M., Wang Y.-J., Jin W.-M., Hou Y.-P. Y chromosome interstitial deletion induced Y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals // *Int. J. Legal Med.* 2012. V.126(5). P. 713-24. doi: 10.1007/s00414-012-0720-8.
58. Maciejewska A., Pawłowski R. A rare mutation in the primer binding region of the Amelogenin X homologue gene // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009. V.3(4). P.265-7. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.01.010.
59. Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin // *Int. J. Legal Med.* 1994. V.106(4). P.190-3. doi: 10.1007/BF01371335.
60. Martínez-Patiño M.J., Vilain E., Bueno-Guerra N. The unfinished race: 30 years of gender verification in sport // *Lancet.* 2016. V.388(10044). P.541-3. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30963-1.
61. Masuyama K., Shoji H., Nakanishi H., Inokuchi S., Adachi N. Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY // *PLoS One.* 2017. V.12(1):e0169348. doi: 10.1371/journal.pone.0169348.
62. Maxeiner S., Sester M., Krasteva-Christ G. Novel human sex-typing strategies based on the autism candidate gene NLGN4X and its male-specific gametologue NLGN4Y // *Biol. Sex Differ.* 2019. V.10(1). P.62. doi:10.1186/s13293-019-0279-x.
63. Mitchell R.J., Kreskas M., Baxter E., Buffalino L., Van Oorschot R.A.H. An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination // *Ann. Hum. Biol.* 2006. V.33(2). P.227-40. doi: 10.1080/03014460600594620.
64. Mohammed F., Tayel S.M. Sex identification of normal persons and sex reverse cases from bloodstains using FISH and PCR // *J. Clin. Forensic Med.* 2005. V.12(3). P.122-7. doi: 10.1016/j.jcfm.2004.08.007.
65. Morikawa T., Yamamoto Y., Miyaishi S. 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.* 2011 V.65(2). P.113-22. doi: 10.18926/AMO/45270.
66. Mukerjee S., Mukherjee M., Ghosh T., Kalpana D., Sharma A.K. Differential pattern of genetic variability at the DXYS156 locus on homologous regions of X and Y chromosomes in Indian population and its forensic implications // *Int. J. Legal Med.* 2013. V.127(1). P.1-6. doi: 10.1007/s00414-011-0646-6.
67. Naik P.R., Das Acath D., Sharma G.H., Navalkar A.R. Viability of Human Dental Pulp in Determination of Sex of an Individual by Identifying SRY Gene through DNA Analysis: A Single Blind Pilot Study // *Med. Radiol.* 2012. V. 24(2)/ P. 133-136.
68. Naito E., Dewa K., Yamanouchi H., Kominami R. Sex typing of forensic DNA samples using male- and female-specific probes // *J. Forensic Sci.* 1994. V.39(4). P.1009-17.
69. Naito E., K Dewa, Yamanouchi H., Takagi S., Kominami R. Sex determination using the hypomethylation of a human macro-satellite DXZ4 in female cells // *Nucleic Acids Res.* 1993. V.21(10). P.2533-4. doi: 10.1093/nar/21.10.2533.
70. Nakahori Y., Hamono K., Iwaya M., Nakagome Y. Sex identification by Polymerase Chain Reaction Using X-Y Homologous Primer // *Am. J. Med. Genet.* 1999. V.39(4). P.472-3. doi: 10.1002/ajmg.1320390420.
71. Nakahori Y., Mitani K., Yamada M., Nakagome Y. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides // *Nucleic Acids Res.* 1986. V.14(19). P.7569-80. doi: 10.1093/nar/14.19.7569.
72. Nakahori Y., Takenaka O., Nakagome Y. A human X-Y homologous region encodes "amelogenin" // *Genomics.* 1991. V.9(2). P.264-9 doi: 10.1016/0888-7543(91)90251-9.
73. Nakanishi H., Shoji H., Ohmori T., Hara M., Takada A., Adachi N., Saito K. A novel method for sex determination by detecting the number of X

- chromosomes // *Int. J. Legal Med.* 2015. V.129(1). P.23-9. doi: 10.1007/s00414-014-1065-2.
74. Neeser D., Liechti-Gallati S. Sex determination of forensic samples by simultaneous PCR amplification of alpha-satellite DNA from both the X and Y chromosomes // *J. Forensic Sci.* 1995. V.40(2). P.239-41.
  75. Nicklas J.A., Buel E. Simultaneous determination of total human and male DNA using a duplex real-time PCR assay // *J. Forensic Sci.* 2006. V.51(5). P.1005-15. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00211.x.
  76. Njoroge S.K., Witek M.A., Hupert M.L., Soper S.A. Microchip electrophoresis of Alu elements for gender determination and inference of human ethnic origin // *Electrophoresis.* 2010. V.31(6). P.981-90. doi: 10.1002/elps.200900641.
  77. Nogami H., Tsutsumi H., Komuro T., Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V.2(4). P.349-53. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.05.001.
  78. Norby S., Eriksen B. Sex identification of forensic samples using PCR analysis for the presence of Y-chromosome specific DNA sequences, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.* 1992. doi: 10.1007/978-3-642-77324-2\_8.
  79. Page D.C., Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M., Mardon G., Pollack J., de la Chapelle B.M.A., Brown L.G. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein // *Cell.* 1987. V.51(6).P.1091-104. doi: 10.1016/0092-8674(87)90595-2.
  80. Palmirotta R., Verginelli F., Tota G.D., Battista P., Cama A., Caramiello S., Capasso L., Mariani-Costantini R. Use of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in the Sex Typing of DNA Extracted from Archaeological Bone // *Int. J. Osteoarchaeol.* 1997. doi: 1047-482x/97/060605-05.
  81. Pascal O., Aubert D., Gilbert E., Moisan J.P. Sexing of forensic samples using PCR // *Int. J. Legal Med.* 1991. V.104(4) P. 205-7. doi: 10.1007/BF01369808.
  82. Pfitzinger H., Ludes B., Mangin P. Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence // *Int. J. Leg. Med.* 1993. V.105(4). P.213-6. doi:10.1007/BF01642796.
  83. Reddy V.S.A., Sriram G., Saraswathi Tr., Sivapathasundharam B. Isolation of epithelial cells from tooth brush and gender identification by amplification of SRY gene // *J. Forensic Dent. Sci.* 2011. V.3(1). P.27-32. doi: 10.4103/0975-1475.85293.
  84. Reynolds R., Gender J.V. determination of forensic samples using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences // *J. Forensic Sci.* 1996. V.41(2). P.279-86.
  85. Roccazzello A.M, Tringali G., Barbaro A., Cormaci P., Barbaro A., Insirello E. Simultaneous estimation of a Y-specific fragment, an X-specific fragment and sex determination of forensic studies in real-time PCR // *Forensic Sci. Int.* 2004. V.146. S165-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.050.
  86. Roffey P.E. , Eckhoff C.I., Kuhl J.L. A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications // *J. Forensic Sci.* 2000. V.45(5). P.1016-9.
  87. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988. V.239(4839). P.487-491. DOI: 10.1126/science.239.4839.487
  88. Salido E.C., Yen P.H., Koprivnikar K., Yu L.C., Shapiro L.J. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V.50(2). P.303-16.
  89. Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests // *Nat. Genet.* 1998. V.18(2). P.103. doi: 10.1038/ng0298-103.
  90. Schneider-Gädicke A., Beer-Romero P., Brown L.G., Nussbaum R., Page D.C. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation // *Cell.* 1989. V.57(7). P.1247-58. doi: 10.1016/0092-8674(89)90061-5.
  91. Serrat A., Garcia de Herreros A. Gender verification in sports by PCR amplification of SRY and DYZ1 Y chromosome specific sequences: presence of DYZ1 repeat in female athletes // *Br. J. Sports Med.* 1996. V.30(4). P.310-2. doi: 10.1136/bjbm.30.4.310.
  92. Serrat A., Garcia de Herreros A. Determination of genetic sex by PCR amplification of Y-chromosome-specific sequences // *Lancet.* 1993. V.341(8860). P.1593. doi: 10.1016/0140-6736(93)90728-y.
  93. Shadrach B., Commane M., Hren C., Warshawsky I. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification // *J. Mol. Diagn.* 2004. V.6(4). P.401-5. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60538-7.
  94. Shinka T., Naroda T., Tamura T., Sasahara K., Nakahori Y. A rapid and simple method for sex identification by heteroduplex analysis, using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) // *J. Hum. Genet.* 2001. V.46(5).P.263-6. doi: 10.1007/s100380170076.
  95. Simpson J.L., Ljungqvist A., Ferguson-Smith M.A., de la Chapelle A., Elsas L.J., Ehrhardt A.A., Genel M., Ferris E.A., Carlson A. Gender verification in the Olympics // *JAMA.* 2000. V.284(12). P.1568-9. doi: 10.1001/jama.284.12.1568.
  96. Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf

- A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif // *Nature*. 1990. V.346(6281). P.240-4. doi: 10.1038/346240a0.
97. Stacks B., Witte M.M. 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.* 1996. V.41(2). P.287-90.
98. Stalvey J.R., Erickson R.P. An improved method for detecting Y chromosomal DNA // *Hum. Genet.* 1987. V.76(3). P.240-3. doi: 10.1007/BF00283615.
99. Stazio M. Di., Collesi C., Vozzi D., Wei L., Myers M., Morgan A., Adamo D Adamo P., Giorgia G., Rubinato E., Giacca M., Gasparini P. TBL1Y: a new gene involved in syndromic hearing loss // *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V.27(3). P. 466-474. doi: 10.1038/s41431-018-0282-4.
100. Steinlechner M., Berger B., Niederstätter H., Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test // *Int. J. Legal Med.* 2002. V.116(2). P.117-20. doi: 10.1007/s00414-001-0264-9.
101. Stone A.C., Milner G.R., Pääbo S., Stoneking M. Sex determination of ancient human skeletons using DNA // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996. V.99(2). P.231-8. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1.
102. Sullivan K.M., Mannucci A., Kimpton C.P., Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin // *Biotechniques*. 1993. V.15(4). P.636-8, 640-1.
103. Thangaraj K., Reddy A.G., Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? // *Int. J. Legal Med.* 2002. V.116(2). P.21-3. doi: 10.1007/s00414-001-0262-y.
104. Torres-Rodríguez M., Martínez-Cortés G., Páez-Riberos L.A., Sandoval L., Muñoz-Valle J.F., Ceballos-Quintal J.M., Pinto-Escalante D., Rangel-Villalobos H. Forensic potential of the STR DXYS156 in Mexican populations: inference of X-linked allele null // *Legal Med. (Tokyo)*. 2006. V.8(1). P.52-4. doi: 10.1016/j.legalmed.2005.08.003.
105. Tozzo P., Giuliadori A., Corato S., Ponzano E., Rodriguez D., Caenazzo L. Affiliations expand Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: literature revision and description of a novel method for sex confirmation // *J. Forensic Leg. Med.* 2013. V.20(5). P.387-91. doi:10.1016/j.jflm.2013.03.012.
106. Tschentscher F., Frey U.H., Bajanowski T. Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR product // *Int. J. Legal Med.* 2008. V.122(4). P.333-5. doi:10.1007/s00414-008-0228-4.
107. Tyler M.G., Kirby L.T., Wood S., Vernon S., Ferris J.A. Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA techniques // *Forensic Sci. Int.* 1986. V.31(4). P.267-72. doi: 10.1016/0379-0738(86)90166-0.
108. Walker J.A., Hedges D.J., Perodeau B.P., Landry K.E., Stoilova N., Laborde M.E., Shewale J., Sinha S.K., Batzer M.A. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification // *Anal. Biochem.* 2005. V.337(1). P.89-9. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.036.
109. Wilson J.F., Erlandsson R. Sexing of human and other primate DNA // *Biol. Chem.* 1998. V.379(10). P.1287-8.
110. Witt M., Erickson R.P. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction // *Hum. Genet.* 1991 V.86(5). P.540. doi: 10.1007/BF00194654.
111. Yokoi T., Sagisaka K. Sex determination of blood stains with a recombinant DNA probe: comparison with radioactive and non-radioactive labeling methods // *Forensic Sci. Int.* 1989.V.41(1-2). P.117-24. doi: 10.1016/0379-0738(89)90243-0.
112. Zemszkova E.Yu., Frolova S.A., Sleptsova Zh.V., Ivanov P.L. Study of the species specificity of the amylogenin system for establishing the genetic sex // *Sud. Med. Ekspert.* 2003. V. 46(4). P.19-22.
113. Zoledziewska M., Dobosz T. Gender determination in highly degraded DNA samples // *Int. Congress series.* 2003. doi: s0531-5131(02)00565-4.

#### References

1. Aasen E., Medrano J.F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology (N.Y)*. 1990. V.8(12). P.1279-81. doi: 10.1038/nbt1290-1279.
2. Abebe M., Brauner P. Erroneous gender identification by the amelogenin sex test. *J. Forensic Sci.* 2004. V.49(2) .P.258-9.
3. Acién P, Acién M. Disorders of Sex Development: Classification, Review, and Impact on Fertility. *J Clin Med.* 2020. V.9(11):3555. doi: 10.3390/jcm9113555
4. Aghanoori M.R., Vafaei H., Kavoshi H., Mohamadi S., Goodarzi H.R. Sex determination using free fetal DNA at early gestational ages: a comparison between a modified mini-STR genotyping method and real-time PCR. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012. V.207(3). P.202. e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2012.06.026.
5. Akane A., Seki S., Shiono H., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M., Matsubara K., Nakahori Y., Nagafuchi S., Nakagome Y. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-



- Y homologous gene. *Forensic Sci. Int.* 1992. V.52(2). P.143-8. doi: 10.1016/0379-0738(92)90102-3.
6. Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., S Seki, Nagafuchi S., Yamada M., Nakagome Y. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Sci. Int.* 1991. V.49(1). P.81-8. doi: 10.1016/0379-0738(91)90174-h.
  7. Allen C.K.C., Zhang J., Hui A.B.Y., Wong N., Lau T.K., Leung T.N., Lo K.-W., Huang D.W.S., Dennis Lo Y.M. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 2004. V.50(1). P. 88-92. doi: 10.1373/clinchem.2003.024893.
  8. Allwood J.S., Harbison S.A. "YFlag"--a single-base extension primer based method for gender determination. *J. Forensic Sci.* 2015. V.60(1). P.142-6. doi: 10.1111/1556-4029.12553.
  9. Alonso A., Martín P. A real-time PCR protocol to determine the number of amelogenin (X-Y) gene copies from forensic DNA samples. *Methods Mol. Biol.* 2005. V.297. P.31-44. doi: 10.1385/1-59259-867-6:031.
  10. Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., García O., Fernández de Simón L., García-Hirschfeld J., Sancho M., de La Rúa C., Fernández-Piqueras J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci. Int.* 2004. V.139(2-3). P.141-9. doi: 10.1016/j.forsciint.2003.10.008.
  11. Anisimov V.A., Garafutdinov R.R., Sagitov A.M., Sakhabutdinova A.R., Khusnutdinova E.K., Aminev F.G., Chemeris A.V. DNA forensics – the origin, present state and future prospects. *Biomics.* 2019. V.11(3). P. 282-314. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-26 (In Russian)
  12. Blagodatskikh E.G., Nikitin A.G., Seregin Yu.A., Blagodatskikh K.A., Nosikov V.V. DYS14 marker and sex determination using biological samples. *Mol. Biol. (Mosk).* 2010. V. 44(4). P. 646-9.
  13. Borovko S., Shyla A., Korban V., Borovko A. Amelogenin test abnormalities revealed in Belarusian population during forensic DNA analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015. V.15. P.98-104. doi:10.1016/j.fsigen.2014.10.014.
  14. Brinkmann B. Is the amelogenin sex test valid? *Int. J. Legal Med.* 2002. V. 116(2). P.63. doi: 10.1007/s00414-001-0263-x.
  15. Butler E., Li R. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. *J. Forens. Invest.* 2014. V.2(3).
  16. Cali F., Forster P., Kersting C., Mirisola M.G., D'Anna R., De Leo G., Romano V. DXYS156: a multi-purpose short tandem repeat locus for determination of sex, paternal and maternal geographic origins and DNA fingerprinting. *Int. J. Legal. Med.* 2002. V.116(3). P.33-8. doi: 10.1007/s00414-001-0272-9.
  17. Chemeris D.A., Garafutdinov R.R., Sagitov A.M., Sagitova M.A., Mikhailenko K.I., Zubov V.V., Vasilov R.G., Slominsky P.A., Anisimov V.A., Khusnutdinova E.K., Alekseev Ya.I., Kurochkin V.A., Lavrov G.S., Vorobev A.A., Aminev F.G., Chemeris A.V. Microdiplotypes as a new markers for DNA identification. *Biomics.* 2020. V. 12(2). P. 300-317. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs. 2020-17 (In Russian)
  18. Chen H., Lowther W., Avramopoulos D., Antonarakis S.E. Homologous loci DXYS156X and DXYS156Y contain a polymorphic pentanucleotide repeat (TAAAA)<sub>n</sub> and map to human X and Y chromosomes. *Hum. Mutat.* 1994. V.4(3). P.208-11. doi: 10.1002/humu.1380040306.
  19. Choi S.K., Kim J.W., Park S.Y., Kim Y.M., Kim J.M., Ryu H.M., Yang J.S., Yoon S.R. Retroactive DNA analysis for sex determination and dystrophin gene by polymerase chain reaction with archived cytogenetic slides. *Exp. Mol. Med.* 1999. V.31(1). P.36-41. doi: 10.1038/emm.1999.6.
  20. Cooke H. Repeated sequence specific to human males. *Nature.* 1976. V. 262(5565). P.182-6. doi:10.1038/262182a0.
  21. Cui K.H., Warnes G.M., Jeffrey R., Matthews C.D. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet.* 1994. V.343(8889). P.79-82. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90815-x.
  22. Davis C., Illescas M., Tirado C., Lopez R., Budowle B., Dawson Cruz T. A case of Amelogenin Y-null: a simple primer binding site mutation or unusual genetic anomaly? *Leg. Med. (Tokyo).* 2012. V.14(6). P.320-3. doi: 10.1016/j.legalmed.2012.05.002.
  23. Dobosy J.R., Rose S.D., Beltz K.R., Rupp S.M., Powers K.M., Behlke M.A., Walder J.A. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. *BMC Biotechnol.* 2011. V.11. P.80. doi: 10.1186/1472-6750-11-80.
  24. Drobic K. A new primer set in a SRY gene for sex identification. *Int. Congress Series.* 2006. doi: 10.1016/j.isc.2005/08/020.
  25. Ebensperger C., Studer R., Epplen J.Y. Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man. *Hum. Genet.* 1989. V.82(3). P.289-90. doi: 10.1007/BF00291174.
  26. Elsas L.J., Ljungqvist A., Ferguson-Smith M.A., Simpson J.L., Genel M., Carlson A.S., Ferris E., de la Chapelle A., Ehrhardt A.A. Gender verification of

- female athletes. *Genet. Med.* 2000. V.2(4). P.249-54. doi: 10.1097/00125817-200007000-00008.
27. Faerman M., Filon D., Kahila G., Greenblatt C.L., Smith P., Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene.* 1995. V.167(1-2). P.327-32. doi: 10.1016/0378-1119(95)00697-4.
  28. Falconi M., Pelotti S., Pappalardo G. A method for sex assignment in mixed samples. *Hum. Genet.* 2001. V.108(3). P.267-8. doi: 10.1007/s004390100478.
  29. Fattorini P., Cacció S., Gustincich S., Wolfe J., Altamura B.M., Graziosi G. Sex determination and species exclusion in forensic samples with probe cY97. *Int. J. Legal Med.* 1991. V.104(5). P. 247-50. doi: 10.1007/BF01369578.
  30. Fattorini P., Cacció S., Gustincih S., Florian F., Altamura B.M., Graziosi G. Sex identification by polymerase chain reaction of alpha-satellite in aged tissue samples. *Electrophoresis.* 1993. V.14(1-2). P.23-6. doi: 10.1002/elps.1150140105.
  31. Fazi A., Gobeski B., Foran D. Development of two highly sensitive forensic sex determination assays based on human DYZ1 and Alu repetitive DNA elements. *Electrophoresis.* 2014. V.35(21-22). P.3028-35. doi: 10.1002/elps.201400103.
  32. Ferguson-Smith M.A., Ferris E.A. Gender verification in sport: the need for change? *Br. J. Sports Med.* 1991. V.25(1). P.17-20. doi: 10.1136/bjism.25.1.17.
  33. Ferris E.A. Gender verification testing in sport. *Br. Med. Bull.* 1992. V.48(3). P.683-97. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a072571.
  34. Finch J.L., Hope R.M., van Daal A. Human sex determination using multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Sci. Justice.* 1996. V.36(2). P.93-5. doi: 10.1016/S1355-0306(96)72572-8.
  35. Fukushima H., Hasekura H., Nagai K. Identification of male bloodstains by dot hybridization of human Y chromosome-specific deoxyribonucleic acid (DNA) probe. *J. Forensic Sci.* 1988. V.33(3). P.621-7.
  36. George R., Sriram G., Saraswathi Tr., Sivapathasundharam B. Isolation of epithelial cells from acrylic removable dentures and gender identification by amplification of SRY gene using real time PCR. *J. Forensic Dent. Sci.* 2010. V.2(1). P.32-6. doi: 10.4103/0974-2948.71055.
  37. Gibbon V., Paximadis M., Strkalj G., Ruff P., Sci C.P.F. Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Int. Genet.* 2009. V.3(2). P.74-9. doi:10.1016/j.fsigen.2008.10.007.
  38. Gold B., Bergeron J., Lachtermacher-Triunfol M., Dean M. Human duplex sex determination PCR. *Biotechniques.* 2001. V.31(1). P.28-30, 32, 35. doi: 10.2144/01311bm03.
  39. Haas-Rochholz H., Weiler G. Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test. *Int. J. Legal Med.* 1997. V.110(6). P.312-5. doi: 10.1007/s004140050094.
  40. Hanaoka Y., Minaguchi K. Sex determination from blood and teeth by PCR amplification of the alphoid satellite family. *J. Forensic Sci.* 1996. V.41(5).P.855-8.
  41. Hedges D.J., Walker J.A., Callinan P.A., Shewale J.G., Sinha S.K., Batzer M.A. Mobile element-based assay for human gender determination. *Anal. Biochem.* 2003. V.312(1). P.77-9. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00430-x.
  42. Isaenko M.V., Ivanov P.L. Features of the use of amelogenin test for sex of DNA in the analysis of mixed biological traces. *Sud. Med. Ekspert.* 2000. V. 43(4). P. 33-8.
  43. Kashyap V.K., Sahoo S., Sitalaximi T., Trivedi R. Deletions in the Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population. *BMC Med. Genet.* 2006. V.7.P.3. doi: 10.1186/1471-2350-7-37.
  44. Kim J.-J., Han B.-G., Lee H.-I., Yoo H.-W., Lee J.-K. Development of SNP-based human identification system. *Int. J. Legal Med.* 2010. V.124(2). P.125-31. doi: 10.1007/s00414-009-0389-9.
  45. Kim K.-Y., Kwon Y., Bazarragcha M., Park A.-J., Bang H., Lee W.-B., Lee J., Lee K.-H., Kim B.-J., Kim K. A real-time PCR-based amelogenin Y allele dropout assessment model in gender typing of degraded DNA samples. *Int. J. Legal Med.* 2013. V.127(1). P.55-61. doi: 10.1007/s00414-011-0663-5.
  46. Kobayashi R., Nakauchi H., Nakahori Y., Nakagome Y., Matsuzawa S. Sex identification in fresh blood and dried bloodstains by a nonisotopic deoxyribonucleic acid (DNA) analyzing technique. *J. Forensic Sci.* 1988. V.33(3). P.613-20.
  47. Kogan S.C., Doherty M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 1987. V.317(16). P.985-90. doi: 10.1056/NEJM198710153171603.
  48. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991. V.351(6322). P.117-21. doi: 10.1038/351117a0.
  49. Lattanzi W., Di Giacomo M.C., Lenato G.M., Chimienti G., Voglino G., Resta N., Pepe G., Guanti G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Hum. Genet.* 2005. V.116(5). P.395-401. doi: 10.1007/s00439-004-1238-z.

50. Lau Y.F., Huang J.C., Dozy A.M., Kan Y.W. A rapid screening test for antenatal sex determination. *Lancet*. 1984. V.1(8367). P.14-6. doi: 10.1016/s0140-6736(84)90182-x.
51. Ledwith B.J., Manam S., Nichols W.W., Bradley M.O. Preparation of synthetic tandem-repetitive probes for DNA fingerprinting. *Biotechniques*. 1990. V.9(2). P.149-52.
52. Li S., Feng T., Fu L., Zhenhua L., Chunguang L., Xiaojing Z., Chunling M., Cong B. Pyrosequencing of a short fragment of the amelogenin gene for gender identification. *Mol. Biol. Rep.* 2012. V.39(6). P.6949-57. doi: 10.1007/s11033-012-1522-2.
53. Lin Z., Kondo T., Minamino T., Ohtsuji M., Nishigami J., Takayasu T., Sun R., Ohshima T. Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. *Forensic Sci. Int.* 1995. V.75(2-3). P.197-205. doi: 10.1016/0379-0738(95)01789-5.
54. Lo Y.-M. D., Wainscoat J.S., Gillmer M.D.G., Patel P., Sampietro M., Fleming K.A. Prenatal sex determination by DNA amplification from material peripheral blood. *The Lancet*. 1989. V. 2(8676). P. 1363-5. doi: 10.1016/s0140-6736(89)91969-7.
55. Luptáková L., Babelová A., Omelka R., Kolena B., Vondráková M., Bauerová M. Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene. *Forensic Sci. Int.* 2011. V.207(1-3). P.1-5. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.08.012.
56. Ma Y., Kuang J.-Z., Zhang J., Wang G.-M., Wang Y.-J., Jin W.-M., Hou Y.-P. Y chromosome interstitial deletion induced Y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals. *Int. J. Legal Med.* 2012. V.126(5). P. 713-24. doi: 10.1007/s00414-012-0720-8.
57. Maciejewska A., Pawłowski R. A rare mutation in the primer binding region of the Amelogenin X homologue gene. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009. V.3(4). P.265-7. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.01.010.
58. Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.* 1994. V.106(4). P.190-3. doi: 10.1007/BF01371335.
59. Martínez-Patiño M.J., Vilain E., Bueno-Guerra N. The unfinished race: 30 years of gender verification in sport. *Lancet*. 2016. V.388(10044). P.541-3. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30963-1.
60. Masuyama K., Shojo H., Nakanishi H., Inokuchi S., Adachi N. Sex Determination from Fragmented and Degenerated DNA by Amplified Product-Length Polymorphism Bidirectional SNP Analysis of Amelogenin and SRY. *Genes PLoS One*. 2017. V.12(1):e0169348. doi: 10.1371/journal.pone.0169348.
61. Maxeiner S., Sester M., Krasteva-Christ G. Novel human sex-typing strategies based on the autism candidate gene NLGN4X and its male-specific gametologue NLGN4Y. *Biol. Sex Differ.* 2019. V.10(1). P.62. doi:10.1186/s13293-019-0279-x.
62. Mitchell R.J., Kreskas M., Baxter E., Buffalino L., Van Oorschot R.A.H. An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination. *Ann. Hum. Biol.* 2006. V.33(2). P.227-40. doi: 10.1080/03014460600594620.
63. Mohammed F., Tayel S.M. Sex identification of normal persons and sex reverse cases from bloodstains using FISH and PCR. *J. Clin. Forensic Med.* 2005. V.12(3). P.122-7. doi: 10.1016/j.jcfm.2004.08.007.
64. Morikawa T., Yamamoto Y., Miyaishi S. 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*. 2011 V.65(2). P.113-22. doi: 10.18926/AMO/45270.
65. Mukerjee S., Mukherjee M., Ghosh T., Kalpana D., Sharma A.K. Differential pattern of genetic variability at the DXYS156 locus on homologous regions of X and Y chromosomes in Indian population and its forensic implications. *Int. J. Legal Med.* 2013. V.127(1). P.1-6. doi: 10.1007/s00414-011-0646-6.
66. Naik P.R., Das Acath D., Sharma G.H., Navalkar A.R. Viability of Human Dental Pulp in Determination of Sex of an Individual by Identifying SRY Gene through DNA Analysis: A Single Blind Pilot Study. *Med. Radiol.* 2012. V. 24(2)/P. 133-136.
67. Naito E., Dewa K., Yamanouchi H., Kominami R. Sex typing of forensic DNA samples using male- and female-specific probes. *J. Forensic Sci.* 1994. V.39(4). P.1009-17.
68. Naito E., K Dewa, Yamanouchi H., Takagi S., Kominami R. Sex determination using the hypomethylation of a human macro-satellite DXZ4 in female cells. *Nucleic Acids Res.* 1993. V.21(10). P.2533-4. doi: 10.1093/nar/21.10.2533.
69. Nakahori Y., Hamono K., Iwaya M., Nakagome Y. Sex identification by Polymerase Chain Reaction Using X-Y Homologous Primer. *Am. J. Med. Genet.* 1999. V.39(4). P.472-3. doi: 10.1002/ajmg.1320390420.
70. Nakahori Y., Mitani K., Yamada M., Nakagome Y. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1986. V.14(19). P.7569-80. doi: 10.1093/nar/14.19.7569.

71. Nakahori Y., Takenaka O., Nakagome Y. A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics*. 1991. V.9(2). P.264-9 doi: 10.1016/0888-7543(91)90251-9.
72. Nakanishi H., Shojo H., Ohmori T., Hara M., Takada A., Adachi N., Saito K. A novel method for sex determination by detecting the number of X chromosomes. *Int. J. Legal Med.* 2015. V.129(1). P.23-9. doi: 10.1007/s00414-014-1065-2.
73. Neeser D., Liechti-Gallati S. Sex determination of forensic samples by simultaneous PCR amplification of alpha-satellite DNA from both the X and Y chromosomes. *J. Forensic Sci.* 1995. V.40(2). P.239-41.
74. Nicklas J.A., Buel E. Simultaneous determination of total human and male DNA using a duplex real-time PCR assay. *J. Forensic Sci.* 2006. V.51(5). P.1005-15. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00211.x.
75. Njoroge S.K., Witek M.A., Hupert M.L., Soper S.A. Microchip electrophoresis of Alu elements for gender determination and inference of human ethnic origin. *Electrophoresis*. 2010. V.31(6). P.981-90. doi: 10.1002/elps.200900641.
76. Nogami H., Tsutsumi H., Komuro T., Mukoyama R. Rapid and simple sex determination method from dental pulp by loop-mediated isothermal amplification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008. V.2(4). P.349-53. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.05.001.
77. Norby S., Eriksen B. Sex identification of forensic samples using PCR analysis for the presence of Y-chromosome specific DNA sequences, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 1992. doi: 10.1007/978-3-642-77324-2\_8.
78. Page D.C., Mosher R., Simpson E.M., Fisher E.M., Mardon G., Pollack J., de la Chapelle B.M.A., Brown L.G. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*. 1987. V.51(6).P.1091-104. doi: 10.1016/0092-8674(87)90595-2.
79. Palmirotta R., Verginelli F., Tota G.D., Battista P., Cama A., Caramiello S., Capasso L., Mariani-Costantini R. Use of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in the Sex Typing of DNA Extracted from Archaeological Bone. *Int. J. Osteoarchaeol.* 1997. doi: 1047-482x/97/060605-05.
80. Pascal O., Aubert D., Gilbert E., Moisan J.P. Sexing of forensic samples using PCR. *Int. J. Legal Med.* 1991. V.104(4) P. 205-7. doi: 10.1007/BF01369808.
81. Gill P. A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe. *Electrophoresis*. 1987. doi: 0173-0835/87/0101-0035.
82. Pfitzinger H., Ludes B., Mangin P. Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *Int. J. Leg. Med.* 1993. V.105(4). P.213-6. doi:10.1007/BF01642796.
83. Reddy V.S.A., Sriram G., Saraswathi Tr., Sivapathasundharam B. Isolation of epithelial cells from tooth brush and gender identification by amplification of SRY gene. *J. Forensic Dent. Sci.* 2011. V.3(1). P.27-32. doi: 10.4103/0975-1475.85293.
84. Reynolds R., Gender J.V. determination of forensic samples using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences. *J. Forensic Sci.* 1996. V.41(2). P.279-86.
85. Roccazzello A.M, Tringali G., Barbaro A., Cormaci P., Barbaro A., Insirello E. Simultaneous estimation of a Y-specific fragment, an X-specific fragment and sex determination of forensic studies in real-time PCR. *Forensic Sci. Int.* 2004. V.146. S165-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.050.
86. Roffey P.E. , Eckhoff C.I., Kuhl J.L. A rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *J. Forensic Sci.* 2000. V.45(5). P.1016-9.
87. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. V.239(4839). P.487-491. DOI: 10.1126/science.239.4839.487
88. Salido E.C., Yen P.H., Koprivnikar K., Yu L.C., Shapiro L.J. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V.50(2). P.303-16.
89. Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C. Reliability of DNA-based sex tests. *Nat. Genet.* 1998. V.18(2). P.103. doi: 10.1038/ng0298-103.
90. Schneider-Gädicke A., Beer-Romero P., Brown L.G., Nussbaum R., Page D.C. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*. 1989. V.57(7). P.1247-58. doi: 10.1016/0092-8674(89)90061-5.
91. Serrat A., García de Herreros A. Gender verification in sports by PCR amplification of SRY and DYZ1 Y chromosome specific sequences: presence of DYZ1 repeat in female athletes. *Br. J. Sports Med.* 1996. V.30(4). P.310-2. doi: 10.1136/bjism.30.4.310.
92. Serrat A., García de Herreros A. Determination of genetic sex by PCR amplification of Y-chromosome-specific sequences. *Lancet*. 1993. V.341(8860). P.1593. doi: 10.1016/0140-6736(93)90728-y.
93. Shadrach B., Commane M., Hren C., Warshawsky I. A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender

- identification. *J. Mol. Diagn.* 2004. V.6(4). P.401-5. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60538-7.
94. Shinka T., Naroda T., Tamura T., Sasahara K., Nakahori Y. A rapid and simple method for sex identification by heteroduplex analysis, using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *J. Hum. Genet.* 2001. V.46(5).P.263-6. doi: 10.1007/s100380170076.
  95. Simpson J.L., Ljungqvist A., Ferguson-Smith M.A., de la Chapelle A., Elsas L.J., Ehrhardt A.A., Genel M., Ferris E.A., Carlson A. Gender verification in the Olympics. *JAMA.* 2000. V.284(12). P.1568-9. doi: 10.1001/jama.284.12.1568.
  96. Sinclair A.H., Berta P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow P.N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990. V.346(6281). P.240-4. doi: 10.1038/346240a0.
  97. Stacks B., Witte M.M. 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.* 1996. V.41(2). P.287-90.
  98. Stalvey J.R., Erickson R.P. An improved method for detecting Y chromosomal DNA. *Hum. Genet.* 1987. V.76(3). P.240-3. doi: 10.1007/BF00283615.
  99. Stazio M. Di., Collesi C., Vozzi D., Wei L., Myers M., Morgan A., Adamo D Adamo P., Giorgia G., Rubinato E., Giacca M., Gasparini P. TBL1Y: a new gene involved in syndromic hearing loss. *Eur. J. Hum. Genet.* 2019. V.27(3). P. 466-474. doi: 10.1038/s41431-018-0282-4.
  100. Steinlechner M., Berger B., Niederstätter H., Parson W. Rare failures in the amelogenin sex test. *Int. J. Legal Med.* 2002. V.116(2). P.117-20. doi: 10.1007/s00414-001-0264-9.
  101. Stone A.C., Milner G.R., Pääbo S., Stoneking M. Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1996. V.99(2). P.231-8. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1.
  102. Sullivan K.M., Mannucci A., Kimpton C.P., Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques.* 1993. V.15(4). P.636-8, 640-1.
  103. Thangaraj K., Reddy A.G, Singh L. Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int. J. Legal Med.* 2002. V.116(2). P.21-3. doi: 10.1007/s00414-001-0262-y.
  104. Torres-Rodríguez M., Martínez-Cortes G., Páez-Riberos L.A., Sandoval L., Muñoz-Valle J.F., Ceballos-Quintal J.M., Pinto-Escalante D., Rangel-Villalobos H. Forensic potential of the STR DXYS156 in Mexican populations: inference of X-linked allele null. *Legal Med. (Tokyo).* 2006. V.8(1). P.52-4. doi: 10.1016/j.legalmed.2005.08.003.
  105. Tozzo P., Giuliodori A., Corato S., Ponzano E., Rodriguez D., Caenazzo L. Affiliations expand Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: literature revision and description of a novel method for sex confirmation. *J. Forensic Leg. Med.* 2013. V.20(5). P.387-91. doi:10.1016/j.jflm.2013.03.012.
  106. Tschentscher F., Frey U.H., Bajanowski T. Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR product. *Int. J. Legal Med.* 2008. V.122(4). P.333-5. doi:10.1007/s00414-008-0228-4.
  107. Tyler M.G., Kirby L.T., Wood S., Vernon S., Ferris J.A. Human blood stain identification and sex determination in dried blood stains using recombinant DNA techniques. *Forensic Sci. Int.* 1986. V.31(4). P.267-72. doi: 10.1016/0379-0738(86)90166-0.
  108. Walker J.A., Hedges D.J., Perodeau B.P., Landry K.E., Stoilova N., Laborde M.E., Shewale J., Sinha S.K., Batzer M.A. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification. *Anal. Biochem.* 2005. V.337(1). P.89-9. doi: 10.1016/j.ab.2004.09.036.
  109. Wilson J.F., Erlandsson R. Sexing of human and other primate DNA. *Biol. Chem.* 1998. V.379(10). P.1287-8.
  110. Witt M., Erickson R.P. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 1991. V.86(5). P.540. doi: 10.1007/BF00194654.
  111. Yokoi T., Sagisaka K. Sex determination of blood stains with a recombinant DNA probe: comparison with radioactive and non-radioactive labeling methods. *Forensic Sci. Int.* 1989.V.41(1-2). P.117-24. doi: 10.1016/0379-0738(89)90243-0.
  112. Zemskova E.Yu., Frolova S.A., Sleptsova Zh.V., Ivanov P.L. Study of the species specificity of the amylogenin system for establishing the genetic sex. *Sud. Med. Ekspert.* 2003. V. 46(4). P.19-22.
  113. Zoledziewska M., Dobosz T. Gender determination in highly degraded DNA samples. *Int. Congress series.* 2003. doi: s0531-5131(02)00565-4.