

УДК 343.9

*Одобрено и рекомендовано к опубликованию
Редакционно-издательским советом ГУ ЭКЦ МВД России*

Рецензенты: О.Б. Заякин, В.А. Ельков, В.И. Чамов (ЭКУ УВД Алтайского края); Т.Ю. Просвирина (ЭКУ ГУВД Волгоградской обл.).

Авторы: М.Г. Пименов (введение в соавторстве; гл. 5 в соавторстве; заключение в соавторстве); А.Ю. Культин (гл. 1–3; приложение; иллюстрации); С.А. Кондрашов, канд. мед. наук (введение в соавторстве; гл. 4; гл. 5 в соавторстве; заключение в соавторстве).

Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. – М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001. – 144 с., 14 ил., 7 табл., прилож., библиогр.

Изложены молекулярно-генетические механизмы и принципы, лежащие в основе ПЦР-технологии анализа геномной ДНК человека в идентификационных целях. Описаны наиболее распространенные в экспертной практике методы выделения и типирования ДНК. Предложена методика вероятностно-статистической обработки и экспертной оценки полученных результатов. Проанализированы основные требования к заключению эксперта, даны варианты написания его ключевых положений. Рассмотрены основные принципы построения систем генетических учетов, определены наиболее общие подходы к решению проблем организации и формирования банков ДНК на базе ЭКП ОВД России.

Для экспертов-биологов, специализирующихся в области криминалистического ДНК-анализа.

План выпуска литературы ГУ ЭКЦ МВД России, 2001, поз. 4

**Михаил Георгиевич Пименов
Алексей Юрьевич Культин
Сергей Алексеевич Кондрашов**

НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

Учебное пособие

Редактор *Л.К. Бульшева*
Корректоры *Н.В. Кунеева, И.Н. Сорочихина*

Подписано в печать 30.08.2001 г. Формат 60×90 1/16. Печать офсетная.
Печ. л. 9,0. Уч.-изд. 9,1. Тираж 100 экз. Заказ

© ГУ ЭКЦ МВД России, 2001

**Not for sale!!! For preview only !!!
If You like this book - buy it!
Scanned by Mykhaylo (moibiol@ukr.net)**

ВВЕДЕНИЕ

Во второй половине 80-х годов в практику судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств начинают внедряться методы молекулярной генетики, позволяющие проводить идентификационные исследования объектов биологического происхождения. До настоящего времени не было систематизированного учебного пособия для экспертов, посвященного этим вопросам, а в имеющихся публикациях рассматриваются только отдельные проблемы использования метода криминалистического ДНК-анализа.

Главным вопросом судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств был и остается вопрос о происхождении следов с мест происшествий от конкретного лица. Результаты экспертизы обычно сводятся к установлению факта наличия биологического материала (крови, слюны, спермы и др.) в следах и выявлению в них различных групповых факторов.

В середине XIX в. Людвиг Тейхман-Ставларски впервые открыл доказательный метод установления наличия крови в следах с помощью химической реакции (раствора поваренной соли и ледяной уксусной кислоты), а в конце XIX в. немецкие ученые Бунзен и Киргоф разработали надежный метод установления наличия крови с помощью спектроскопии. В то время сам факт установления следов крови на одежде подозреваемого рассматривался как доказательство его вины в совершении преступления. Ученые Флоренс и Фрикон систематизировали виды следов крови в зависимости от механизма их образования, что в совокупности с методом установления наличия крови в этих следах придавало исследованиям большую доказательственную силу. Однако со временем сторона защиты сочла эти факты недостаточными, и судебная медицина стала искать другие способы исследования следов крови.

Очень важно было решить вопрос о происхождении крови (от человека или животного). Первые опыты проводились на жидкой крови, видовую принадлежность которой устанавливали по наличию, размеру и форме ядер в клетках. Однако эти методы не были

пригодны для исследования следов крови. Решить проблему удалось только в 1899 г., когда русский исследователь-патологоанатом Ф.Я. Чистович открыл реакцию преципитации, а П. Уленгут использовал это открытие для установления видовой принадлежности крови. Этот метод начал широко применяться и стал неотъемлемой частью любого исследования при проведении экспертиз следов крови, но и его со временем оказалось недостаточно для доказывания факта принадлежности следов конкретному лицу. Как утверждали адвокаты: *если доказано, что следы крови произошли от человека, то чем эта кровь отличается от крови миллионов других людей, каждый из которых мог оставить эти следы.* И конечно, были абсолютно правы.

Открытие Ландштейнером трех групп крови системы АВ0, а позднее Дунгерном еще одной группы этой системы легло в основу практических экспериментов М. Рихтера в области установления групп крови в следах. Внедрение в практику методики установления групповой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах позволило делать вывод о возможности (или невозможности) происхождения пятен крови от определенного лица. Особенно важным являлось то, что стало возможным исключать происхождение крови от конкретного человека. Совпадение групповой принадлежности имело значение лишь в сумме доказательств, так как нельзя категорично утверждать о происхождении крови именно от данного человека, а не от других лиц с такой же группой крови. Вскоре стало очевидным, что в большинстве случаев четыре группы крови системы АВ0 не дают возможность исключить (или подтвердить) происхождение следов от конкретного человека, поэтому судебные медики искали другие системы групп крови. Так, в 1927 г. в эритроцитах человека были открыты антигены М и N, а позднее в данной системе MN – антигены S и s.

История развития судебно-биологической экспертизы шла по пути «открытия» новых систем, установление которых в биологическом следе и решает вопрос его происхождения от конкретного человека. Однако не все системы имеют равноценное прикладное значение, что зависит от количества признаков, входящих в каждую из них, и распределения этих признаков в различных популяциях. Чем больше систем исследуется в следе, тем с большей долей вероятности можно установить его происхождение, но слишком малые размеры следа и его состояние не позволяют этого сделать.

Революционным достижением, которое принципиально по-новому позволило подойти к проблеме идентификации биологического следа, стало применение методов анализа ДНК [1, 2], позволяющих исследовать непосредственно молекулу ДНК, кодирующую все биологические признаки человека.

В российской криминалистике развитие методов ДНК-анализа (генотипоскопии) началось с 1988 г., когда Государственным комитетом СССР по науке и технике было принято решение об организации лаборатории генотипоскопии на базе Всесоюзного научно-криминалистического центра МВД СССР (ныне ГУ ЭКЦ МВД России). В связи с отсутствием необходимого оборудования и помещений первые опыты были начаты на базе Всесоюзного центра психического здоровья АМН СССР. Там уже проводились исследования ДНК человека для установления причин многих психических заболеваний, таких, как шизофрения, болезнь Альцгеймера и др. В тот период перед экспертами-биологами стояла задача разработать научно обоснованные методики анализа ДНК следов биологического происхождения, изъятых с мест происшествий. В 1990 г. была проведена первая генотипоскопическая экспертиза.

Методы анализа ДНК оказались чрезвычайно интересны для криминалистики, так как ДНК обладает индивидуальной специфичностью (совпадает только у однойцовых близнецов), идентична в любой ядросодержащей клетке организма одного человека и неизменна на протяжении всей его жизни [3]. Одним из главных положительных моментов следует отметить то, что при проведении одного исследования можно установить множество признаков, которые позволяют с большой долей вероятности устанавливать происхождение следа от конкретного лица, а также биологическое родство. Кроме того, использование методов анализа ДНК позволяет устанавливать полную принадлежность исследуемых объектов.

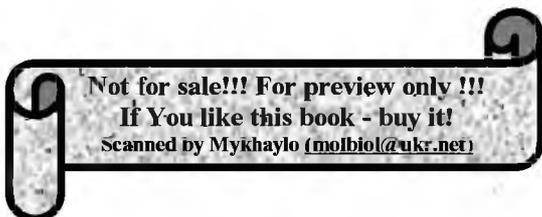
Развитие и совершенствование методов криминалистического ДНК-анализа способствовало тому, что современная технология исследования ДНК позволяет успешно исследовать:

- практически все ткани и биологические жидкости организма человека, содержащие ДНК;
- биологические объекты, загрязненные микрофлорой;
- микроколичества биологического материала (теоретически возможно исследовать ДНК, выделенную из одной клетки);
- смешанные следы.)

Особенно ценна возможность создания криминалистических учетов, когда необходимо накопление и сохранение данных иссле-

... для последующего поиска подозреваемых лиц путем сравнения их данных с уже имеющимися в базе. В нашей стране еще в 1994 г. было принято решение о создании «генно-дактилоскопических учетов», но в связи со сложной экономической ситуацией работа в этом направлении практически приостановлена.

Опыт применения ДНК-анализа в практике ГУ ЭКЦ МВД России и зарубежных лабораторий показал его высокую эффективность, поэтому в настоящее время ДНК-идентификация имеет существенный приоритет в практике экспертно-криминалистических служб ряда индустриально развитых стран мира (Великобритания, Германия, США и др.) и 15 биологических лабораторий ОВД России.



Глава 1

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

Строение, свойства и методы исследования ДНК

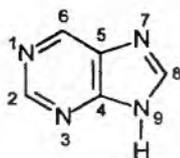
Строение ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является носителем генетической информации обо всех признаках организма и представляет собой сложное высокомолекулярное соединение, состоящее из последовательности химически связанных между собой нуклеотидов. Каждый нуклеотид включает в себя азотистое основание, состоящее из атомов углерода и азота, пятиуглеродное сахарное кольцо (дезоксирибозу) и остаток фосфорной кислоты или фосфатную группу (рис. 1).

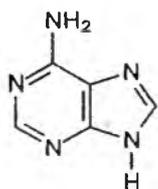
Как показано на рис. 1, азотистые основания делятся на два типа: *пуриновые* и *пиримидиновые*. Пурины имеют по два конденсированных кольца: одно — пятичленное, другое — шестичленное. Пиримидины состоят из одного шестичленного кольца. В состав ДНК входят основания четырех типов — аденин, гуанин, тимин и цитозин. Эти основания обычно обозначаются их начальными буквами — А, Г, Т и С.

Азотистые основания соединены с дезоксирибозой гликозидной связью, которая в случае пиримидинового основания образуется между первым атомом пентозного кольца и третьим атомом основания, а в случае пуринового основания — между первым атомом пентозного кольца и девятым атомом основания. Данное соединение (т.е. соединение, состоящее из азотистого основания и сахара) называется *нуклеозидом*. Чтобы отличить атомы дезоксирибозы от атомов азотистых оснований, их положение принято обозначать номером со штрихом (...').

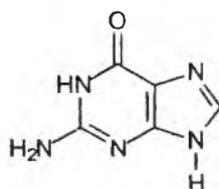
Пуриновые основания



Пурин

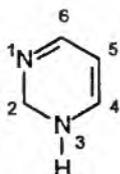


Аденин (А)

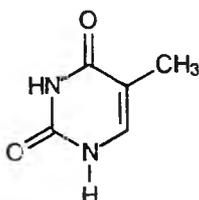


Гуанин (G)

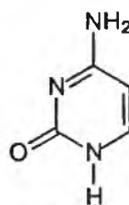
Пиримидиновые основания



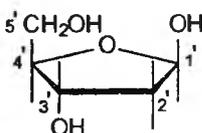
Пиримидин



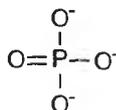
Тимин (Т)



Цитозин (С)



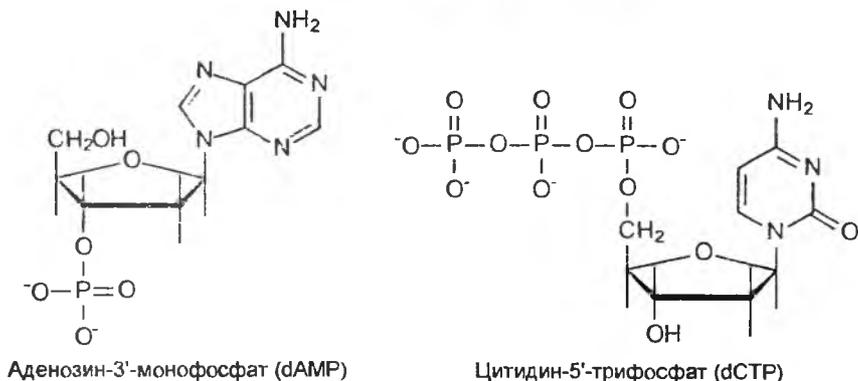
2-Дезоксирибоза



Остаток фосфорной кислоты

Рис. 1. Компоненты ДНК: пуриновые и пиримидиновые основания, дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты. Показана нумерация положения атомов в молекулах азотистых оснований и дезоксирибозы

Соединение нуклеозида с остатком фосфорной кислоты называется *нуклеотидом*. Остаток фосфорной кислоты может образовывать связь с пентозным кольцом нуклеозида в двух положениях: с 3'-атомом либо с 5'-атомом. Соответственно возможны два варианта соединений: нуклеозид-3'-монофосфат и нуклеозид-5'-монофосфат. Нуклеозиды в 5'-положении могут быть связаны более чем с одним остатком фосфорной кислоты, образуя ди- или трифосфаты (рис. 2). Особенностью этих соединений является то, что связи между фосфатными группами являются высокоэнергетическими, т.е. при их разрыве освобождается значительное количество энергии, которая может быть использована для различных клеточных процессов. Кроме того, нуклеозидтрифосфаты (сокращенно обозначаемые как dNTP) являются соединениями, из которых синтезируется ДНК.



Аденозин-3'-монофосфат (dAMP)

Цитидин-5'-трифосфат (dCTP)

Рис. 2. Строение нуклеотидов. Показано, что остаток фосфорной кислоты может находиться в нуклеотидах в 3'- или 5'-положении

Нуклеотиды образуют цепь, остов которой состоит из чередующихся остатков дезоксирибозы и фосфорной кислоты, соединенных фосфодиэфирной связью. Атом в 5'-положении одного пентозного кольца соединен через остаток фосфорной кислоты с атомом в 3'-положении следующего пентозного кольца. Азотистые основания не участвуют в формировании остова цепи. Нуклеотид на одном конце цепи имеет свободную 5'-группу (5'-конец), а на другом – 3'-группу (3'-конец). Последовательность нуклеотидов (азотистых оснований) принято обозначать в направлении от 5'-конца к 3'-концу. В этой последовательности закодирована генетическая информация, носителем которой является ДНК.

Согласно модели ДНК, предложенной в 1953 г. Уотсоном и Криком, ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, скрученных в спираль. Эти цепи не связаны ковалентно, а соединяются водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями. При этом А может образовывать водородную связь только с Т, тогда как G специфически соединяется только с С. Эти реакции называют *спариванием оснований*, а об основаниях, способных спариваться (А с Т и Г с С), говорят, что они *комплементарны* (рис. 3). При специфическом спаривании оснований между А и Т образуются две водородные связи, а между Г и С – три. Азотистые основания имеют плоскую форму и располагаются парами перпендикулярно оси спирали. Если рассматривать спираль вдоль оси, то видно, что одна цепь идет в направлении 5'–3', а другая 3'–5', т.е. полинуклеотидные цепи в ДНК *антипараллельны*. Фосфатные группы располагаются с внешней стороны спирали, имеют отрицательный заряд и требуют нейтрализации ионами металлов или положительно заряженными белками.

Таким образом, по своему строению ДНК является сложным полимерным соединением. Размер молекул ДНК, как и любых других полимерных соединений, может сильно варьировать. Так как мономерные соединения в ДНК – это нуклеотиды, а ДНК – двухцепочечная структура, то размер молекул ДНК принято измерять в парах нуклеотидов (п.н.) или парах оснований (п.о.).

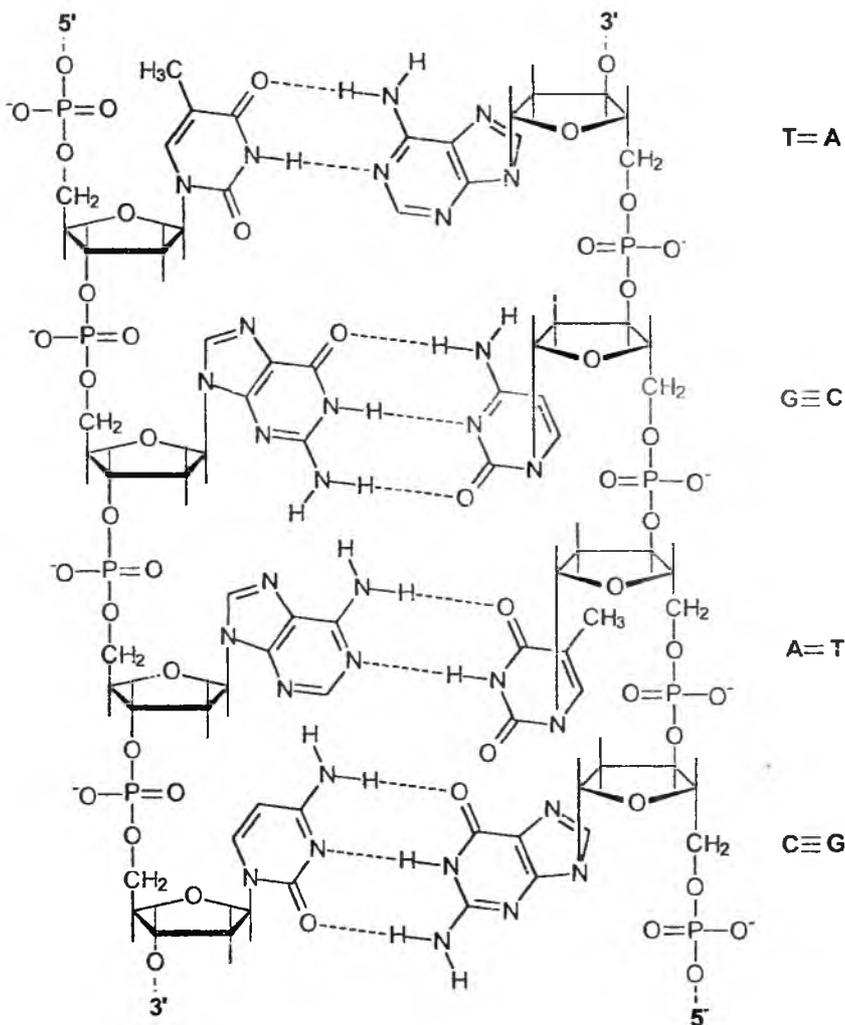


Рис. 3. Строение ДНК. Показаны две полинуклеотидные цепи, связанные водородными связями между комплементарными основаниями

Свойства ДНК: денатурация и ренатурация

Структура двойной спирали ДНК, скрепленная с помощью только водородных связей, может быть легко разрушена. Разрыв водородных связей между полинуклеотидными цепями ДНК можно осуществить в сильнощелочных растворах (при $\text{pH} > 12,5$) или при нагревании. После этого цепи ДНК полностью разделяются. Такой процесс называют *денатурацией* или *плавлением* ДНК.

При денатурации изменяются некоторые физические свойства ДНК, например ее оптическая плотность. Азотистые основания поглощают свет в ультрафиолетовой области (с максимумом, близким к 260 нм). ДНК поглощает свет почти на 40 % меньше, чем смесь свободных нуклеотидов того же состава. Это явление называют *гипохромным эффектом*, а обусловлено оно взаимодействием оснований при их расположении в двойной спирали.

Любое отклонение от двухцепочечного состояния оказывает влияние на изменение величины этого эффекта, т.е. происходит сдвиг оптической плотности в сторону значения, характерного для свободных оснований. Таким образом, за денатурацией ДНК можно наблюдать по изменению ее оптической плотности.

При нагревании ДНК среднюю температуру диапазона, при котором происходит разделение цепей ДНК, называют *точкой плавления* и обозначают как $T_{\text{пл}}$. В растворе $T_{\text{пл}}$ обычно лежит в интервале 85–95 °С. Кривая плавления ДНК всегда имеет одну и ту же форму, но ее положение на температурной шкале зависит от состава оснований и условий денатурации (рис. 4). Пары G–C, соединенные тремя водородными связями, являются более тугоплавкими, чем пары A–T, имеющие две водородные связи, поэтому при увеличении содержания G–C-пар значение $T_{\text{пл}}$ возрастает. ДНК, на 40 % состоящая из G–C (характерно для генома млекопитающих), денатурирует при $T_{\text{пл}}$ около 87 °С, тогда как ДНК, содержащая 60 % G–C, имеет $T_{\text{пл}}$ около 95 °С.

На температуру денатурации ДНК (кроме состава оснований) оказывает влияние ионная сила раствора. При этом чем выше концентрация моновалентных катионов, тем выше $T_{\text{пл}}$. Значение $T_{\text{пл}}$ также сильно меняется при добавлении к раствору ДНК таких веществ, как формамид (амид муравьиной кислоты HCONH_2), который дестабилизирует водородные связи. Его присутствие позволяет снизить $T_{\text{пл}}$ до 40 °С.

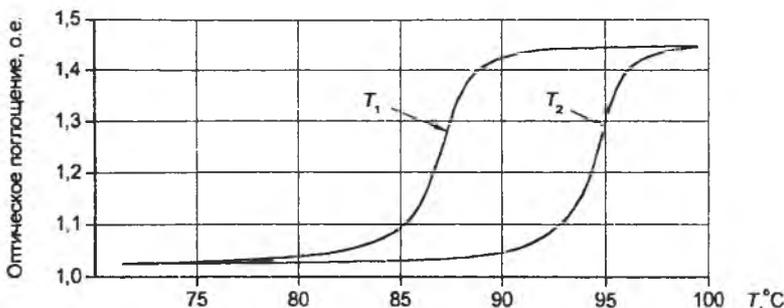


Рис. 4. Денатурация ДНК при нагревании, наблюдаемая по изменению ее оптической плотности. Оптическое поглощение указано в оптических единицах (о.е.). Показаны кривые денатурации ДНК, содержащей в своей последовательности 40 % (T_1) и 60 % (T_2) пар G-C

Процесс денатурации является обратимым. Явление восстановления структуры двойной спирали, исходя из двух разделенных комплементарных цепей, называют *ренатурацией* ДНК или *отжигом*. Для осуществления ренатурации, как правило, достаточно гудить раствор денатурированной ДНК.

В ренатурации участвуют две комплементарные последовательности, которые были разделены при денатурации. Однако ренатурировать могут любые комплементарные последовательности, которые способны образовать двухцепочечную структуру. Если совместят одноцепочечные ДНК, происходящие из различных источников, то формирование двухцепочечной структуры ДНК называют *гибридизацией*.

Основные методы исследования ДНК: гибридизация и электрофорез

Способность к гибридации двух препаратов ДНК служит строгим тестом на комплементарность их последовательностей. Существуют два основных способа проведения реакции – это *гибридизация в растворе* и *гибридизация на фильтре*.

В случае гибридации в растворе препараты одноцепочечной ДНК смешивают и отжигают непосредственно в растворе. Данный способ имеет существенный недостаток: цепи препаратов ДНК могут одновременно ренатурировать с образованием гибридных, так и исходных двухцепочечных молекул ДНК. Поскольку обе реакции конкурируют между собой, то трудно оценить степень гибридации.

Этот недостаток легко преодолеть, если один из препаратов ДНК иммобилизовать так, чтобы он не мог ренатурировать. Для этой цели используют нитроцеллюлозный или нейлоновый фильтры (мембраны), на поверхности которых адсорбируют одноцепочечную ДНК. Затем фильтр с иммобилизованной ДНК инкубируют в растворе второго препарата ДНК, который обычно содержит метку (радиоактивную, флуоресцентную и т.п.). Гибридизация иммобилизованной ДНК и ДНК-зондов (т.е. ДНК, содержащей метку) происходит только в том случае, если их последовательности комплементарны. Анализ результатов гибридизации проводят по метке, оставшейся на фильтре. Этот способ гибридизации используется во многих методах криминалистического ДНК-анализа.

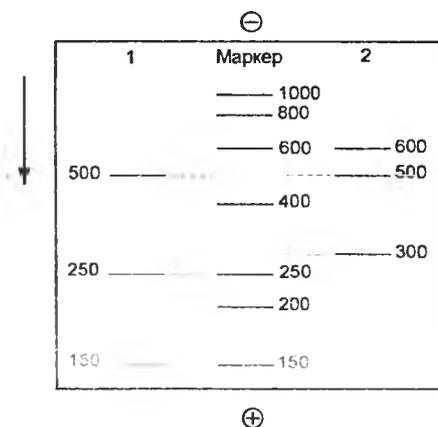


Рис. 5. Схема электрофореза ДНК. Сравнивая положение полос исследуемых проб (1 и 2) с полосами маркера, можно определить величину фрагментов в п.н.

Фрагменты ДНК различной длины могут быть фракционированы методом *электрофореза*. Этот метод является важнейшим методом исследования ДНК и широко используется в криминалистическом ДНК-анализе. Средой для электрофореза служат агарозные или полиакриламидные гели, формирующие сетчатую структуру с величиной ячеек, соизмеримой с величиной молекулы ДНК. Перед электрофорезом пробы ДНК вносят в специальные лунки геля, которым будут соответствовать его *дорожки*. После наложения электрического поля фрагменты ДНК (имеющие отрицательный заряд) начинают перемещаться к аноду (положительно заряженному электроду), испытывая сопротивление сетчатой среды геля. Чем короче фрагмент, тем меньшее сопротивление он испытывает и тем быстрее он движется (скорость миграции обратно пропорциональна логарифму длины фрагмента). В результате электрофореза в геле образуются полосы (рис. 5). Те полосы, которые

располагаются ближе к аноду, соответствуют меньшим по длине фрагментам, а те, которые дальше, — большим. Для определения длины фрагментов ДНК на гель наносят специальный *маркер*, т.е. пробу, содержащую смесь фрагментов известной длины. Ориентируясь на расположение полос маркера и полосы фрагмента ДНК неизвестного размера, устанавливают его длину.

Синтез ДНК: полимеразная цепная реакция

Наличие у ДНК таких свойств, как возможность разделения полинуклеотидных цепей и принцип комплементарного соединения азотистых оснований, предполагает, что каждая отдельная цепь ДНК может служить матрицей для построения второй комплементарной цепи, т.е. информация, необходимая для воспроизведения последовательности оснований в ДНК, заложена в структуре ее двойной спирали. Такой механизм синтеза ДНК, когда в результате образуются две молекулы, в которых одна цепь состоит из исходной родительской цепи, а вторая синтезирована на ее основе, называют *полуконсервативным*.

Полуконсервативный синтез представляет собой сложный ферментативный процесс. Основным ферментом, ответственным за синтез новой цепи, является *ДНК-полимераза*. Данный фермент обладает свойством удлинять цепь ДНК, последовательно присоединяя по одному нуклеотиду к 3'-концу (рис. 6), осуществляя синтез в направлении 5'–3'. ДНК-полимераза самостоятельно не может инициировать синтез на одноцепочечной ДНК; для этого необходим небольшой участок двухцепочечной ДНК. Чтобы его создать и инициировать синтез, к матричной ДНК добавляют короткий фрагмент одноцепочечной ДНК (около 20 п.н.), называемый *ДНК-затравкой* или *праймером*. Нуклеотидная последовательность ДНК-затравки должна быть комплементарна определенному участку матричной ДНК. Предшественниками синтеза ДНК и источником энергии для реакции являются нуклеозидтрифосфаты (dNTP), которые в процессе этой реакции утрачивают две конечные фосфатные группы. Выбор нуклеотида, добавляемого к цепи, определяется комплементарностью оснований.

На основе полуконсервативного синтеза ДНК в 1985 г. Мюллисом был открыт универсальный метод синтеза заданной последовательности ДНК, названный методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР – *Polymerase chain reaction, PCR*) [4, 5]. ПЦР представляет собой циклический процесс, осуществляемый при участии ДНК-

полимеразы и обеспечивающий *амплификацию* (копирование) имеющейся последовательности ДНК. В процессе реакции данная последовательность накапливается экспоненциально, и к концу реакции ее количество измеряется миллионами копий. Границы амплифицируемого участка ДНК определяются двумя праймерами, комплементарными 3'-концам интересующей последовательности.

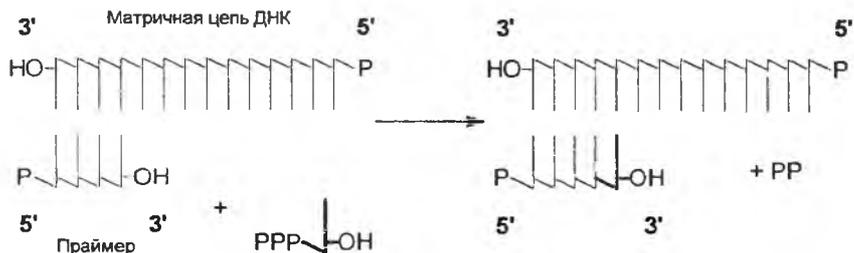


Рис. 6. Схема синтеза ДНК на матричной цепи. Фермент ДНК-полимераза добавляет нуклеотиды к 3'-концу растущей цепи

Цикл амплификации состоит из трех фаз: денатурации, отжига и достраивания, различающихся температурой (рис. 7). В первой фазе под действием высокой температуры (около 94–95 °С) происходит денатурация ДНК с образованием одноцепочечных молекул. Во второй фазе температура снижается и происходит отжиг праймеров на комплементарных им участках матричной ДНК. Температура, которая требуется для отжига праймеров, зависит от состава оснований праймеров и обычно составляет 50–70 °С. При более низкой температуре может происходить ренатурация исходной матричной ДНК и появление неспецифических продуктов реакции. В период третьей фазы с участием ДНК-полимеразы происходит синтез или достраивание цепи, комплементарной матричной. Температура обычно варьирует в диапазоне 70–75 °С. В результате к концу цикла количество ДНК с заданной последовательностью удваивается.

В следующих циклах температурные фазы повторяются, при этом в качестве матричной ДНК служат не только исходные молекулы ДНК, но и те цепи, которые были синтезированы в предыдущих циклах. Теоретически, к концу 30-го цикла амплификации на основе одной молекулы ДНК синтезируется 10^9 копий интересующей последовательности.

На первоначальных этапах применения метода ПЦР в качестве полимеразы использовали фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I

E. Coli. Поскольку этот фермент инактивировался при температуре денатурации ДНК, его необходимо было добавлять в каждом цикле на этапе достраивания цепи. Этот недостаток был преодолен после выделения из бактерии *Termus aquaticus*, обитающей в горячих источниках при температуре 70–75 °С, термостабильной полимеразы (*Taq*-полимеразы). Использование этой полимеразы при ПЦР позволило автоматизировать процесс амплификации, что способствовало его широкому внедрению при исследованиях ДНК.

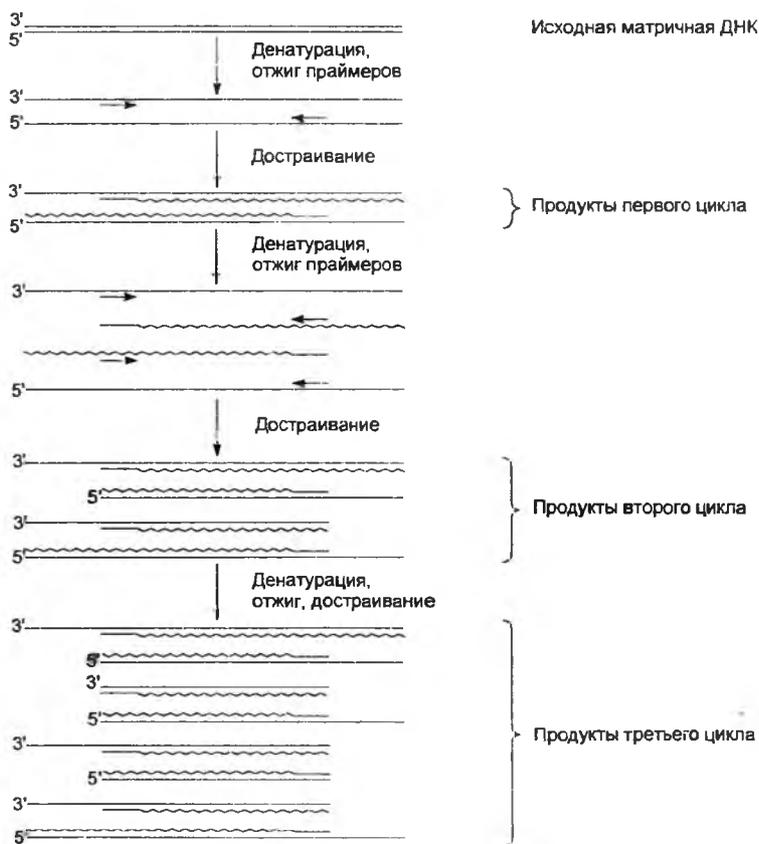


Рис. 7. Схема первых трех циклов ПЦР. После каждого цикла количество ДНК с заданной последовательностью удваивается

Области генома, изучаемые при ДНК-анализе. Индивидуализирующие свойства ДНК

Организация генома ядра

Для иллюстрации организации генома ядра рассмотрим подробнее описанное выше свойство ДНК – ренатурацию.

Процесс ренатурации ДНК в растворе описывается уравнением [6]:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1 + k \cdot C_0 t},$$

где C_0 – концентрация ДНК в момент времени $t = 0$; C – концентрация молекул ДНК, оставшихся одноцепочечными к моменту времени t ; k – константа скорости ренатурации, зависящая от характеристик ДНК, подвергшейся ренатурации.

Когда реакция ренатурации прошла наполовину, т.е. в момент времени $t_{1/2}$:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + k \cdot C_0 t_{1/2}}, \text{ откуда } C_0 t_{1/2} = \frac{1}{k}.$$

Ренатурация любой специфической ДНК может быть описана с помощью константы скорости реакции k (измеряется в молях нуклеотидов⁻¹ · л · с⁻¹) или обратной ей величины $C_0 t_{1/2}$ (измеряется в молях нуклеотидов · с/л). Из уравнения следует, что основным параметром реакции является произведение концентрации ДНК (C_0) на время инкубации t . Чем больше значение этого произведения, тем медленнее протекает реакция, и наоборот.

Ренатурацию ДНК можно изобразить в виде кривой $C_0 t$, где значениям $\log C_0 t$ будет соответствовать процентное содержание в смеси фракции ренатурировавшей ДНК (рис. 8). На рисунке видно, что форма кривых ренатурации разных геномов одинакова и ренатурация осуществляется в интервале значений $C_0 t$, равном двум порядкам (между точками, соответствующими 10 и 90 % ренатурации). Значения $C_0 t_{1/2}$ у разных геномов различаются, и при этом они прямо пропорциональны количеству ДНК в геноме. Данную закономерность легко объяснить на следующем примере. Допустим, что C_0 составляет 12 нг ДНК, тогда в растворе будет содержаться 3 000 копий каждой последовательности бактериального генома, размер которого 0,004 нг, но лишь 4 копии каждой последовательности эукариотического генома, размер которого 3 нг. Значит, при одинаковой абсолютной концентрации (C_0) концентрация каждой эукариотической

последовательности будет в 750 раз ниже, чем концентрация каждой бактериальной последовательности. Поскольку скорость ренатурации зависит от концентрации комплементарных последовательностей, то для достижения одинаковой относительной концентрации эукариотических и бактериальных последовательностей необходимо иметь в 750 раз больше эукариотической ДНК (т.е. увеличить C_0 в 750 раз) либо инкубировать то же количество в 750 раз дольше. Следовательно, $C_0t_{1/2}$ реакции ренатурации эукариотической ДНК будет в 750 раз больше бактериальной.

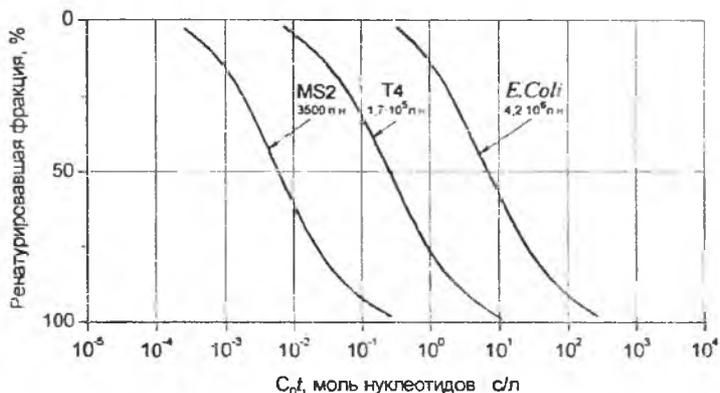


Рис. 8. Кривые ренатурации ДНК различных по длине геномов (скорость ренатурации обратно пропорциональна длине ренатурирующей ДНК)

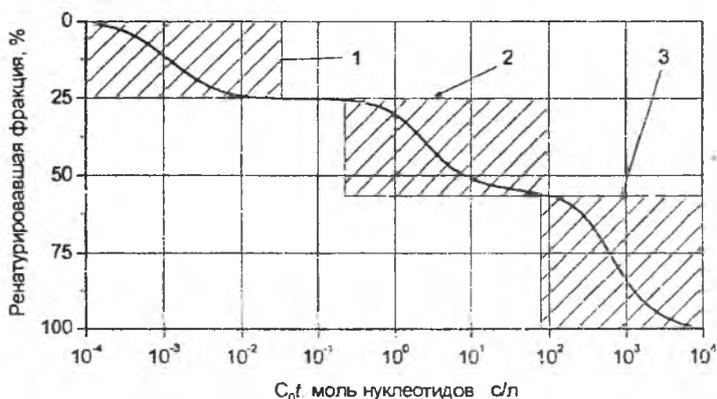


Рис. 9. Кривая ренатурации ДНК эукариотического генома:
1 – быстро ренатурирующая фракция; 2 – промежуточная фракция;
3 – медленно ренатурирующая фракция

Таким образом, величина $C_{0t_{1/2}}$ указывает на суммарную длину азличных последовательностей ДНК и характеризует *сложность енома*. Обычно эту величину выражают п.н.

Если оценить эукариотический геном (а геном человека является эукариотическим) с помощью кинетики ренатурации, то значения τ_{0t} реакции обычно находятся в пределах, различающихся на 8 порядков (рис. 9), что значительно шире, чем интервал ренатурации ДНК прокариотических геномов (см. рис. 8). Данное явление можно объяснить тем, что в случае прокариотического генома ренатурации подвергается один *кинетически чистый* компонент, а в состав эукариотического генома входит несколько таких компонентов, каждый из которых характеризуется своей кинетикой.

Проанализируем кривую ренатурации гипотетического эукариотического генома величиной $7 \cdot 10^8$ п.н. (см. рис. 9). Можно выделить три фазы ренатурации, каждая из которых соответствует определенному кинетическому компоненту. Фракцию ДНК, ренатурирующую первой, называют *быстро ренатурирующей*. Данная фракция составляет 25 % от всей ДНК, и ее значение $C_{0t_{1/2}}$ характерно для сложности, равной 340 п.н. Следующая фракция — *промежуточная*, составляет 30 % и имеет значение $C_{0t_{1/2}}$, соответствующее $6 \cdot 10^5$ п.н. Последняя фракция — *медленно ренатурирующая*, составляет 45 % и характеризуется значением $C_{0t_{1/2}}$, присущим сложности $3 \cdot 10^8$ п.н.

Сложность медленно ренатурирующей фракции соответствует ее реальному размеру (45 % от $7 \cdot 10^8$ п.н. равно $3,15 \cdot 10^8$ п.н.). Из совпадения этих величин следует, что эта фракция образована *неповторяющимися* или *уникальными* последовательностями генома.

Промежуточной фракции в геноме содержится 30 %, что соответствует количеству ДНК, равному $2,1 \cdot 10^8$ п.н. Сложность же последовательностей фракции меньше и составляет лишь $6 \cdot 10^5$ п.н. Это означает, что последовательности ДНК, относящиеся к этой фракции, повторяются в одном геноме несколько раз (более точно: $2,1 \cdot 10^8 / 6 \cdot 10^5 = 350$ раз).

Быстро ренатурирующая фракция содержит *высокоповторяющуюся* ДНК, которая представлена в одном геноме последовательностями со средней длиной 340 п.н. в количестве 500 000 копий.

Таким образом, в эукариотическом геноме одновременно присутствуют различные по сложности последовательности ДНК, которые могут быть представлены как одной копией (уникальная ДНК), так и сотнями тысяч копий (высокоповторяющаяся ДНК). Уникальная и повторяющаяся ДНК не существуют в виде непрерывных

последовательностей. Оба компонента присутствуют в геноме в виде чередующихся друг с другом отдельных последовательностей. Во многих случаях это чередование имеет определенную регулярность.

Все последовательности ДНК, составляющие геном ядра, организованы в небольшое число хромосом. У человека таких хромосом насчитывается 23 (в обычных клетках каждая хромосома представлена парой гомологичных хромосом, поэтому общее число хромосом 46). В хромосоме последовательности ДНК располагаются линейно, при этом каждая специфическая последовательность (*генетический признак*) занимает определенный участок хромосомы, который называют *локусом*. Локусы, расположенные на близком расстоянии в одной хромосоме, могут наследоваться *сцепленно* друг с другом.

У разных индивидуумов одни и те же генетические признаки часто представлены альтернативными формами, что может проявляться в различии фенотипических признаков этих индивидуумов. Данные формы называют *аллелями*. Разные аллели одного и того же признака всегда находятся в одном локусе. Наличие в популяции нескольких стабильных аллелей одного локуса называется *полиморфизмом*, а такой локус — *полиморфным*. Каждый генетический признак у одного индивидуума представлен двумя аллелями (так как в геноме каждая хромосома представлена парой гомологичных хромосом): если аллели одинаковые, то такой генетический признак имеет *гомозиготное* состояние, если разные — то *гетерозиготное*.

Совокупность аллельных вариантов полиморфных локусов является индивидуальной для каждого человека.

Полиморфизм уникальных последовательностей ДНК

Уникальные последовательности ДНК включают в себя все *гены* организма, т.е. участки ДНК, в нуклеотидной последовательности которых закодирована определенная генетическая информация. Полиморфизм уникальной ДНК генома обусловлен различиями в последовательности нуклеотидов разных аллелей одного локуса. Такой вид полиморфизма называют *полиморфизмом нуклеотидной последовательности*.

Данным видом полиморфизма обладают участки ДНК, кодирующие признаки генетических маркеров, которые в экспертной практике исследуют серологическими методами (например, хорошо известная и широко применяемая система группы крови АВ0), методами изоэлектрофокусирования (например, система группспецифического компонента GC).

Одним из наиболее изученных в настоящее время генетических маркеров, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности, является комплекс белков антигенов лейкоцитов человека HLA (Human Leukocyte Antigen). Исследование генетических признаков системы HLA имеет большое значение в медицинской практике, так как гены этой системы обуславливают признаки гистосовместимости органов и тканей при их трансплантациях, а также связаны с болезнями иммунной системы и некоторыми другими болезнями. Гены HLA-D (класс II) локализованы на шестой хромосоме и состоят из трех регионов HLA-DP, -DQ и -DR, каждый из которых кодирует α - и β -гликопептиды [7, 8]. Локус HLA DQA1, содержащий ген, кодирующий α -частицу белка DQ, исследуют в криминалистическом ДНК-анализе. Для этого локуса установлены нуклеотидные последовательности всех восьми известных аллелей, которые в соответствии с международной номенклатурой разделяются на 4 типа: A1, A2, A3 и A4; а типы A1 и A4 – соответственно на подтипы: A1.1, A1.2, A1.3, A4.1, A4.2 и A4.3.

Для исследования локусов, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности, обычно применяют метод гибридизации с аллель-специфичными зондами. Для создания таких зондов должна быть определена нуклеотидная последовательность всех аллелей. Процессы *секвенирования* ДНК (т.е. определения нуклеотидной последовательности), синтеза аллель-специфичных зондов и оптимизации условий гибридизации являются сложными и дорогостоящими. Это является существенным недостатком исследования уникальных последовательностей в криминалистическом ДНК-анализе.

Исследование полиморфизма нуклеотидной последовательности путем непосредственной расшифровки изучаемых последовательностей (т.е. методом секвенирования) также имеет ряд сложностей (например, при исследовании гетерозиготного образца ДНК, содержащего смесь двух различных последовательностей ДНК). Перед этапом секвенирования ДНК последовательности каждого аллеля должны быть выделены из смеси ДНК образца, что бывает нелегко выполнить на практике.

Указанные недостатки сужают возможности использования локусов уникальных последовательностей в криминалистическом ДНК-анализе, поэтому направление по их исследованию в настоящее время не является перспективным.

Полиморфизм высокоповторяющихся последовательностей ДНК

Участки высокоповторяющейся ДНК организованы в геноме в виде тандема многократно повторяющихся коротких последовательностей, т.е. *тандемных повторов*, которые могут быть идентичны либо близки по строению. Состав азотистых оснований (соотношение G–C- и A–T-пар) этих повторов может отличаться от состава оснований в геноме в целом, в результате чего они могут образовать фракцию, характеризующуюся особой плавучей плотностью [6]. Плавучую плотность ДНК определяют при центрифугировании в градиенте плотности CsCl (рис. 10). В результате центрифугирования образуются широкий пик ДНК, соответствующий основной части ДНК генома, и дополнительный (*сателлитный*) пик, соответствующий фракции тандемных повторов. Благодаря данному свойству высокоповторяющуюся ДНК часто называют *сателлитной*.

Участки тандемных повторов обладают высоким уровнем полиморфизма, основой которого является непостоянство числа повторяющихся единиц, что обуславливает различия в длине аллелей одного локуса. Такой вид полиморфизма называют *полиморфизмом длины*.

Локусы тандемных повторов разделяют на две группы: *минисателлитных*, или VNTR-локусов (Variable Number Tandem Repeat – локус с переменным числом тандемных повторов) с длиной повтора семь и более пар нуклеотидов, и *микросателлитных*, или STR-локусов (Short Tandem Repeat – локус с короткими тандемными повторами) с длиной повтора от двух до шести пар нуклеотидов. Данное разделение связано с особенностями практического использования этих локусов, поэтому является условным.



Рис. 10. Центрифугирование эукариотического генома в градиенте плотности CsCl. Высокоповторяющаяся ДНК образует фракцию сателлитной ДНК

Интервал длин аллелей VNTR-локусов составляет от 200 до 1 000 п.н. Большинство этих локусов обладает высоким полиморфизмом (например, у локуса D1S80 встречается более 20 аллелей) и соответственно высокими индивидуализирующими свойствами [9, 10]. Однако в случае исследования ДНК, подвергшейся деградации (разрушению), что очень часто встречается в экспертной практике, им свойственны два существенных недостатка. Во-первых, в связи с высокой вероятностью деградации аллелей, связанной с их относительно большой величиной, может вообще оказаться невозможным установить аллельную характеристику ДНК. Во-вторых, из-за большой разницы в длине аллелей существует вероятность выявить только один низкомолекулярный аллель и дать ложное заключение о гомозиготности образца ДНК, на самом деле являющегося гетерозиготным, у которого высокомолекулярный аллель подвергся большей деградации. Эти недостатки ограничивают использование VNTR-локусов, и поэтому в настоящее время направление по их исследованию практически не развивается.

STR-локусы лишены недостатков, свойственных минисателлитным локусам. Интервал длин аллелей составляет от 100 до 300 п.н., что значительно увеличивает вероятность их сохранения в деградированной ДНК и гарантирует выявление всех аллелей в гетерозиготных образцах. По сравнению с VNTR-локусами, STR-локусы обладают меньшим полиморфизмом, однако этот недостаток легко преодолевается за счет возможности проведения анализа сразу нескольких локусов в рамках одного цикла исследования. Кроме того, данная возможность позволяет сократить сроки исследования и повысить его чувствительность (исходя из одного и того же количества ДНК, установить не один, а сразу несколько генетических признаков). Все это способствует широкому использованию STR-локусов в криминалистическом ДНК-анализе и обуславливает создание на их основе баз данных ДНК.

В настоящее время наибольшее применение получили тетрамерные STR-локусы, у которых длина повторяющейся единицы составляет 4 п.н. Для обозначения аллелей этих локусов, в соответствии с рекомендациями Комиссии по ДНК Международного Общества Криминалистической Гемогенетики (DNA commission of the International Society of Forensic Haemogenetics) применяют «естественную» номенклатуру, согласно которой номер аллеля означает число повторяющихся единиц [11].

В зависимости от строения STR-локусы разделяют на несколько групп [12].

Простые повторы – локусы, у которых повторяющиеся последовательности идентичны, например, локус FESFPS [13], аллельные варианты которого состоят из последовательности [ATTT], повторяющейся в разных аллелях от 8 до 14 раз: [ATTT]₈₋₁₄.

Простые с неполными повторами – локусы (например, локус TN01), у которых кроме аллельных вариантов, представляющих собой простые повторяющиеся последовательности [TCAT], известен вариант, состоящий из полных тетрамерных повторов и одного неполного повтора из трех нуклеотидов [14]. Этот вариант обозначается числом полных повторов и числом дополнительных оснований (9.3):

аллели 5–11 – [TCAT]₅₋₁₁;

аллель 9.3 – [TCAT]₄[-CAT][TCAT]₅.

Составные повторы – локусы, состоящие из различных повторяющихся последовательностей, например, последовательности локуса vWA [15, 16] состоят из повторов двух типов – [TCTA] и [TCTG]:

аллели 13, 15–22 – TCTA [TCTG]₃₋₄ [TCTA]_{9, 10-17};

аллель 14 – TCTA TCTG TCTA [TCTG]₄ [TCTA]₃ TCCA [TCTA]₃.

Сложные повторы – в локусах кроме повторяющихся последовательностей встречаются инвариантные последовательности, например, среди последовательностей локуса D21S11 [17] имеются два типа повторяющихся последовательностей – [TCTA] и [TCTG] – и инвариантные ди-, три- и гексамерные последовательности. Кроме того, наличие (или отсутствие) гексамерной последовательности обуславливает существование в данном локусе двух классов аллелей:

класс 1: [TCTA]₄₋₆ [TCTG]₅₋₆ [TCTA]₃ TA [TCTA]₃ TCA [TCTA]₂
TCCATA [TCTA]₈₋₁₆ ---- TC;

класс 2: [TCTA]₄₋₆ [TCTG]₅₋₆ [TCTA]₃ TA [TCTA]₃ TCA [TCTA]₂
TCCATA [TCTA]₈₋₁₆ TA TCTA TC.

Сложные гипервариабельные повторы представляют собой локусы с повторяющимися последовательностями разных типов, например, локус ASTRP2 [18], имеющий структуру [AAAG]_n и состоящий одновременно из моно-, ди-, три- и тетрамерных последовательностей.

Полиморфизм митохондриальной ДНК

Кроме рассмотренной выше ДНК ядерного генома, в клетках эукариотических организмов имеется ДНК, которая содержится в органеллах клетки – митохондриях. Митохондриальный геном человека представляет собой кольцевую молекулу ДНК величиной 16 569 п.н., состоящую из области консервативных последовательностей, несущих генетическую информацию, и некодирующего гипервариабельного контрольного участка [6]. Область ДНК, несущая генетическую информацию, содержит гены, кодирующие белки и РНК, которые участвуют в функционировании органеллы. Некодирующий контрольный участок (называемый D-петлей) имеет величину порядка 1100 п.н., отвечает за инициализацию процесса репликации ДНК, а также участвует в регуляции процесса транскрипции. В области D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК) выделяют два гипервариабельных участка [19], которые обладают полиморфизмом нуклеотидной последовательности.

Исследование гипервариабельных участков D-петли мтДНК для криминалистического ДНК-анализа представляет интерес из-за следующих свойств мтДНК. Во-первых, гипервариабельные участки D-петли обладают высоким уровнем полиморфизма, обусловленным высокой скоростью накопления мутаций, которая в 5–10 раз больше, чем в ядерной ДНК [20, 21]. Во-вторых, в каждой клетке человека содержится от нескольких сотен до тысячи митохондрий и соответственно такое же количество копий молекул мтДНК [22]. Это повышает вероятность сохранения пригодной для исследования ДНК в биологических образцах, содержащих малые количества ДНК или ДНК, подвергнушаяся деградации (например, в костных тканях, волосах). В-третьих, мтДНК наследуется только по материнской линии [23] (от матери к ребенку); при этом каждый индивидуум является гаплоидом, т.е. имеет только один вид мтДНК. Это облегчает проводить исследование мтДНК методом секвенирования.

Такие свойства мтДНК обуславливают активную разработку технологий исследования митохондриальной ДНК и способствуют их внедрению в практику криминалистического ДНК-анализа.

Принципы исследования полиморфных локусов ДНК

Первая технология исследования полиморфных локусов ДНК, получившая широкое применение в практике криминалистического ДНК-анализа и названная методом анализа *полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)*, была разработана в 1985 г. английским ученым А. Джеффрисом [1, 2].

ПДРФ-анализ является методом исследования полиморфизма длины гипервариабельных участков сателлитной ДНК. Он основан на том, что в зависимости от числа повторяющихся единиц в последовательности тандемных повторов (VNTR-локусе) меняется расстояние между *сайтами рестрикции* (короткой нуклеотидной последовательностью, специфичной для расщепляющего цепь ДНК фермента *рестриктазы*).

В процессе ПДРФ-анализа исследуемую ДНК расщепляют рестриктазами, разделяют полученные фрагменты с помощью электрофореза, а затем методом гибридизации выявляют фрагменты, содержащие участки тандемных повторов. Для этого применяют радиоактивно меченные ДНК-зонды, комплементарные последовательности повторяющейся единицы тандемного повтора.

Технологии ПДРФ-анализа свойствен ряд недостатков. Для ее успешного применения необходимо наличие относительно большого количества высокомолекулярной ДНК (первоначально не фрагментированной), что в экспертной практике встречается весьма редко. Имеются сложности в подборе зондов, так как в связи со сходством нуклеотидных последовательностей различных локусов тандемных повторов используемые зонды могут выявлять фрагменты, содержащие последовательности нескольких полиморфных локусов. Это создает определенные проблемы при интерпретации получаемых профилей ДНК. Кроме того, анализ трудоемок и связан с использованием радиоактивных веществ.

Эти недостатки ограничивают возможности использования ПДРФ-анализа в практике криминалистического ДНК-анализа, и поэтому в настоящее время он не применяется.

Развитие современных технологий криминалистического исследования полиморфных локусов ДНК связано с открытием универсального метода синтеза заданных последовательностей ДНК – метода полимеразной цепной реакции. Использование этого метода позволяет исследовать генетические признаки ничтожно малых количеств ДНК, которые удастся выделить из объектов биологическо-

го происхождения человека, изымаемых с мест происшествия. Кроме того, технологии исследования, основанные на методе ПЦР, по сравнению с технологией ПДРФ-анализа менее трудоемки, позволяют значительно сократить сроки исследования, а получаемые результаты являются более достоверными [24].

Исследование локусов ДНК, обладающих полиморфизмом длины

Применяемая в настоящее время технология исследования локусов, обладающих полиморфизмом длины (VNTR- и STR-локусы), является наиболее распространенной в практике криминалистического ДНК-анализа. Это связано с ее относительной простотой, а также возможностью автоматизировать многие этапы исследования.

На первом этапе исследования проводят амплификацию изучаемых полиморфных последовательностей образца ДНК методом полимеразной цепной реакции (рис. 11). При этом синтезируются фрагменты ДНК, длина которых зависит от числа повторяющихся единиц в локусе тандемных повторов. В случае исследования гомозиготного образца образуется один вид фрагментов, а в случае гетерозиготного – два.

На следующем этапе исследования продукты ПЦР подвергают электрофорезу, в результате чего получают *аллельный профиль* исследуемого образца ДНК. Для установления аллелей на соседнюю дорожку геля помещают *лэддер*, или аллельный маркер, который содержит фрагменты ДНК, соответствующие по размерам всем встречающимся аллелям исследуемого локуса. Аллельный лэддер обычно производится изготовителем реактивов для амплификации.

Установить аллели можно также, используя «обычный» маркер ДНК (пробу, содержащую смесь фрагментов известной длины). Для этого на основе расположения полос маркера вычисляют величину фрагментов изучаемой пробы ДНК в п.н. и, зная каким аллелям эти величины соответствуют (определяется разработчиками реактивов для амплификации), устанавливают аллельную характеристику исследуемого образца ДНК. Однако его применение в значительной степени повышает вероятность ошибки исследования, поэтому не рекомендуется его использовать в практике криминалистического ДНК-анализа, а для установления аллелей STR-локусов его использование вообще недопустимо.

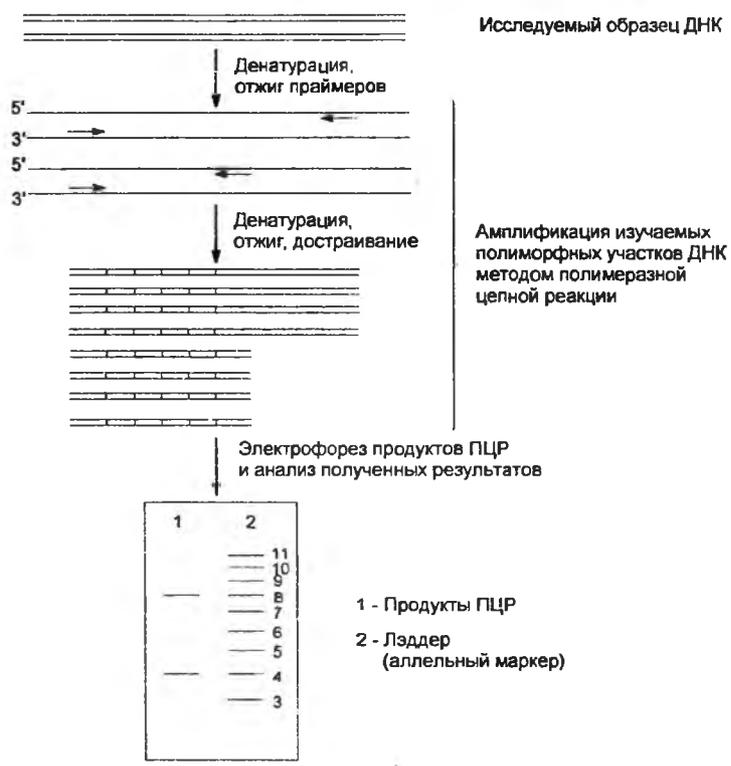


Рис. 11. Схема исследования локусов, обладающих полиморфизмом длины. Показано исследование гетерозиготного образца ДНК

Исследование локусов ДНК, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности

Одним из вариантов технологий исследования локусов, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности, является исследование с помощью метода гибридизации на фильтре. Использование этого метода возможно лишь при условии, что установлены нуклеотидные последовательности всех встречающихся аллелей исследуемого локуса. На основе этих данных для каждого аллеля создают комплементарный его нуклеотидной последовательности аллель-специфичный зонд. Эти зонды используют для выявления аллелей исследуемого локуса при проведении реакции гибридизации (называемой *дот-блот гибридизацией*).

Технология исследования полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК с помощью дот-блот гибридизации применена в коммерческом наборе для криминалистического ДНК-анализа AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit производства корпорации Perkin-Elmer, США [8, 25]. С помощью этого набора имеется возможность проводить одновременное исследование шести полиморфных локусов ДНК: HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 и GC. В комплект набора входят аллель-специфичные зонды, иммобилизованные в определенных местах нейлоновой мембраны.

На первом этапе исследования проводят амплификацию изучаемых полиморфных последовательностей образца ДНК методом полимеразной цепной реакции (рис. 12). Один из каждой пары праймеров каждого из исследуемых локусов связан со специальной биотиновой меткой. В результате амплификации синтезируются фрагменты ДНК с изучаемыми последовательностями ДНК, одна из цепей которых содержит биотиновую метку.

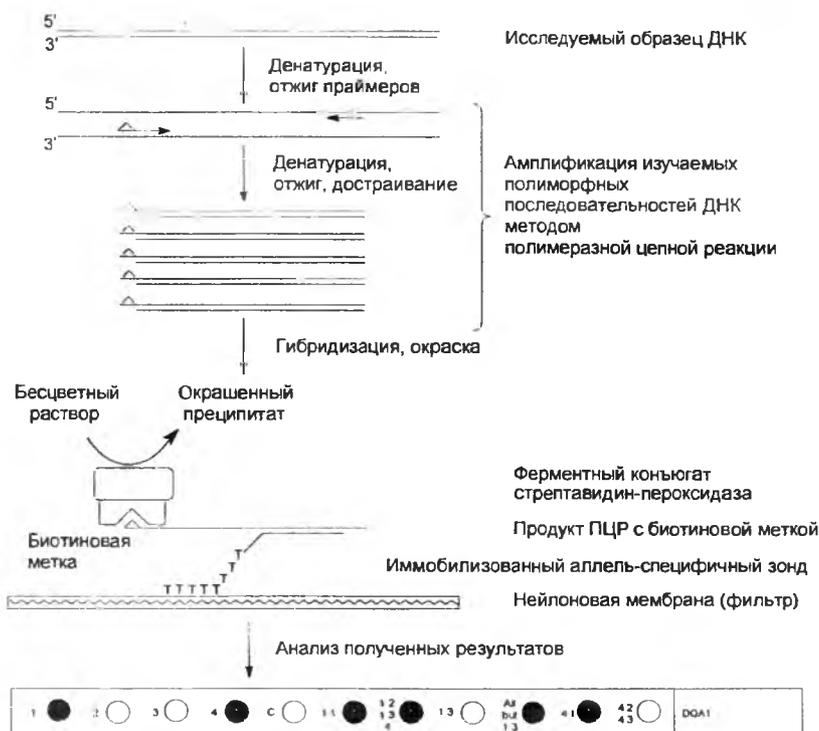


Рис. 12. Схема исследования полиморфизма нуклеотидной последовательности с помощью набора AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit

На следующем этапе продукты ПЦР подвергают денатурации и проводят их гибридизацию с иммобилизованными аллель-специфичными зондами. Эти зонды комплементарны той цепи ДНК, которая синтезировалась с помощью праймера, содержащего биотиную метку. В процессе гибридизации происходит связывание фрагментов, содержащих метку с комплементарным аллель-специфичным зондом. Фрагменты ДНК, не связавшиеся с зондами, удаляют, промывая мембрану.

На заключительном этапе исследования проводят проявление метки с помощью ферментного конъюгата стрептавидин-пероксидазы, который в присутствии перекиси водорода катализирует реакцию превращения бесцветного раствора субстрата (хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина) в окрашенный преципитат. В результате исследования на мембране с иммобилизованными аллель-специфичными зондами получают набор окрашенных пятен, соответствующих по нуклеотидным последовательностям аллелям исследуемого локуса.

Другим вариантом технологии исследования полиморфизма нуклеотидной последовательности является непосредственная засшифровка изучаемых последовательностей методом секвенирования [26, 27]. Для применения этого метода исследуемый образец ДНК должен состоять из фрагментов с одинаковой нуклеотидной последовательностью. В случае исследования гетерозиготных образцов ДНК (содержащих смесь двух различных последовательностей) перед этапом секвенирования ДНК последовательности каждого аллеля должны быть выделены из смеси. Данную процедуру бывает нелегко выполнить, поэтому в криминалистическом ДНК-анализе локусы ядерной ДНК этим методом не исследуют. Метод секвенирования обычно применяют для исследования полиморфных участков митохондриальной ДНК, которая присутствует в клетках одного человека в виде единственного типа последовательности.

На первом этапе исследования проводят амплификацию полиморфного участка анализируемого образца ДНК методом полимеразной цепной реакции (рис. 13). После этого продукты ПЦР денатурируют и проводят четыре варианта реакции синтеза второй цепи ДНК, используя одноцепочечную ДНК в качестве матрицы. В каждом из вариантов в реакционную смесь вводят все необходимые для синтеза цепи компоненты, а также один из четырех видов 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфатов. При встраи-

вании в растущую цепь дидезоксинуклеотида происходит остановка ее синтеза. Так как встраивание терминирующего нуклеотида носит вероятностный характер, то в результате этих реакций происходит образование серии фрагментов, различающихся по размеру на один нуклеотид.

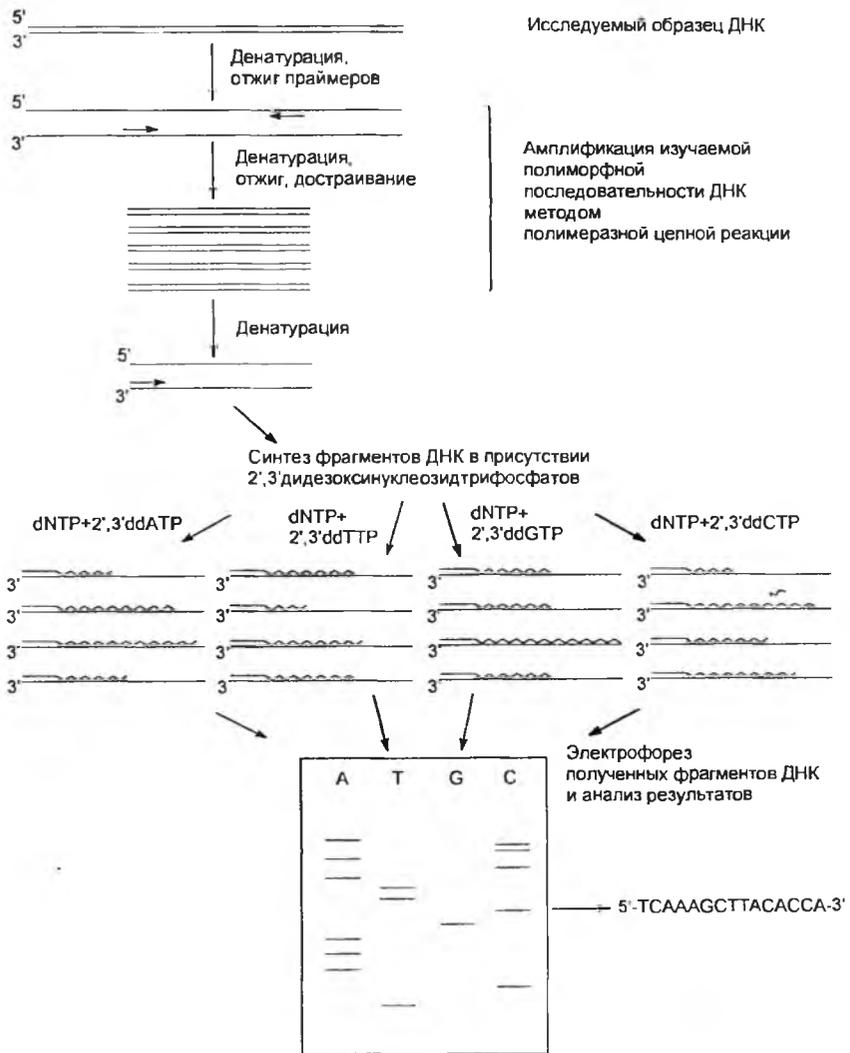
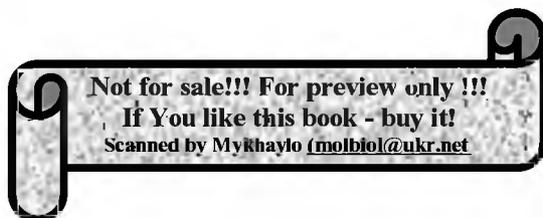


Рис. 13. Схема исследования полиморфизма нуклеотидной последовательности методом секвенирования. Показано секвенирование одной цепи ДНК

На заключительном этапе секвенирования продукты синтеза подвергают электрофорезу, помещая их на четыре соседние дорожки одного геля. Полосы, соответствующие фрагментам определенного размера, появляются только на одной из четырех дорожек. Это позволяет определить нуклеотид, находящийся в данном положении цепи ДНК. Переходя от одной полосы к другой полосе (бóльшего размера), можно «прочитать» всю последовательность нуклеотидов.

Для повышения достоверности исследования можно проводить независимый анализ обеих цепей исходной ДНК. Результаты секвенирования впоследствии объединяют, и выявляют все участки, в которых не наблюдается комплементации и где возможны ошибки. Нуклеотидную последовательность этих участков уточняют с помощью дополнительных исследований.



Глава 2

ТЕХНОЛОГИЯ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

Правила организации лаборатории ДНК-анализа

Необходимым условием использования методов ДНК-анализа является правильная организация работы в лаборатории [28]. В связи с высокой чувствительностью реакции амплификации, необходимо учитывать вероятность загрязнения (*контаминации*) исследуемых образцов ДНК посторонней ДНК. Существует три основных потенциальных источника загрязнения:

1. Оборудование и рабочая среда, загрязненные геномной ДНК.
2. Перекрестное загрязнение образцов во время выделения ДНК или постановки ПЦР.
3. Продукты ПЦР предыдущих исследований.

Для предотвращения загрязнения кроме общих правил работы с биологическими объектами, принятых в экспертных лабораториях (прогирка инструментария этиловым спиртом до и после работы с объектом; использование одноразовых стерильных пробирок, наконечников для пипеток; смена наконечника после каждого объекта и т.д.), необходимо дополнительно выполнять специальные антиконтаминационные мероприятия.

Площадь лаборатории должна быть физически разделена на две большие рабочие зоны: зону работы до реакции амплификации и зону работы с амплифицированной ДНК (рис. 14). Если эти зоны располагают в смежных комнатах, то необходимо быть уверенным, что устройство вентиляции обеспечивает движение воздуха в направлении зоны амплифицированной ДНК. Кроме того, каждая комната должна иметь отдельный выход, чтобы предотвратить попадание продуктов ПЦР в зону работы до реакции амплификации. Зона работы до реакции амплификации включает в себя еще три рабочие зоны: зону работы с объектами исследования, зону для выделения

ДНК и зону для постановки ПЦР. В каждой из указанных зон должен иметься полный комплект оборудования и инструментов, необходимых для выполнения задач соответствующей зоны. Рассмотрим специальные антиконтаминационные мероприятия для каждой из рабочих зон.



Рис. 14. Схема организации лаборатории ДНК-анализа. Показан принцип разделения рабочих зон

Зона работы с объектами исследования предназначена только для работы с объектами исследования (осмотр, фотографирование, подготовка материала к исследованию). В этой зоне необходимо:

- в разное время проводить осмотр и получение проб для анализа от объектов исследования и от сравнительных образцов;
- для предотвращения перекрестного загрязнения объектов исследования регулярно менять рабочие перчатки. Выбрасывать их в случае загрязнения и при выходе из зоны;
- использовать для каждого объекта чистые инструменты и чистую рабочую поверхность;
- избегать расходования большого количества материала, чтобы предотвратить получение избыточных количеств ДНК – потенциальных источников загрязнения.

Зона выделения ДНК предназначена для выделения ДНК, приготовления реактивов для выделения ДНК, а также для хранения выделенной ДНК и реактивов для ПЦР. В этой зоне необходимо:

- для предотвращения перекрестного загрязнения объектов исследования производить выделение ДНК из объектов, содержащих большие количества ДНК (например, цельная кровь), и из объектов, содержащих малые количества ДНК (следы крови малых размеров, единичные волосы и т.д.), отдельно;

- в разное время проводить процедуру выделения ДНК из объектов исследования и сравнительных образцов;

- не проводить одновременного выделения ДНК с участием большого числа объектов;

- для предотвращения перекрестного загрязнения объектов исследования регулярно менять рабочие перчатки; выбрасывать их, если на них попала ДНК, а также при выходе из зоны;

- стерилизовать автоклавированием растворы, которые могут быть подвергнуты автоклавированию (лизирующий раствор, ЭДТА, NaCl, SDS, трис-HCl, а также деионизованную воду);

- хранить реагенты разделенными на аликвоты. Работать только с одной аликвотой, что предотвратит загрязнение всего раствора;

- избегать разбрызгивания. Некоторые типы пробирок имеют крышки, открывающиеся с трудом, что может вызывать разбрызгивание при открывании. Перед открыванием жидкость со стенок пробирки рекомендуется сбрасывать путем центрифугирования. Использовать устройство для открывания крышек;

- в процедуру выделения ДНК каждой серии объектов включать контроль выделения ДНК (реагентами без внесения объекта исследования) для выявления наличия загрязнений в реактивах;

- использовать лабораторные халаты, предназначенные только для работы в зоне выделения ДНК.

Зона постановки ПЦР предназначена только для внесения в амплификационные пробирки реагентов ПЦР и ДНК. В этой зоне необходимо:

- использовать для автоматических пипеток одноразовые накопечники с фильтрами;

- работать в перчатках и чистых халатах. Менять перчатки, если на них попала ДНК;

- вносить пробы ДНК в пробирки в последнюю очередь;

- не «выдувать» остатки ДНК из наконечника – это приводит к образованию аэрозоля, который может загрязнять другие пробы ДНК;
- после добавления очередной пробы ДНК закрывать предыдущую пробирку крышкой;
- пробирку с отрицательным контролем (реагенты без ДНК) закрывать в последнюю очередь, после того как во все пробирки уже добавлена ДНК.

Зона работы с амплифицированной ДНК обязательно должна быть отделена от предыдущих зон. Она предназначена для проведения амплификации и всех операций, связанных с анализом продуктов ПЦР. В этой зоне необходимо:

- работать в перчатках; выбрасывать их, если на них попала ДНК, а также при выходе из зоны;
- открывать пробирки с продуктами ПЦР осторожно, не разбрызгивая содержимое;
- использовать амплификатор только для амплификации и денатурации продуктов ПЦР. Не использовать амплификатор в качестве термостата для инкубации неамплифицированной ДНК;
- для оценки неамплифицированной ДНК методом электрофореза вносить в эту зону минимально необходимые аликваты этой ДНК;
- хранить амплифицированную ДНК только в этой зоне.

Выделение ДНК

Выбор метода выделения ДНК

Выделение ДНК из исследуемых биологических объектов является первым и наиболее важным этапом генотипоскопической экспертизы. От качества его исполнения зависит успех всех последующих этапов исследования ДНК. Неправильный выбор метода выделения ДНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо вообще к потере ДНК.

Процедура выделения ДНК должна проводиться в отдельном помещении (в зоне для выделения ДНК), где находятся необходимые оборудование и материалы только для выделения ДНК. Выделять ДНК в зоне, где проводятся манипуляции с амплифицированной ДНК, **запрещено**. Для контроля чистоты выделения ДНК из исследуемого объекта, параллельно проводят процедуру выделения ДНК с теми же реагентами, но без внесения объекта исследования.

Впоследствии полученную пробу используют при постановке реакции амплификации. Выявление амплифицированных фрагментов в этой пробе означает, что реагенты для выделения ДНК и контролируемая проба ДНК загрязнены посторонней ДНК.

Рассмотрим два основных метода выделения ДНК, используемых при проведении генотипоскопической экспертизы: фенольный метод [29] и метод выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100 [30].

При выборе метода необходимо учитывать вид объекта, его состояние, давность образования и условия хранения.

Фенольный метод является универсальным и может быть применен для выделения ДНК практически из любых объектов, содержащих ДНК. При использовании этого метода происходит наиболее полное удаление белков и различных клеточных компонентов, в результате чего удастся получить ДНК высокой степени очистки, пригодную для длительного хранения. К недостаткам метода относятся необходимость применения высокотоксичных реактивов и длительность процедуры выделения ДНК. Кроме того, при использовании фенольного метода часть ДНК, содержащейся в исследуемом объекте, может теряться. Поэтому этот метод особенно эффективен, когда объект содержит относительно большое количество ДНК.

Метод выделения ДНК с использованием Chelex 100 можно применять только тогда, когда исследуемый объект не содержит больших количеств белков, его клетки легко лизируются и объект не подвергался длительному хранению. По сравнению с фенольным методом, выделение ДНК с использованием Chelex 100 не требует применения токсичных реактивов и проводится в течение более короткого времени. Процедура выделения ДНК включает в себя небольшое количество этапов, что потенциально снижает вероятность перекрестной контаминации ДНК между разными объектами. Недостатком же метода является невысокая степень очистки ДНК от белковых примесей, которые могут являться ингибиторами полимеразной цепной реакции.

После выбора метода его модифицируют для конкретного объекта в соответствии с приведенными ниже протоколами [25, 28, 31–37]. Прописи растворов, используемых на различных этапах ДНК-анализа, и некоторые справочные данные по электрофорузу ДНК представлены в приложении.

Фенольный метод выделения ДНК

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КРОВИ

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из жидкой крови и из пятен крови.

I. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,5 мл лизирующего раствора, вносят 10–50 мкл жидкой крови или 1 см² пятна крови.

Примечание. В зависимости от вида пятна, сроков его образования и условий хранения размер вырезки может быть увеличен или уменьшен.

II. Добавляют 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), и перемешивают.

III. Инкубируют при температуре 56 °С не менее 1 ч.

Примечание. Для пятен, представленных в качестве вещественных доказательств, длительность инкубации должна быть увеличена до 6–18 ч: не рекомендуется инкубировать более 24 ч. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении, при котором обеспечивается наилучшее пропитывание материала лизирующим раствором.

IV. При выделении ДНК из пятна крови удаляют предмет-носитель: стерильным пинцетом его переносят в наконечник для автоматической пипетки. Наконечник с предметом-носителем помещают в микроцентрифужную пробирку, из которой он был извлечен, так, чтобы уровень жидкости в пробирке и наконечнике находился ниже предмета-носителя. Центрифугируют в течение 10 с при 10 000–15 000 g (максимальной скорости). После этого наконечник с отжатым предметом-носителем удаляют.

V. Проводят очистку раствора ДНК от белковых примесей.

Внимание! Фенол вызывает тяжелые ожоги, хлороформ является канцерогеном. Работать в химически устойчивых перчатках и защитных очках. Использовать вытяжной шкаф.

1. В пробирку с продуктами лизиса добавляют равный объем смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25:24:1). Закрывают пробирку крышкой и тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 15–30 с до образования однородной эмульсии.

2. Центрифугируют в течение 3–5 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) до разделения двух фаз.

3. Осторожно переносят водную фазу (верхнюю) в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, стараясь не захватить нижнюю фазу и интерфазу, содержащие белковые компоненты.

Если не удалось перенести всю водную фазу, не повредив интерфазы, то необходимо повторить пп. 2 и 3.

VI. Повторяют п. V еще 2–3 раза до тех пор, пока не перестанет образовываться белковая интерфаза и пока водная фаза не станет чистой.

Примечание. При проведении этих дополнительных очисток можно удалить нижнюю фазу, содержащую фенол–хлороформ–изоамиловый спирт. При этом отпадает необходимость в использовании новых микроцентрифужных пробирок и исключаются потери водной фазы при перенесении из одной пробирки в другую.

VII. Проводят очистку раствора ДНК от органических веществ, не экстрагируемых фенолом.

1. В пробирку, содержащую водную фазу, добавляют равный объем водонасыщенного *n*-бутанола. Тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 15–30 с до образования однородной эмульсии.

2. Центрифугируют в течение 3–5 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости) до разделения двух фаз.

3. Осторожно переносят водную фазу (**нижнюю**) в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, стараясь не захватить верхнюю фазу.

VIII. Проводят очистку раствора ДНК от следов фенола и *n*-бутанола.

Внимание! Диэтиловый эфир – легковоспламеняющееся вещество. Работать во взрывобезопасном шкафу.

1. В пробирку, содержащую водную фазу, добавляют равный объем водонасыщенного диэтилового эфира. Тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 15–30 с до образования однородной эмульсии.

2. Центрифугируют в течение 3–5 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости) до разделения двух фаз.

3. Осторожно удаляют верхнюю фазу, содержащую диэтиловый эфир. Для удаления следов эфира водную фазу в течение 5 мин инкубируют при температуре 70 °С (крышка пробирки должна быть открыта!).

IX. Проводят концентрирование и очистку раствора ДНК от водорастворимых веществ.

Примечание. Если исходный объект содержал более 500 нг ДНК (приблизительно 10 мкл жидкой крови), то проводят действия по п. 1; если меньше 500 нг – по п. 2.

1. Проводят осаждение ДНК с помощью этанола:

а) к раствору ДНК добавляют 5М раствор NaCl до концентрации 0,2М, затем вносят 2 объема 96% этанола, тщательно перемешивают и оставляют при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 1–2 ч (или на ночь);

б) центрифугируют в течение 10 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) и удаляют супернатант;

в) к осадку добавляют 1 мл 80% этанола, тщательно перемешивают, снова центрифугируют в том же режиме и удаляют супернатант;

г) осадок высушивают и растворяют в 30–50 мкл деионизованной воды или TE-буфере.

2. Проводят концентрирование и очистку ДНК с помощью устройства Centricon 100:

а) собирают устройство Centricon 100 согласно инструкции изготовителя и переносят раствор ДНК в верхний резервуар устройства;

б) доводят объем жидкости в верхнем резервуаре до 2 мл с помощью TE-буфера или деионизованной воды. Заклеивают резервуар пленкой Parafilm и прокалывают пленку стерильной препаративной иглой;

в) центрифугируют устройство Centricon 100 в центрифуге с фиксированным углом ротора в течение 20 мин при 1 000 g. ДНК концентрируется в верхнем резервуаре в объеме порядка 15–50 мкл, а молекулы величиной менее 100 000 дальтон вместе с жидкостью проходят через мембрану в нижний резервуар. Жидкость, скопившуюся в нижнем резервуаре, удаляют.

Примечание. Мембрана устройства Centricon 100 чувствительна к скорости центрифуги, поэтому не следует превышать значение 1 000 g¹, иначе это приведет к повреждению мембраны Centricon 100 и потере ДНК. Если объем жидкости в верхнем резервуаре превышает 15–50 мкл, то допустимо увеличить время центрифугирования:

г) повторяют действия пп. б и в еще 2 раза;

д) накрывают верхний резервуар с 15–50 мкл раствора ДНК пробиркой, прилагаемой к устройству Centricon 100, переворачивают устройство и центрифугируют в течение 2 мин при 500 g для перенесения раствора ДНК в пробирку.

Х. Полученный раствор ДНК хранят при температуре 2–6 или $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

¹ Для вычисления скорости центрифуги в об/мин используют следующую формулу:

$$n = \sqrt{\frac{1000}{1118 \cdot 10^{-7} \cdot r}}$$

где n – скорость вращения, об/мин; 1 000 – сила центрифуги, равная 1 000 g; r – радиус, см (расстояние от оси вращения центрифуги до фильтрующего основания устройства).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СПЕРМЫ

Данный протокол дифференциального лизиса клеток можно использовать для выделения ДНК из любых объектов, содержащих сперму.

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с 1 мл деионизованной воды вносят вырезку из объекта, содержащего сперму.

Примечание. Размер вырезки зависит от вида объекта, давности его образования и условий хранения. При выделении ДНК из объектов, подвергшихся длительному хранению, рекомендуется заменить деионизованную воду на 10% раствор уксусной кислоты.

2. Инкубируют при температуре 2–6 °С в течение 6–18 ч.

3. Тщательно перемешивают содержимое пробирки с использованием vortex в течение 15–20 с и удаляют предмет-носитель по п. IV протокола «Выделение ДНК из крови».

Примечание. Не следует выбрасывать предмет-носитель до проведения цитологического исследования (там же, п. VI). Если в результате этого исследования не будут обнаружены сперматозоиды, то необходимо провести инкубацию предмета-носителя в 10% растворе уксусной кислоты (т.е. повторить п. 2).

4. Центрифугируют содержимое пробирки в течение 1 мин при 10 000 g.

5. Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл. Суспендируют осадок в оставшемся объеме с помощью автоматической пипетки.

Примечание. Этот осадок содержит сперматозоиды, а в зависимости от объекта может содержать клетки эпителия, крови и т.д.

6. Проводят цитологическое исследование клеточного осадка:

а) приблизительно 3 мкл взвеси клеток переносят на предметное стекло и подсушивают;

б) фиксируют клетки этиловым спиртом в течение 15 мин либо путем прогревания препарата в термостате при температуре 56 °С в течение 30 мин;

в) окрашивают препарат азур-эозиновой смесью в течение 20 мин при комнатной температуре. Азур-эозиновую смесь готовят непосредственно перед использованием; соотношение смеси эозин-вода-азур 1:3,5:1,5. Смывают краску дистиллированной водой, и высушивают препарат;

г) микроскопируют препарат, используя объектив 90^x масляной иммерсии. При обнаружении сперматозоидов проводят дальнейшее исследование. Если в препарате имеются эпителиальные клетки, то выполняют процедуру дифференциального лизиса (начиная с п. 7). Если эпителиальных клеток (или клеток крови) не обнаружено, то,

не проводя процедуру дифференциального лизиса, переходят к выполнению действий п. 10.

7. Проводят лизис эпителиальных клеток:

Примечание. Если для извлечения спермы использовался 10% раствор уксусной кислоты (см. п. 1), то перед проведением лизиса клеточный осадок необходимо однократно промыть деионизованной водой. Для этого в пробирку со взвесью клеточного осадка добавляют 1 мл деионизованной воды, перемешивают с использованием vortex и центрифугируют в течение 1 мин при 10 000 g. Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл;

а) к клеточному осадку добавляют 0,5 мл лизирующего раствора и 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл). Содержимое пробирки тщательно перемешивают;

б) инкубируют при температуре 56 °С не менее 1 ч.

Примечание. Для уменьшения лизиса спермы не следует проводить инкубацию более 2 ч;

в) центрифугируют содержимое пробирки в течение 5 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости);

г) осторожно переносят супернатант в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

Примечание. Супернатант содержит продукты лизиса клеток эпителиальной фракции. ДНК эпителиальной фракции может быть очищена параллельно с ДНК спермальной фракции (п. 11).

8. Отмывают осадок, содержащий сперматозоиды:

а) суспендируют осадок в 0,5 мл лизирующего раствора;

б) центрифугируют в течение 5 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости);

в) осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл;

г) повторяют действия, описанные в пп. а–в, еще 1–2 раза;

Примечание. Дополнительные промывания рекомендуются в случаях, когда отношение количества эпителиальных клеток к количеству сперматозоидов велико;

д) суспендируют осадок в 1 мл деионизованной воды;

е) центрифугируют в течение 5 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости);

ж) осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл. Суспендируют осадок в оставшемся объеме с помощью автоматической пипетки.

9. Проводят цитологическое исследование клеточного осадка, как описано в п. 6. Если в препарате кроме сперматозоидов имеются эпителиальные клетки, то необходимо повторить процедуру дифференциального лизиса (п. 7), сократив время инкубации при температуре 56 °С до 30 мин, и повторить отмывание осадка (п. 8).

10. Проводят лизис сперматозоидов:

Примечание. Если для извлечения спермы использовался 10% раствор уксусной кислоты (п. 1) и не проводилась процедура дифференциального лизиса (п. 7), то перед проведением лизиса осадок, содержащий сперматозоиды, необходимо однократно промыть деионизованной водой. Для этого в пробирку с осадком добавляют 1 мл деионизованной воды, перемешивают с использованием vortex и центрифугируют в течение 1 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости). Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл;

а) к осадку добавляют: 0,5 мл лизирующего раствора; 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл); 20 мкл 1M раствора DTT (до конечной концентрации 40 mM). Содержимое пробирки тщательно перемешивают;

б) инкубируют при температуре 56 °C не менее 1 ч.

Примечание. Для объектов, представленных в качестве вещественных доказательств, длительность инкубации должна быть увеличена до 6–18 ч.

11. Далее проводят очистку раствора ДНК эпителиальной фракции (п. 7) и раствора ДНК спермальной фракции (п. 10) фенольным методом по протоколу «Выделение ДНК из крови» (начиная с п. V).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из мышечных тканей без гнилостных изменений и из мумифицированных тканей.

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,5 мл лизирующего раствора, вносят фрагмент мышечной ткани размером 5×5 мм.

Примечание. Размер фрагмента зависит от вида объекта, сроков и условий его хранения.

2. Добавляют 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), и перемешивают.

3. Инкубируют при температуре 56 °C в течение 6–18 ч до растворения фрагмента ткани.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении.

4. Центрифугируют продукты лизиса в течение 1 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения нерастворившихся компонентов и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

5. Далее проводят очистку раствора ДНК фенольным методом по протоколу «Выделение ДНК из крови» (начиная с п. V).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КОСТЕЙ

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из компактного вещества костной ткани.

1. Исследуемую кость отмывают от остатков мягких тканей и поверхностно стерилизуют в 3% растворе перекиси водорода в течение 18 ч. После этого ополаскивают кость стерильной дистиллированной водой и измельчают.

2. В пластиковую центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую 7,5 мл лизирующего раствора, помещают 1–2 г костного порошка.

Примечание. Не рекомендуется проводить выделение ДНК из костного порошка массой менее 1 г.

3. Добавляют 225 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), и 300 мкл 1М раствора ДТТ (до конечной концентрации 40 mM). Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

4. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 6–8 ч.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении.

5. Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

6. К продуктам лизиса снова добавляют 225 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К, и 300 мкл 1М раствора ДТТ. Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

7. Инкубируют при температуре 56 °С в течение ночи. Общее время первой и второй инкубаций (пп. 4, 7) должно быть не менее 20 ч.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении.

8. Центрифугируют продукты лизиса в центрифуге с фиксированным углом ротора в течение 5 мин при 1 000 g для отделения нерастворившихся компонентов.

9. Осторожно переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую центрифужную пробирку объемом 15 мл.

10. Далее проводят очистку раствора ДНК фенольным методом по протоколу «Выделение ДНК из крови» (начиная с п. V). Для концентрирования и очистки раствора ДНК от водорастворимых веществ используют Centricon 100 (там же, п. IX–2).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ВОЛОС

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из единичных волос, содержащих луковицу.

1. Перед выделением ДНК исследуемый волос промывают в 50 мл деионизованной воды.

2. С помощью бинокулярной лупы стерильным скальпелем отрезают луковицу с фрагментом стержня длиной 1 см.

3. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 0,5 мл лизирующего раствора, вносят фрагмент волоса с луковицей.

Примечание. Так как поверхность волоса может быть загрязнена посторонними биологическими следами (например, кровью), то для контроля чистоты выделения ДНК параллельно проводят процедуру выделения ДНК из фрагмента волоса длиной 5–10 мм, срезанного со стороны периферического конца (полученную пробу используют в качестве контроля при постановке реакции амплификации).

4. Добавляют 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,3 мг/мл), и 20 мкл 1М раствора DTT (до конечной концентрации 40 mM). Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

Внимание! Стержень волоса должен быть полностью погружен в лизирующий раствор.

5. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 6–8 ч. За это время волос размягчается, однако полностью не растворяется.

6. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

7. К продуктам лизиса снова добавляют 15 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К, и 20 мкл 1М раствора DTT. Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

8. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 6–8 ч или в течение ночи. За это время волос практически полностью растворяется.

9. Центрифугируют продукты лизиса в течение 1 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения пигмента и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

10. Далее проводят очистку раствора ДНК фенольным методом по протоколу «Выделение ДНК из крови» (начиная с п. V). Для концентрирования и очистки раствора ДНК от водорастворимых веществ используют Centricon 100 (там же, п. IX–2).

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ВЫРВАННЫХ ВОЛОС

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК только из вырванных волос, содержащих луковицу с влагалищными оболочками. Такие волосы обычно содержат более 100 нг ДНК. Если растворить волос в 100 мкл, то это обеспечит получение концентрации ДНК в растворе более 1 нг/мкл, что достаточно для проведения реакции амплификации. Растворение волоса с помощью неионного дстергента, не оказывающего влияния на *Taq*-полимеразу, позволяет использовать продукты лизиса волоса непосредственно при реакции амплификации.

1. Перед выделением ДНК исследуемый волос промывают в 50 мл деионизованной воды.

2. С помощью бинокулярной лупы стерильным скальпелем отрезают луковицу с фрагментом стержня длиной 1 см.

3. В микроцентрифужную пробирку, содержащую 100 мкл быстрого лизирующего раствора, вносят фрагмент волоса с луковицей.

Примечание. Так как поверхность волоса может быть загрязнена посторонними биологическими следами (например, кровью), то для контроля чистоты выделения ДНК параллельно проводят процедуру выделения ДНК из фрагмента волоса длиной 5–10 мм, срезанного со стороны периферического конца (полученную пробу используют в качестве контроля при постановке реакции амплификации).

4. Инкубируют при температуре 56 °С 6–18 ч до растворения волоса.

Внимание! Стержень волоса должен быть полностью погружен в быстрый лизирующий раствор.

5. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

6. Инкубируют при температуре 95 °С в течение 10 мин для инактивации протеиназы К.

7. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

8. Центрифугируют продукты лизиса в течение 1 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения пигмента и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

9. Хранят полученный раствор ДНК при температуре –20 °С.

Метод выделения ДНК с использованием Chelex 100

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КРОВИ

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из жидкой крови и из пятен крови, не подвергавшихся длительному хранению.

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 1 мл деионизованной воды, вносят 3–10 мкл жидкой крови или 0,5 см² пятна крови.

Примечание. В зависимости от вида пятна, размер вырезки может быть уменьшен или увеличен, однако внесение большого количества крови может привести к ингибированию реакции амплификации.

2. Инкубируют при комнатной температуре 15–30 мин.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении, при котором обеспечивается наилучшее пропитывание материала.

3. Центрифугируют содержимое пробирки в течение 2–3 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости).

4. Осторожно, не повреждая клеточного осадка, удаляют супернатант, оставив приблизительно 20 мкл. Если исследуется пятно крови, то вместе с клеточным осадком в пробирке оставляют предмет-носитель.

5. Добавляют 5% взвесь Chelex 100 до конечного объема 200 мкл, и содержимое пробирки перемешивают.

6. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 15–30 мин.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении, при котором обеспечивается наилучшее пропитывание материала.

7. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

8. Центрифугируют в течение 10–20 с при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

9. Инкубируют при температуре 100 °С в течение 8 мин.

10. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

11. Центрифугируют в течение 2–3 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения ионообменной смолы и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

12. Полученный раствор ДНК хранят при температуре 2–6 или –20 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СПЕРМЫ

Данный протокол дифференциального лизиса клеток можно использовать для выделения ДНК из любых объектов, содержащих сперму.

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 1 мл деионизованной воды, вносят вырезку из объекта, содержащего сперму.

Примечание. Размер вырезки зависит от вида объекта, давности его образования и условий хранения. При выделении ДНК из объектов, подвергшихся длительному хранению, рекомендуется заменить деионизованную воду на 10% раствор уксусной кислоты.

2. Инкубируют при температуре 2–6 °С в течение 6–18 ч.

3. Тщательно перемешивают содержимое пробирки с использованием vortex в течение 15–30 с и удаляют предмет-носитель: стерильным пинцетом его переносят в наконечник для автоматической пипетки. Наконечник с предметом-носителем помещают в микроцентрифужную пробирку, из которой он был извлечен, так, чтобы уровень жидкости в пробирке и наконечнике находился ниже предмета-носителя. Центрифугируют в течение 10 с при 10 000–15 000 g (максимальной скорости).

Примечание. Не следует выбрасывать предмет-носитель до проведения цитологического исследования (п. 6). Если в результате этого исследования не будут обнаружены сперматозонды, то необходимо провести инкубацию предмета-носителя в 10% растворе уксусной кислоты (т.е. повторить п. 2).

4. Центрифугируют содержимое пробирки в течение 1 мин при 10 000 g.

5. Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл. Суспендируют осадок в оставшемся объеме с помощью автоматической пипетки.

Примечание. Этот осадок содержит сперматозонды, а в зависимости от объекта может содержать клетки эпителия, крови и т.д.

6. Проводят цитологическое исследование клеточного осадка по п. 6 протокола «Выделение ДНК из спермы фенольным методом». При обнаружении сперматозоидов проводят дальнейшее исследование. Если в препарате имеются эпителиальные клетки, то выполняют процедуру дифференциального лизиса (начиная с п. 7). Если эпителиальных клеток (или клеток крови) не обнаружено, то, не проводя процедуру дифференциального лизиса, переходят к выполнению действий п. 10.

7. Проводят лизис эпителиальных клеток:

Примечание. Если для извлечения спермы использовался 10% раствор уксусной кислоты (см. п. 1), то перед проведением лизиса клеточный осадок необходимо однократно промыть деионизованной водой. Для этого в пробирку со взвесью кле-

точного осадка добавляют 1 мл деионизованной воды, перемешивают с использованием vortex и центрифугируют в течение 1 мин при 10 000 г. Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл;

а) к клеточному осадку добавляют ТЕ-буфер до конечного объема 200 мкл;

б) добавляют 2–6 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К, и тщательно перемешивают.

Примечание. Если количество эпителиальных клеток мало (до 20 клеток в поле зрения микроскопа), то используют 2 мкл раствора протеиназы К. Если отношение количества эпителиальных клеток к количеству сперматозоидов велико (10:1), то используют до 6 мкл раствора протеиназы К;

в) инкубируют при температуре 56 °С не менее 1 ч.

Примечание. Для уменьшения лизиса спермы не следует проводить инкубацию более 2 ч;

г) центрифугируют содержимое пробирки в течение 5 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости);

д) осторожно переносят 150 мкл супернатанта в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, и добавляют 50 мкл 20% взвеси Chelex 100.

Примечание. Супернатант содержит продукты лизиса клеток эпителиальной фракции. ДНК эпителиальной фракции может быть очищена параллельно с ДНК спермальной фракции (п. 11).

8. Отмывают осадок, содержащий сперматозоиды:

а) суспендируют осадок в 0,5 мл лизирующего раствора;

б) центрифугируют в течение 5 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости);

в) осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 50 мкл;

г) повторяют действия, описанные в пп. а–в, еще 1–2 раза;

Примечание. Дополнительные промывания рекомендуются в случаях, когда отношение эпителиальных клеток к сперматозоидам велико.

д) суспендируют осадок в 1 мл деионизованной воды;

е) центрифугируют в течение 5 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости);

ж) осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 25 мкл. Суспендируют осадок в оставшемся объеме с помощью автоматической пипетки.

9. Проводят цитологическое исследование клеточного осадка по п. 6 протокола «Выделение ДНК из спермы фенольным методом». Если в препарате кроме сперматозоидов имеются эпителиальные клетки, то необходимо повторить процедуру дифференциального лизиса (п. 7), сократив время инкубации при температуре 56 °С до 30 мин, и повторить отмывание осадка (п. 8).

10. Проводят лизис сперматозоидов:

Примечание. Если для извлечения спермы использовался 10% раствор уксусной кислоты (п. 1) и не проводилась процедура дифференциального лизиса (п. 7), то перед проведением лизиса осадок, содержащий сперматозоиды, необходимо однократно промыть деионизованной водой. Для этого в пробирку с осадком добавляют 1 мл деионизованной воды, перемешивают с использованием vortex и центрифугируют в течение 1 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости). Осторожно удаляют супернатант, оставив приблизительно 25 мкл.

а) к осадку добавляют 5% взвесь Chelex 100 до конечного объема 200 мкл, 2 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К, и 7 мкл 1М раствора ДТТ. Содержимое пробирки тщательно перемешивают;

б) инкубируют при температуре 56 °С 30–60 мин.

11. Тщательно перемешивают раствор ДНК спермальной фракции (п. 10) и раствор ДНК эпителиальной фракции (п. 7) с использованием vortex в течение 5–10 с.

12. Центрифугируют в течение 10–20 с при 10 000–15 000 г (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

13. Инкубируют при температуре 100 °С в течение 8 мин.

14. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

15. Центрифугируют в течение 2–3 мин при 10 000–15 000 г (максимальной скорости) для отделения ионообменной смолы и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

16. Хранят полученный раствор ДНК при температуре 2–6 или –20 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СЛЮНЫ

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из пятен слюны и объектов, содержащих слюну.

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл 5% взвеси Chelex 100, вносят вырезку из пятна слюны размером 5×5 мм.

Примечание. Размер вырезки в зависимости от вида пятна может быть уменьшен или увеличен.

2. Добавляют 2 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К, и содержимое пробирки перемешивают.

3. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 15–30 мин.

Примечание. Эффективность выделения ДНК может быть повышена, если на время инкубации поместить пробирку на качающуюся платформу в горизонтальном положении, при котором обеспечивается наилучшее пропитывание материала.

4. Содержимое пробирки перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

5. Центрифугируют в течение 10–20 с при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

6. Инкубируют при температуре 100 °С в течение 8 мин.

7. Содержимое пробирки перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

8. Центрифугируют в течение 2–3 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения ионообменной смолы и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

9. Хранят полученный раствор ДНК при температуре 2–6 или –20 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ВОЛОС

Данный протокол можно использовать для выделения ДНК из единичных волос, содержащих луковицу.

1. Перед выделением ДНК промывают исследуемый волос в 50 мл деионизованной воды.

2. С помощью бинокулярной лупы стерильным скальпелем отрезают луковицу с фрагментом стержня длиной 1 см.

3. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл 5% взвеси Chelex 100, вносят фрагмент корневого конца волоса с луковицей.

Примечание. Так как поверхность волоса может быть загрязнена посторонними биологическими следами (например, кровью), то для контроля чистоты выделения ДНК параллельно проводят процедуру выделения ДНК из фрагмента волоса длиной 5–10 мм, срезанного со стороны периферического конца (полученную пробу используют при постановке реакции амплификации).

4. Добавляют 2 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К (до конечной концентрации 0,1 мг/мл), и 7 мкл 1М раствора ДТТ (до конечной концентрации 35 mM). Содержимое пробирки тщательно перемешивают.

Внимание! Стержень волоса должен быть полностью погружен в раствор.

5. Инкубируют при температуре 56 °С в течение 6–18 ч до растворения волоса.

6. Содержимое пробирки тщательно перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

7. Центрифугируют в течение 10–20 с при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

8. Инкубируют при температуре 100 °С в течение 8 мин.

9. Содержимое пробирки перемешивают с использованием vortex в течение 5–10 с.

10. Центрифугируют в течение 2–3 мин при 10 000–15 000 g (максимальной скорости) для отделения ионообменной смолы и нерастворившихся компонентов, и переносят супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

11. Проводят концентрирование раствора ДНК с помощью устройства Centricon 100 по п. IX–2 протокола «Выделение ДНК из крови фенольным методом».

12. Хранят полученный раствор ДНК при температуре 2–6 или –20 °С.

Оценка выделенной ДНК

Оценка выделенной ДНК проводится в зоне работы с амплифицированной ДНК. Это связано с общностью методов, применяемых на этапе оценки выделенной ДНК и на этапе анализа амплифицированных фрагментов. В зоне для выделения ДНК проводится лишь приготовление аликвот из проб выделенной ДНК. **Недопустимы** перенесение всей пробы с выделенной ДНК и манипуляции с ней в зоне анализа амплифицированных фрагментов.

Наиболее простым и доступным методом оценки выделенной ДНК является метод электрофореза в агарозном геле. Достоинством этого метода является то, что (кроме оценки концентрации полученного раствора ДНК) имеется возможность установить величину фрагментов выделенной ДНК, т.е. оценить степень ее деградации. К недостаткам метода следует отнести относительно невысокую чувствительность метода; кроме того, при выделении ДНК из объектов, которые могут быть загрязнены бактериальной микрофлорой, не представляется возможным отличить ДНК человека от бактериальной ДНК. Это может привести к ошибочному занижению количества ДНК, вносимого в реакционную смесь при постановке реакции амплификации, и соответственно – к ее неуспешному результату.

Готовят гель для электрофореза и проводят электрофорез следующим образом:

1. Нагревают 1% раствор агарозы, приготовленный на 1× TBE-буфере, до полного растворения агарозы (для этого удобно использовать СВЧ-печь).

2. Остудив раствор до температуры 50–60 °С, его выливают в форму, и помещают в нее гребенку для образования лунок. В качестве формы удобно использовать крышку от плашек для иммунологических исследований. Толщина геля должна быть приблизительно 3 мм.

3. После застывания геля гребенку удаляют, и переносят форму вместе с гелем в электрофорезную камеру для горизонтального электрофореза.

4. Заполняют камеру 1× ТВЕ-буфером так, чтобы гель находился под слоем буфера толщиной 1–2 мм.

5. Подготавливают пробы ДНК:

— смешивают 1–10 мкл исследуемой ДНК (1–3 мкл, если ДНК выделена фенольным методом, и до 10 мкл, если ДНК выделена с помощью Chelex 100) с буфером для нанесения проб в соотношении 1:6;

— подготавливают маркерную пробу ДНК, содержащую фрагменты ДНК с известными длинами (например, рGEM DNA Markers), при этом смешивают 4 мкл пробы с 1 мкл буфера для нанесения проб;

— аналогично подготавливают несколько проб ДНК с известным количеством ДНК (например, 1, 5, 10 и 20 нг).

6. Вносят подготовленные пробы в лунки геля, и проводят электрофорез при постоянном напряжении, не превышающем 7,5 В/см (напряжение рассчитывается, исходя из расстояния между электродами), в течение 30 мин или до тех пор, пока расстояние между лунками и фронтом краски не достигнет 5 см.

7. По окончании электрофореза форму с гелем помещают на 20 мин в раствор, содержащий 0,5 мкг/мл бромида этидия, после чего промывают гель дистиллированной водой и осматривают гель в УФ-излучении.

Внимание! Бромид этидия является мутагеном. Избегать контакта с кожей. Работать в перчатках, халате и защитных очках. УФ-излучение вызывает ожоги. Осматривать гель только в защитных очках.

Для повышения чувствительности метода рекомендуется сфотографировать гель через красный светофильтр и анализировать результаты электрофореза по полученному негативу.

Качество ДНК оценивается по расположению ее фрагментов относительно фрагментов маркерной ДНК. При отсутствии деградации ДНК выявляют четкую дискретную полосу, располагающуюся выше фрагментов, длиной 2 000 п.н. При наличии деградации той или иной степени на дорожке наблюдают «шлейф» из фрагментов

ДНК различной длины. Величина этих фрагментов соответствует длине последовательности ДНК, которую, вероятнее всего, удастся проамплифицировать.

Сравнивая интенсивность свечения исследуемой ДНК с интенсивностью свечения проб с известным количеством ДНК, определяют количество ДНК в пробе.

Типирование локусов ДНК

Типирование локусов ДНК включает два этапа генотипоскопической экспертизы: проведение амплификации и анализ амплифицированных фрагментов ДНК. Эти этапы должны осуществляться в различных помещениях. Постановка реакции амплификации проводится в зоне проведения амплификации; анализ амплифицированных фрагментов – в зоне для работы с амплифицированной ДНК. **Недопустимы** объединение этих двух зон и применение для этих двух этапов одного и того же оборудования.

Типирование STR-локусов с помощью наборов GenePrint STR System

НАБОРЫ GENEPRINT STR SYSTEM

Наборы серии *GenePrint STR System* [38] изготавливаются фирмой Promega Corporation (США). В настоящее время производятся наборы для амплификации последовательностей отдельных аутосомных STR-локусов (моноплексы: CSF1PO, F13A01, F13B, FESFPS, LPL, TH01, TPOX и vWA), STR-локуса, локализованного на X-хромосоме (HPRTB), и наборы для одновременной амплификации последовательностей трех локусов (триплексы: CTT, FFv и Silver STR III). Триплекс CTT включает в себя: локусы CSF1PO, TPOX и TH01; триплекс FFv – F13A01, FESFPS и vWA; триплекс Silver STR III – D16S539, D7S820 и D13S317. Кроме того, производится набор для установления пола – Amelogenin. Особенностью триплекса CTT является возможность его использования совместно с набором для установления пола Amelogenin. При этом одновременно проводится амплификация четырех локусов. Наборы выпускаются в двух модификациях (они могут содержать реагенты для проведения либо 100, либо 400 реакций).

Каждый набор включает:

- 1) реагенты для амплификации:
буфер для ПЦР (STR 10× Buffer),

раствор праймеров (10× Primer Pair),
раствор контрольной ДНК (K562, 10 нг/мкл);
2) реагенты для анализа амплифицированных фрагментов:
раствор для нанесения проб (STR 2× Loading Solution),
аллельный маркер (Allelic Ladder),

раствор маркерной ДНК, содержащий фрагменты ДНК известной длины (pGEM DNA Markers, 20 нг/мкл).

Реагенты для амплификации и реагенты для анализа амплифицированных фрагментов должны храниться отдельно, при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (при этом их срок годности неограничен).

Перед использованием набора реагенты для амплификации (буфер для PCR и раствор праймеров) должны быть разделены на аликвоты по 40–50 реакций. Рабочей является лишь одна аликвота. Разделение реагентов на аликвоты исключает возможность загрязнения всего набора посторонней ДНК, а также сокращает количество циклов разморозки–заморозки, снижающих качество реактивов.

Наборы *GenePrint* STR System необходимо доукомплектовать *Taq* ДНК-полимеразой (5 ед/мкл), которую также необходимо разделить на аликвоты по 50 ед.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Программирование режимов амплификации

Наборы серии *GenePrint* STR System были разработаны для использования совместно с амплификаторами фирмы Perkin-Elmer (США). Применение амплификаторов других фирм-изготовителей может снижать выход продуктов реакции амплификации и приводить к несбалансированной амплификации между локусами в случае использования триплексов.

Ниже приведены режимы амплификации, рекомендуемые изготовителем реактивов для амплификаторов модели GeneAmp PCR System 9600 фирмы Perkin-Elmer, которыми оснащены большинство ЭКП ОВД (табл. 1).

Особенностью этих режимов является программирование времени перехода между температурами, которые заданы в циклах. Это позволяет добиться максимальной повторяемости результатов амплификации в разных опытах и на разных приборах. В эти режимы включена также иницирующая инкубация при температуре $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин. Данная инкубация рекомендуется в тех случаях, когда в качестве ДНК-полимеразы используется AmpliTaq DNA

polymerase производства фирмы Perkin-Elmer. Заключительным этапом реакции амплификации является инкубация при температуре 4 °С. Это предусмотрено для возможности хранения амплифицированных проб в амплификаторе. Выполнение амплификатором этого этапа означает завершение реакции амплификации.

Таблица 1

Режимы амплификации для прибора GeneAmp PCR System 9600

№ п/п	Амплифицируемые локусы	Время перехода к заданной температуре	Температура и длительность инкубации	Количество циклов		
1	Триплекс СТТ, триплекс СТТ с Amelogenin, Amelogenin, CSF1PO, F13A01, TH01, TPOX		96 °С – 2 мин	} 10		
		50 с до	94 °С – 1 мин			
		30 с до	64 °С – 1 мин			
				15 с до	70 °С – 1,5 мин	} 20
				45 с до	90 °С – 1 мин	
				26 с до	64 °С – 1 мин	
				15 с до	70 °С – 1,5 мин	
					4 °С – ∞	
		2	Триплекс FFv		96 °С – 2 мин	} 10
				50 с до	94 °С – 1 мин	
34 с до	60 °С – 1 мин					
				25 с до	70 °С – 1,5 мин	} 20
				45 с до	90 °С – 1 мин	
				30 с до	60 °С – 1 мин	
				25 с до	70 °С – 1,5 мин	
					60 °С – 30 мин	
			4 °С – ∞			
3	Триплекс Silver STR III		96 °С – 2 мин	} 10		
		-	94 °С – 30 с			
		68 с до	60 °С – 30 с			
				50 с до	70 °С – 45 с	} 20
				-	90 °С – 30 с	
				60 с до	60 °С – 30 с	
				50 с до	70 °С – 45 с	
					60 °С – 30 мин	
			4 °С – ∞			
4	F13B, FESFPS, HPRTB, LPL, vWA		96 °С – 2 мин	} 10		
		50 с до	94 °С – 1 мин			
		34 с до	60 °С – 1 мин			
				25 с до	70 °С – 1,5 мин	} 20
				45 с до	90 °С – 1 мин	
				30 с до	60 °С – 1 мин	
				25 с до	70 °С – 1,5 мин	
					4 °С – ∞	

Постановка реакции амплификации

Для предотвращения контаминации ДНК между исследуемыми пробами ДНК при пипетировании реактивов и проб ДНК рекомендуется использовать специальные наконечники с фильтром, а также работать в перчатках.

Реакцию амплификации проводят по протоколу:

1. Размораживают пробирку с аликвотой буфера для PCR (STR 10× Buffer) и пробирку с аликвотой раствора, содержащего праймеры (10× Primer Pair).

2. Пробирки, содержащие STR 10× Buffer, 10× Primer Pair, *Taq* ДНК-полимеразу (5 ед/мкл) и бычий сывороточный альбумин (BSA fraction V, 4 мг/мл), перемешивают с использованием vortex. Центрифугируют в течение 5–10 с для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки. Помещают пробирки на лед.

3. Определяют количество используемых реакций, исходя из количества исследуемых проб ДНК и контролей выделения ДНК, а также учитывая положительный и отрицательный контроли реакции амплификации.

4. Готовят PCR Master Mix, внося в микроцентрифужную пробирку объемом 0,5 мл следующие объемы реагентов, умноженные на число реакций (n):

а) при использовании моноплекса или набора Amelogenin:

$n \times 2,65$ мкл	STR 10× Buffer,
$n \times 2,65$ мкл	10× Primer Pair,
$n \times 1$ мкл	BSA fraction V, 4 мг/мл,
$n \times 0,1$ мкл	<i>Taq</i> ДНК-полимеразы, 5 ед/мкл,
$n \times 15,1$ мкл	деионизованной воды;

б) при использовании триплекса:

$n \times 2,65$ мкл	STR 10× Buffer,
$n \times 2,65$ мкл	10× Primer Pair,
$n \times 1$ мкл	BSA fraction V, 4 мг/мл,
$n \times 0,3$ мкл	<i>Taq</i> ДНК-полимеразы, 5 ед/мкл,
$n \times 14,9$ мкл	деионизованной воды;

в) при использовании триплекса СТТ совместно с Amelogenin:

$n \times 2,65$ мкл	STR 10× Buffer,
$n \times 2,65$ мкл	СТТ 10× Primer Pair,
$n \times 2,65$ мкл	Amelogenin 10× Primer Pair,
$n \times 1$ мкл	BSA fraction V, 4 г/мл,
$n \times 0,3$ мкл	<i>Taq</i> ДНК-полимеразы, 5 ед/мкл,
$n \times 12,25$ мкл	деионизованной воды.

Примечание. Объем PCR Master Mix будет приготовлен с некоторым избытком, что компенсирует потери смеси при ее пипетировании

5. Тщательно перемешивают приготовленный PCR Master Mix, и разносят смесь в амплификационные пробирки по 20 мкл.

6. В амплификационные пробирки, содержащие 20 мкл PCR Master Mix, вносят:

а) для пробы с исследуемой ДНК – 5 мкл раствора, содержащего 1–25 нг исследуемой ДНК;

б) для контроля выделения ДНК – 5 мкл пробы реагентов, которые использовали при выделении ДНК;

в) для положительного контроля реакции амплификации – 5 мкл раствора ДНК K562, содержащего 1 нг/мкл ДНК (разбавленный в 10 раз входящий в набор реактивов раствор ДНК K562);

г) для отрицательного контроля реакции амплификации – 5 мкл деионизованной воды, которую использовали при приготовлении PCR Master Mix.

Примечание. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл.

7. Помещают пробирки в амплификатор и проводят реакцию амплификации по программе, соответствующей исследуемому локусу (см. табл. 1).

8. После завершения реакции амплификации хранят полученные амплифицированные пробы ДНК при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

После завершения реакции амплификации необходимо установить насколько успешно прошла реакция и какое количество ДНК было синтезировано.

Оценка результатов реакции амплификации проводится методом электрофореза в 3% агарозном геле. Заливают агарозный гель, проводят электрофорез, и окрашивают гель так же, как и при проведении оценки выделенной ДНК методом электрофореза.

Готовят пробы ДНК к электрофорезу следующим образом:

смешивают 8 мкл исследуемой ДНК с 2 мкл буфера для нанесения проб;

подготавливают маркерную пробу ДНК (pGEM DNA Markers), содержащую фрагменты ДНК с известными длинами, смешивая 4 мкл пробы ДНК (80 нг) и 1 мкл буфера для нанесения проб. Маркерная проба необходима для того, чтобы правильно обнаружить амплифицированные фрагменты и отличить их от неспецифических фрагментов ДНК, образующихся при электрофорезе в неденатурирующих условиях за счет различных форм вторичной структуры ДНК (гетеродуплексной ДНК).

После окончания электрофореза и его окраски для повышения чувствительности метода рекомендуется сфотографировать гель через красный светофильтр и анализировать результаты электрофореза по полученному негативу.

Зная длину амплифицированной последовательности и ориентируясь на фрагменты маркерной пробы ДНК, определяют область, где должны располагаться амплифицированные фрагменты ДНК. Наличие в этой области четкой дискретной полосы означает успешное проведение реакции амплификации. Если амплифицированные фрагменты присутствуют в пробе с отрицательным контролем, то это может указывать на некачественное исполнение реакции амплификации, однако окончательное решение необходимо принимать только после проведения электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. В случае отсутствия амплифицированных фрагментов необходимо изменить условия реакции амплификации и провести ее повторно. Отсутствие амплифицированных фрагментов во всех пробах, в том числе и в пробе с положительным контролем, указывает на неправильные постановку и проведение реакции амплификации.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ДЕНАТУРИРУЮЩЕМ ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Представленные ниже протоколы предназначены для проведения вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с использованием электрофорезной камеры производства фирмы Bio Rad (США), размером 210×400 мм.

Приготовление полиакриламидного геля

Данный протокол используется для приготовления 6% денатурирующего полиакриламидного геля (ПААГ) размером 210×400×0,8 мм.

Внимание! Акриламид, бис-акриламид, *repeI-silane*, *bind-silane* – токсичные и раздражающие вещества. Избегать контакта с кожей. Работать в перчатках и халате. Использовать вытяжной шкаф.

1. Тщательно моют стекла камеры, ополаскивают дистиллированной водой и дважды протирают 96% этиловым спиртом.

2. Наносят 2 мл *repeI-silane* на поверхность стекла с карманом для буфера для придания ей гидрофобных свойств. Распределяют *repeI-silane* по поверхности стекла сухой марлевой салфеткой. По-

вторную обработку стекла необходимо проводить после приготовления 5 гелей.

3. Высушивают поверхность стекла в течение 5 мин при комнатной температуре, и смывают избыток *gepel-silane* небольшим количеством деионизованной воды. Остатки влаги осторожно удаляют сухой марлевой салфеткой.

4. Готовят свежий раствор *bind-silane*: в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, содержащую 995 мкл 96% этилового спирта, вносят 5 мкл ледяной уксусной кислоты и 3 мкл *bind-silane*.

5. Наносят свежеприготовленный раствор *bind-silane* (1 мл) на поверхность стекла без кармана для буфера, и распределяют его сухой марлевой салфеткой.

6. Высушивают поверхность стекла в течение 5 мин при комнатной температуре, и смывают избыток *bind-silane* 3–4 раза марлевой салфеткой, смоченной 96% этиловым спиртом.

Примечание. Если избыток *bind-silane* не будет смыт, то полиакриламидный гель может приклеиться к обоим стеклам.

7. Собирают камеру для электрофореза, используя спейсеры толщиной 0,8 мм.

8. Нагревают 3% раствор агарозы, приготовленный на 1× TBE-буфере, до полного растворения агарозы. Остужают раствор до температуры 50–60 °С, и заклеивают им дно электрофорезной камеры.

9. Готовят 75 мл раствора для заливки 6% полиакриламидного геля, смешивая следующие компоненты:

31,5 г мочевины,

35 мл деионизованной воды,

3,75 мл 10× TBE-буфера,

11,25 мл 40% раствора акриламида–бис (19:1),

100 мг персульфата аммония.

После полного растворения мочевины доводят объем раствора до 75 мл.

10. Для предотвращения попадания и застывания акриламидного раствора в кармане для электрофорезного буфера при заливке геля в этот карман наливают дистиллированную воду так, чтобы ее уровень покрыл электрод.

11. К акриламидному раствору добавляют 45 мкл ТЕМЕД, перемешивают и осторожно выливают между стеклами так, чтобы в геле не образовывались пузырьки воздуха. После достижения уровня раствора верхнего края стекол вставляют гребенку, формирующую лунки.

12. Оставляют гель в горизонтальном положении не менее чем на 2 ч до полной полимеризации.

Примечание. Гель можно сохранить в течение ночи до следующего дня, если защитить его от высыхания.

Проведение электрофореза

1. Готовят 1 л 0,5× ТВЕ-буфера, добавляя к 950 мл дистиллированной воды 50 мл 10× ТВЕ-буфера. Перемешивают раствор.

2. Помещают камеру с гелем в электрофоретическую ячейку, заполняют буферный карман и нижнюю ванну 0,5× ТВЕ-буфером.

3. Осторожно извлекают гребенку, не повреждая лунки, и промывают лунки от мочевины, используя автоматическую пипетку так, чтобы в лунках не остались пузырьки воздуха.

4. Проводят предварительный электрофорез при постоянной мощности 65 Вт. При достижении температуры геля до 50 °С предварительный электрофорез заканчивается.

5. Подготавливают пробы ДНК;

– смешивают аликвоту амплифицированной пробы ДНК с равным объемом раствора для нанесения проб (STR 2× Loading Solution).

Примечание. Величина аликвоты определяется в процессе оценки результатов реакции амплификации методом электрофореза в 3% агарозном геле по интенсивности свечения полосы амплифицированных фрагментов. Обычно аликвота равна 1,0–7,5 мкл. Фрагменты ДНК одинаковой длины при электрофорезе не должны смешаться относительно друг друга; для этого пробы с большим количеством ДНК разбавляют так, чтобы нанести на гель одинаковые объемы проб;

– смешивают 5 мкл аллельного лэддера с 5 мкл раствора для нанесения проб (STR 2× Loading Solution).

Примечания: 1. Если готовят лэддер локуса TH01, то смешивают 4 мкл лэддера и 1 мкл аллели 9.3 с 5 мкл раствора для нанесения проб. Если готовят лэддер для проб ДНК, где одновременно проводилась амплификация триплекса СТТ и Amelogenin, то смешивают по 2,5 мкл лэддера триплекса СТТ и лэддера Amelogenin с 5 мкл раствора для нанесения проб. 2. Количество дорожек, занятых лэддером, определяется экспертом. Обычно дорожки с лэддером вводят через каждые пять дорожек с пробами ДНК.

6. Денатурируют пробы, инкубируя при температуре 95 °С в течение 2–10 мин. После этого пробы немедленно помещают на лед.

Примечание. Денатурацию необходимо проводить непосредственно перед нанесением проб на гель.

7. Останавливают предварительный электрофорез, при этом температура геля должна быть 50 °С.

8. Промывают лунки от мочевины, используя автоматическую пипетку так, чтобы в лунках не остались пузырьки воздуха.

9. С помощью шприца вносят на дно лунок денатурированные пробы ДНК.

10. Проводят электрофорез при постоянной мощности 45 Вт, контролируя температуру геля, которая должна составлять 50 °С.

11. Ориентируясь по движению маркерных красителей и зная размер фрагментов каждого локуса, проводят электрофорез до того момента, пока фрагменты интересующего локуса не пройдут 2/3 длины геля. При электрофорезе нескольких локусов ориентируются по самому короткому из них.

Примечание. Бромфеноловый синий в 6% денатурирующем ПААГ движется как фрагменты ДНК длиной 25 п.н., кислый циабол – как фрагменты ДНК длиной 105 п.н.

Окраска геля нитратом серебра

После завершения электрофореза разбирают электрофорезную камеру и окрашивают гель в кювете, которую помещают на качающуюся платформу по протоколу, используя по 1 л каждого раствора:

дистиллированная вода	– 2 мин;
10% этиловый спирт	– 5 мин;
1% азотная кислота	– 10 мин;
0,012М нитрат серебра	– 20 мин;
дистиллированная вода	– не более 1 мин;
0,28М карбонат натрия + + 0,037% формальдегид	– до проявления полос;
10% уксусная кислота	– 2 мин;
дистиллированная вода	– 2 мин.

После окраски геля его фотографируют и анализируют.

После фиксирования полученных результатов стеклу с гелем помещают на несколько часов в кювету с 10% NaOH (10% раствор NaOH можно использовать несколько раз). Затем стеклу тщательно отмывают от остатков полиакриламидного геля мощным раствором и ополаскивают дистиллированной водой.

УСТАНОВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ STR-ЛОКУСОВ

Установление аллелей проводят путем сравнения длин амплифицированных фрагментов определенного локуса и фрагментов соответствующего лэддера. В техническом руководстве, прилагаемом к наборам *GenePrint STR System* [38], имеется информация об аллелях, включенных в лэддер соответствующего локуса, и о том, какие фрагменты ДНК лэддера соответствуют этим аллелям.

При анализе учитывают только те фрагменты, которые располагаются в области лэддера и по уровню расположения соответствуют фрагментам лэддера. Допустимо отклонение от фрагментов лэддера не более чем на 0,5 п.н. Все фрагменты, локализующиеся выше и ниже крайних аллелей лэддера, являются неспецифическими и дальнейшему анализу не подлежат (исключением является аллель 3.2 локуса F13A01, а также редкие аллели локусов CSF1PO, F13B, vWA, не включенные в лэддеры).

Анализ электрофореграммы начинают с изучения дорожек, на которые были нанесены контроли реакции амплификации и контроли выделения ДНК. Данные считаются достоверными, если: а) в отрицательных контролях реакции амплификации и контролях выделения ДНК отсутствовали амплифицированные фрагменты; б) профиль ДНК, выявленный в положительном контроле реакции амплификации, соответствовал генотипу ДНК K562.

После оценки контролей проводят анализ дорожек, на которые были нанесены исследуемые пробы ДНК. При оценке уровней расположения фрагментов необходимо учитывать количественное соответствие ДНК в сравниваемых образцах. Если проба «перегружена», то фрагменты могут быть смещены относительно фрагментов лэддера. В неясных случаях рекомендуется повторить электрофорез с нанесением на гель меньшего количества ДНК.

При анализе электрофореграммы могут быть обнаружены и неспецифические фрагменты, которые необходимо отличать от истинных аллелей. Часто выявляют так называемые *статтеры*. Статтер – это фрагмент, который короче истинного аллеля на одну повторяющуюся единицу (т.е. по уровню расположения соответствующий фрагменту лэддера, предшествующему истинному аллелю).

Для статтера характерны два признака, по которым его отличают от истинных аллелей, а также отличают гомозиготный профиль со статтером от гетерозиготного профиля:

если появляется статтер, то он всегда ассоциирован с истинным аллелем (он короче истинного аллеля на одну повторяющуюся единицу);

интенсивность статтера обычно не превышает 15 % интенсивности истинного аллеля, с которым он ассоциирован.

Другими часто выявляемыми неспецифическими фрагментами являются так называемые «N»-фрагменты. Их появление связано с тем, что *Taq* ДНК-полимераза обладает свойством дотраивать во вновь синтезированную цепь ДНК один лишний нуклеотид.

ь результате этого свойства на основе матричной цепи ДНК синтезируются два типа фрагментов: «N+1»-фрагменты, которые длиннее на один нуклеотид, и «N»-фрагменты, соответствующие истинной длине исходной ДНК. Интенсивность «N»-фрагментов всегда ниже, чем «N+1»-фрагментов. Присутствие «N»-фрагментов обычно не усложняет установление истинных аллелей, однако следует особенно внимательно анализировать электрофореграммы локусов, аллели которых могут отличаться на одну пару оснований (например, аллели 9.3 и 10 локуса TH01).

Подробнее о неспецифических явлениях, наблюдаемых при исследовании STR-локусов, изложено в методических рекомендациях [39].

Фрагменты, которые были определены как статтеры или иные неспецифические фрагменты, в дальнейшем исследовании не учитывают.

Если в профиле выявлено более двух специфических фрагментов, то это может свидетельствовать о смеси ДНК нескольких лиц.

После установления всех истинных аллелей проводят экспертный анализ и вероятностно-статистическую оценку идентификационной значимости полученных результатов.

Типирование VNTR-локуса DIS80 с помощью набора AmpliFLP DIS80

НАБОР AMPLIFLP DIS80

Набор AmpliFLP DIS80 изготавливается фирмой Perkin-Elmer (США) для типирования локуса DIS80, последовательности которого относятся к минисателлитной ДНК [9]. Реагентов набора достаточно для проведения 100 реакций.

Каждый набор включает:

1) реагенты для амплификации:

смесь для ПЦР (AmpliFLP DIS80 PCR Reaction Mix),

раствор $MgCl_2$ (5mM $MgCl_2$ Solution),

раствор контрольной ДНК (Control DNA 3);

2) реагент для анализа амплифицированных фрагментов:

аллельный маркер (AmpliFLP DIS80 Allelic Ladder).

Реагенты для амплификации и реагенты для анализа амплифицированных фрагментов должны храниться отдельно при температуре от 2 до 8 °С.

Перед использованием набора реагенты для амплификации (смесь для ПЦР и раствор $MgCl_2$) должны быть разделены на аликвоты. Для этого смесь для ПЦР разносят в амплификационные про-

бирки по 10 мкл и закрывают крышками, а раствор $MgCl_2$ – в микроцентрифужные пробирки по 100–200 мкл. Рабочей является лишь одна аликвота раствора $MgCl_2$. Разделение реагентов на аликвоты исключает возможность загрязнения всего набора посторонней ДНК.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Программирование режимов амплификации

Набор AmpliFLP D1S80 был разработан для использования совместно с амплификаторами фирмы Perkin-Elmer (США). Применение амплификаторов других фирм-изготовителей может снижать выход продуктов реакции амплификации.

Ниже приведен режим амплификации, рекомендуемый изготовителем реактивов для амплификаторов модели GeneAmp PCR System 9600 фирмы Perkin-Elmer, которыми оснащены большинство ЭКП ОВД (табл. 2).

Таблица 2

Режим амплификации для прибора GeneAmp PCR System 9600

№ п/п	Амплифицируемый locus	Температура и длительность инкубации	Количество циклов
1	D1S80	95 °С – 15 с 66 °С – 15 с 72 °С – 40 с 72 °С – 10 мин 4 °С – ∞	29

Заключительным шагом реакции амплификации является инкубация при температуре 4 °С. Этот шаг предусмотрен для возможности хранения амплифицированных проб в амплификаторе. Выполнение амплификатором этого шага означает завершение реакции амплификации.

Постановка реакции амплификации

Для предотвращения контаминации ДНК между исследуемыми пробами ДНК при пипетировании реактивов и проб ДНК рекомендуется использовать специальные наконечники с фильтром, а также работать в перчатках.

Реакцию амплификации проводят по протоколу.

1. Определяют число используемых реакций, исходя из количества исследуемых проб ДНК и контролей выделения ДНК, а также

учитывая положительный и отрицательный контроли реакции амплификации.

2. Извлекают из холодильника амплификационные пробирки с аликвотами смеси для ПЦР (AmpliFLP DIS80 PCR Reaction Mix) в количестве, равном количеству используемых реакций, и рабочую аликвоту раствора $MgCl_2$ (5mM $MgCl_2$ Solution).

3. Пробирку, содержащую раствор $MgCl_2$, перемешивают с использованием vortex. Затем эту пробирку и пробирки, содержащие смесь для ПЦР, центрифугируют в течение 5 с для осаждения жидкости с крышек и стенок пробирок.

4. В амплификационные пробирки, содержащие 10 мкл смеси для ПЦР, вносят по 5 мкл раствора $MgCl_2$.

Примечание. Для уменьшения вероятности формирования неспецифических продуктов ПЦР необходимо после выполнения этого шага начать реакцию амплификации не позже чем через 30 мин.

5. В амплификационные пробирки, содержащие 15 мкл смеси, готовой для проведения ПЦР, вносят:

а) для пробы с исследуемой ДНК – 10 мкл раствора, содержащего 1,25–5,00 нг исследуемой ДНК;

б) для контроля выделения ДНК – 10 мкл пробы реагентов, которые использовали при выделении ДНК;

в) для положительного контроля реакции амплификации – 10 мкл раствора контрольной ДНК (Control DNA 3);

г) для отрицательного контроля реакции амплификации – 10 мкл деионизованной воды.

Примечание. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл.

6. Помещают пробирки в амплификатор, и проводят реакцию амплификации по соответствующей программе (см. табл. 2).

7. После завершения реакции амплификации хранят полученные амплифицированные пробы ДНК при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Оценка результатов реакции амплификации проводится таким же образом, как и в случае исследования STR-локусов (см. раздел «Оценка результатов реакции амплификации», с. 58).

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В НАТИВНОМ ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Представленные ниже протоколы предназначены для проведения вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с использованием электрофорезной камеры производства фирмы Bio Rad (США), размером 210×400 мм.

Приготовление полиакриламидного геля

Данный протокол используется для приготовления 8% нативного полиакриламидного геля (ПААГ) размером 210×400×0,8 мм.

Подготовку стекол электрофорезной камеры и заливку полиакриламидного геля проводят таким же образом, как и в случае приготовления полиакриламидного геля для исследования STR-локусов (см. протокол «Приготовление полиакриламидного геля», с. 59). Единственное отличие заключается в том, что вместо раствора для заливки денатурирующего геля (п. 9 указанного протокола) готовят раствор следующего состава:

- 35 мл деионизованной воды,
 - 5 мл глицерина,
 - 3,75 мл 10× TBE-буфера,
 - 20 мл 30% раствора акриламид–бис (29:1),
 - 100 мг персульфата аммония.
- Доводят объем раствора до 75 мл.

Проведение электрофореза

1. Готовят 1 л 0,5× TBE-буфера, добавляя к 950 мл дистиллированной воды 50 мл 10× TBE-буфера. Перемешивают раствор.
2. Помещают камеру с гелем в электрофоретическую ячейку, заполняют буферный карман и нижнюю ванну 0,5× TBE-буфером.
3. Осторожно извлекают гребенку, не повреждая лунки, и промывают лунки, используя автоматическую пипетку, так, чтобы в лунках не остались пузырьки воздуха.
4. Проводят предварительный электрофорез при постоянном напряжении 1 000 В в течение 20 мин.
5. Подготавливают пробы ДНК:

– смешивают аликвоту амплифицированной пробы ДНК с раствором для нанесения проб (см. приложение) в соотношении 5:1.

Примечание. Величина аликвоты определяется в процессе оценки результатов реакции амплификации методом электрофореза в 3% агарозном геле по интенсивности свечения полосы амплифицированных фрагментов. Обычно аликвота равна 1,0–7,5 мкл. Фрагменты ДНК одинаковой длины при электрофорезе не должны смешаться относительно друг друга; для этого пробы с большим количеством ДНК разбавляют так, чтобы нанести на гель одинаковые объемы проб;

– смешивают 5 мкл аллельного лэддера с 1 мкл раствора для нанесения проб.

Примечание. Количество дорожек, занятых лэддером, определяется экспертом. Обычно дорожки с лэддером вводят через каждые пять дорожек с пробами ДНК.

6. Промывают лунки, используя автоматическую пипетку, так, чтобы в лунках не остались пузырьки воздуха.

7. С помощью шприца вносят на дно лунок пробы ДНК.

8. Проводят электрофорез при постоянном напряжении 1 000 В, контролируя температуру геля, которая не должна превышать 50 °С. В случае повышения температуры геля уменьшают напряжение.

9. Ориентируясь по движению маркерных красителей, проводят электрофорез до того момента, пока фронт красителя (кислена цианола) не достигнет отметки 23 см от начала геля.

Окраска геля нитратом серебра

Процедуру окраски геля проводят таким же образом, как и при исследовании STR-локусов (см. раздел «Окраска геля нитратом серебра», с. 62).

УСТАНОВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА DIS80

Установление аллелей проводят путем сравнения длин амплифицированных фрагментов и фрагментов лэддера. В инструкции, прилагаемой к набору, имеется информация об аллелях, включенных в лэддер, и о том, какие фрагменты ДНК лэддера соответствуют этим аллелям.

При анализе учитывают только те фрагменты, которые располагаются в области лэддера и по уровню расположения соответствуют фрагментам лэддера. Все фрагменты, локализующиеся выше и ниже крайних аллелей лэддера, являются неспецифическими и дальнейшему анализу не подлежат.

Анализ электрофореграммы начинают с изучения дорожек, на которые были нанесены контроли реакции амплификации и контроли выделения ДНК. Данные считаются достоверными, если: а) в отрицательных контролях реакции амплификации и контролях выделения ДНК отсутствовали амплифицированные фрагменты; б) профиль ДНК, выявленный в положительном контроле реакции амплификации, соответствовал генотипу контрольной ДНК (аллели 18 и 31).

После оценки контролей проводят анализ дорожек, на которые были нанесены исследуемые пробы ДНК. При оценке уровней расположения фрагментов необходимо учитывать количественное соответствие ДНК в сравниваемых образцах. Если проба «перегружена», то фрагменты могут быть смещены относительно фрагментов лэддера. В неясных случаях рекомендуется повторить электрофорез с нанесением на гель меньшего количества ДНК.

Особое внимание следует обращать на гомозиготные пробы ДНК. У локуса DIS80, как и при исследовании других VNTR-локусов, может наблюдаться выпадение высокомолекулярного аллеля. Это связано с большей вероятностью разрушения высокомолеку-

лярного аллеля и явлением преимущественной амплификации. В неясных случаях рекомендуется повторить исследование таких проб ДНК, внося в реакцию амплификации меньшие количества ДНК.

Если в профиле выявлено более двух специфических фрагментов, то это может свидетельствовать о смеси ДНК нескольких лиц.

После установления всех аллелей проводят экспертный анализ и вероятностно-статистическую оценку идентификационной значимости полученных результатов.

Типирование последовательностей ДНК с помощью наборов AmpliType PM и AmpliType PM+DQA1

НАБОРЫ AMPLI TYPE PM И AMPLI TYPE PM+DQA1

Наборы изготавливаются фирмой Perkin-Elmer (США) для исследования локусов, обладающих полиморфизмом нуклеотидной последовательности. С помощью набора AmpliType PM+DQA1 [8] можно проводить одновременное типирование шести локусов ДНК: HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 и GC. Набор AmpliType PM позволяет типировать те же локусы, за исключением локуса HLA DQA1.

Каждый набор включает:

1) реагенты для амплификации:

смесь для ПЦР (AmpliType PM PCR Reaction Mix),

раствор праймеров (AmpliType PM Primer Set),

раствор контрольной ДНК (Control DNA 1);

2) реагенты для анализа амплифицированных фрагментов:

аллель-специфичные зонды для установления аллелей локусов LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 и GC, иммобилизованные на мембранах (AmpliType PM DNA Probe Strips),

аллель-специфичные зонды для установления аллелей локуса HLA DQA1, иммобилизованные на мембранах (AmpliType HLA DQA1 DNA Probe Strips), включены только в набор AmpliType PM+DQA1,

ферментный конъюгат (Enzyme Conjugate: HRP-SA),

хромоген (Chromogen: TMB).

Реагенты для амплификации и реагенты для анализа амплифицированных фрагментов должны храниться отдельно при температуре от 2 до 8 °С.

Перед использованием набора реагенты для амплификации (смесь для ПЦР и раствор праймеров) должны быть разделены на

аликвогы. Для этого смесь для ПЦР разносят в амплификационные пробирки по 20 мкл и закрывают крышками, а раствор праймеров – в микроцентрифужные пробирки по 200 мкл. Рабочей является лишь одна аликвота раствора праймеров. Разделение реагентов на аликвоты исключает возможность загрязнения всего набора посторонней ДНК. Кроме того, необходимо приготовить раствор хромогена, добавив непосредственно во флакон с реактивом 30 мл 100% этилового спирта. (**Внимание! Не использовать спирт, хранившийся в металлической таре, 96% спирт или иные спирты.**) Помещают флакон на 2 ч на качающуюся платформу до полного растворения реактива. Раствор хромогена необходимо защитить от загрязнения тяжелыми металлами, особенно оксидом железа.

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Программирование режимов амплификации

Наборы AmpliType PM и AmpliType PM+DQA1 были разработаны для использования совместно с амплификаторами фирмы Perkin-Elmer (США). Применение амплификаторов других фирм-изготовителей может снижать выход продуктов реакции амплификации.

Ниже приведен режим амплификации, рекомендуемый изготовителем реактивов для амплификаторов модели GeneAmp PCR System 9600 фирмы Perkin-Elmer, которыми оснащены большинство ЭКП ОВД (табл. 3).

Таблица 3

Режимы амплификации для прибора GeneAmp PCR System 9600

№ п/п	Используемые наборы	Температура и длительность инкубации	Количество циклов
1	AmpliType PM	95 °С – 30 с	} 32
2	AmpliType PM+DQA1	66 °С – 30 с	
		72 °С – 30 с	
		72 °С – 10 мин	
		4 °С – ∞	

Особенностью реакции амплификации является необходимость прогревания блока амплификатора до температуры 95 °С перед помещением в него амплификационных пробирок и запуском программы амплификации. Заключительным этапом реакции амплификации является инкубация при температуре 4 °С (для хранения амплифицированных проб в амплификаторе). Выполнение амплификатором этого этапа означает завершение реакции амплификации.

Постановка реакции амплификации

Для предотвращения контаминации ДНК между исследуемыми пробами ДНК при пипетировании реактивов и проб ДНК рекомендуется использовать специальные наконечники с фильтром, а также работать в перчатках.

Реакцию амплификации проводят по протоколу.

1. Запускают программу прогрева блока амплификатора до температуры 95 °С.

2. Определяют число используемых реакций, исходя из количества исследуемых проб ДНК и контролей выделения ДНК, а также учитывая положительный и отрицательный контроли реакции амплификации.

3. Извлекают из холодильника амплификационные пробирки с аликвотами смеси для ПЦР (AmpliType PM PCR Reaction Mix) в количестве, равном количеству используемых реакций, и рабочую аликвоту раствора праймеров (AmpliType PM Primer Set).

4. Пробирку, содержащую раствор праймеров, перемешивают с использованием vortex. Затем эту пробирку и пробирки, содержащие смесь для ПЦР, центрифугируют в течение 5 с для осаждения жидкости с крышек и стенок пробирок.

5. В амплификационные пробирки, содержащие 20 мкл смеси для ПЦР, вносят по 20 мкл раствора праймеров.

Примечание. Для уменьшения вероятности формирования неспецифических продуктов ПЦР необходимо после выполнения этого этапа начать реакцию амплификации не позднее чем через 20 мин.

6. В амплификационные пробирки, содержащие 40 мкл смеси, готовой для проведения ПЦР, вносят:

а) для пробы с исследуемой ДНК – 10 мкл раствора, содержащие 1–5 нг исследуемой ДНК;

б) для контроля выделения ДНК – 10 мкл пробы реагентов, которые использовали при выделении ДНК;

в) для положительного контроля реакции амплификации – 10 мкл раствора контрольной ДНК (Control DNA 1);

д) для отрицательного контроля реакции амплификации – 10 мкл деионизованной воды.

Примечание. Конечный объем реакционной смеси – 50 мкл.

7. Помещают пробирки в амплификатор, останавливают программу прогрева блока амплификатора до температуры 95 °С, и проводят реакцию амплификации по соответствующей программе (см. табл. 3).

8. После завершения реакции амплификации к каждой амплифицированной пробе ДНК добавляют по 2,5 мкл раствора 200mM NaЭДТА, и хранят пробы при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ АМПЛИФИКАЦИИ

Оценка результатов реакции амплификации проводится таким же образом, как и в случае исследования STR-локусов (см. раздел «Оценка результатов реакции амплификации», с. 58).

АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ДОТ-БЛОТ ГИБРИДИЗАЦИИ

Представленный ниже протокол предназначен для проведения дот-блот гибридизации с использованием ячеек для гибридизации производства фирмы Perkin-Elmer (AmpliType DNA Typing Trays). Для проведения дот-блот гибридизации необходима водяная баня, температура воды которой контролируется и поддерживается жидкостным термостатом.

Внимание! Важно, чтобы перед проведением гибридизации во всех амплифицированных пробах содержалось 2,5 мкл 200mM раствора NaЭДТА.

1. В водяную баню наливают воду так, чтобы ее уровень доходил до половины высоты ячеек для гибридизации. Включают термостат, устанавливая температуру $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Помещают водяную баню на качающуюся платформу, работающую со скоростью 50–70 об/мин.

2. Для растворения осадка прогревают раствор для гибридизации и раствор для промывания до температуры $37\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Каждый раствор тщательно перемешивают.

Примечание. К следующим этапам необходимо переходить только после достижения в водяной бане температуры $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), полного растворения осадков в растворах для гибридизации и промывания.

3. Устанавливают ячейки для гибридизации в наклонном положении, подкладывая под их задний край какую-либо подставку. Пинцетом помещают в ячейки для гибридизации мембраны с иммобилизованными ДНК-зондами AmpliType DNA Probe Strips (в одну ячейку помещают одну мембрану) так, чтобы правый край мембраны находился в нижней части наклоненной ячейки. Можно одновременно проводить гибридизацию с использованием AmpliType PM и AmpliType HLA DQA1 DNA Probe Strips, которые также необходимо поместить в различные ячейки. Мембраны помечают или подписывают с правого края ручкой с водостойкими чернилами.

4. Пробы с амплифицированной ДНК помещают в амплификатор и денатурируют при температуре 95 °С от 3 до 10 мин.

5. В ячейки для гибридизации, содержащие мембраны, вносят по 3 мл прогретого раствора для гибридизации.

6. Извлекают из амплификатора пробирку с денатурированной пробой ДНК, и немедленно вносят 20 мкл пробы внутрь слоя раствора для гибридизации, содержащегося в ячейке с соответствующей мембраной.

7. Повторяют п. 6 для всех проб ДНК.

Примечание. В случае применения двух видов мембран (AmpliType PM и AmpliType HLA-DQA1 DNA Probe Strips) для гибридизации одних и тех же проб ДНК необходимо после выполнения п. 6 вернуть пробирку в амплификатор. После внесения аликвот всех проб ДНК в ячейки с одним видом мембран, вносят аликвоты проб ДНК в ячейки с другим видом мембран.

8. Закрывают ячейки для гибридизации крышкой и помещают в водяную баню, которую также закрывают крышкой. Проводят гибридизацию в течение 15 мин (± 1 мин) при температуре 55 °С (± 1 °С) и 50–70 об/мин качающейся платформы.

9. Не ранее чем за 5 мин до окончания гибридизации в зависимости от числа используемых мембран (n) готовят раствор ферментного конъюгата, смешивая следующие компоненты:

$n \times 3,3$ мл раствора для гибридизации;

$n \times 27$ мкл Enzyme Conjugate: HRP-SA.

10. По окончании гибридизации (п. 8) извлекают из водяной ванны ячейки для гибридизации и удаляют из них раствор.

11. Вносят в ячейки по 5 мл прогретого раствора для промывания, и, покачивая ячейки, промывают мембраны в течение нескольких секунд. Удаляют раствор из ячеек.

12. Вносят в ячейки по 3 мл раствора ферментного конъюгата (п. 9), и помещают их в водяную баню. Инкубируют в течение 5 мин (± 1 мин) при температуре 55 °С (± 1 °С) и 50–70 об/мин качающейся платформы.

13. Удаляют из ячеек раствор. Вносят по 5 мл прогретого раствора для промывания, и, покачивая ячейки, промывают мембраны в течение нескольких секунд. Удаляют раствор из ячеек.

14. Вносят в ячейки по 5 мл прогретого раствора для промывания, и помещают их в водяную баню. Инкубируют в течение 12 мин (± 1 мин) при температуре 55 °С (± 1 °С) и 50–70 об/мин качающейся платформы.

15. Удаляют из ячеек раствор. Вносят по 5 мл раствора для промывания, и, покачивая ячейки, промывают мембраны в течение нескольких секунд. Удаляют раствор из ячеек.

16. Вносят в ячейки по 5 мл раствора цитратного буфера, и помещают их на качающуюся платформу. Инкубируют в течение 5 мин (± 1 мин) при комнатной температуре (15–30 °С) и 50 об/мин качающейся платформы.

17. Не ранее чем за 10 мин до окончания инкубации в цитратном буфере в зависимости от числа используемых мембран (n) готовят окрашивающий раствор, смешивая следующие компоненты:

$n \times 5$ мл раствора цитратного буфера;

$n \times 5$ мкл 3% перекиси водорода или 0,5 мкл 30% перекиси водорода;

$n \times 0,25$ мл раствора Chromogen: ТМВ.

18. Удаляют из ячеек раствор. Вносят в ячейки по 5 мл окрашивающего раствора (п. 17), и помещают их на качающуюся платформу. Инкубируют мембраны, защищая от яркого света, в течение 20–30 мин при комнатной температуре (15–30 °С) и 50 об/мин качающейся платформы до тех пор, пока не появится окраска на зондах, обозначенных как «S» (AmpliType PM DNA Probe Strips) и «C» (AmpliType HLA DQA1 DNA Probe Strips).

Примечание. В зависимости от концентрации ДНК в амплифицированных пробах некоторые мембраны могут быть окрашены за более короткое время. Для окончания окраски этих мембран переходят к выполнению следующего этапа (п. 19). Окраску мембран с отрицательными контролями выделения и амплификации проводят до тех пор, пока не будет закончена окраска всех мембран.

19. Для окончания окраски удаляют раствор и промывают мембраны в нескольких порциях дистиллированной воды.

20. Проводят учет результатов исследования и фотографирование мембран, пока они находятся во **влажном** состоянии.

УСТАНОВЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ЛОКУСОВ

Установление аллелей проводят путем оценки и учета окраски аллель-специфичных зондов.

Анализ результатов гибридизации проводят, пока мембраны находятся во **влажном** состоянии, и начинают с изучения тех мембран, которые использовались для гибридизации с ДНК контролей реакции амплификации и контролей выделения ДНК. Данные считаются достоверными, если: а) в отрицательных контролях реакции амплификации и контролях выделения ДНК отсутствовали амплифицированные фрагменты, т.е. окрашенные зонды; б) профиль ДНК,

выявленный в положительном контроле реакции амплификации, соответствовал генотипу контрольной ДНК (HLA DQA1 1.1, 4.1, LDLR *BB*, GYPA *AB*, HBGG *AA*, D7S8 *AB* и GC *BB*).

После оценки контролей проводят анализ мембран, использовавшихся для гибридизации с исследуемыми пробами ДНК. Для анализа используют только те мембраны, у которых окрашены зонды, обозначенные как «S» (AmpliType PM DNA Probe Strips) и «C» (AmpliType HLA DQA1 DNA Probe Strips). Сравнивая окраску зондов «S» или «C» с окраской остальных зондов, учитывают только те из них, интенсивность окраски которых сильнее чем у зондов «S» или «C».

Окрашенные зонды локусов LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 и GC соответствуют аллелям этих локусов.

При установлении аллелей локуса HLA DQA1 пользуются следующими правилами (см. рис. 12):

окрашенный зонд 1 означает присутствие аллелей 1.1, 1.2, 1.3;

окрашенный зонд 2 означает присутствие только аллеля 2;

окрашенный зонд 3 означает присутствие только аллеля 3;

окрашенный зонд 4 означает присутствие аллелей 4.1, 4.2, 4.3;

окрашенный зонд 1.1 означает присутствие только аллеля 1.1;

окрашенный зонд 1.3 означает присутствие только аллеля 1.3.

Примечание. Зонда, специфичного только для аллеля 1.2, нет;

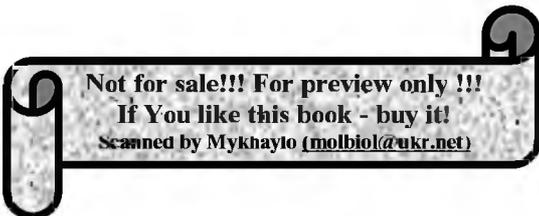
окрашенный зонд 1.2, 1.3, 4 означает присутствие аллелей 1.2, 1.3, 4.1, 4.2, 4.3;

окрашенный зонд All but 1.3 означает присутствие любого аллеля, за исключением 1.3. Этот зонд необходим для отличия генотипа 1.2, 1.3 от 1.3, 1.3;

окрашенный зонд 4.1 означает присутствие только аллеля 4.1;

окрашенный зонд 4.2, 4.3 означает присутствие аллелей 4.2, 4.3, которые набором AmpliType PM+DQA1 не дифференцируются.

После установления всех аллелей проводят экспертный анализ и вероятностно-статистическую оценку идентификационной значимости полученных результатов.



Not for sale!!! For preview only !!!
If You like this book - buy it!
Scanned by Mykhaylo (molbiol@ukr.net)

Глава 3

ВЕРОЯТНОСТНО-СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИДЕНТИФИКАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Теоретические основы вероятностно-статистической оценки

Генетические признаки¹, анализируемые при исследовании ДНК описанными выше методами, по отдельности не являются строго индивидуальными, т.е. эти признаки обычно присущи группе людей. В совокупности генетические признаки исследуемого объекта позволяют в значительной степени индивидуализировать этот объект, однако это не исключает возможности одновременного существования нескольких людей, обладающих признаками, идентичными генетическим признакам исследуемого объекта.

Факт совпадения генетических признаков исследуемого объекта и лица, проходящего по делу, может быть объяснен следующим: данное лицо может быть либо тем лицом, от которого действительно произошел исследуемый объект, либо лицом, не причастным к делу, генетические признаки которого случайно совпадают с признаками исследуемого объекта. Для оценки идентификационной значимости этих генетических признаков проводят вероятностно-статистическую обработку результатов исследования, основывающуюся на законах теории вероятностей.

Для дальнейшего изложения необходимо определить основные понятия и теоремы теории вероятностей [40].

¹ В этом разделе под генетическими признаками подразумеваются лишь те генетические признаки, которые были изучены в процессе исследования.

Основные положения и понятия теории вероятностей

Предметом изучения в теории вероятностей являются вероятности каких-либо событий. Под событием понимается результат любого испытания или наблюдения. При математической записи события обычно обозначаются прописными буквами латинского алфавита. События могут быть трех видов: достоверным, невозможным и случайным. Достоверное событие – это событие, которое обязательно произойдет. Невозможное – это событие, которое не может произойти. Случайное – это событие, которое может произойти, а может и не произойти.

Каждое испытание, рассматриваемое в теории вероятностей, таково, что оно заканчивается одним и только одним из событий (в зависимости от случая), например событиями E_1, E_2, \dots, E_n . Эти события называются исходами испытания. Если событие A заключается в том, что наступает или E_i , или E_j , или E_k , то исходы E_i, E_j, E_k называются благоприятствующими событию A . Пусть m – число исходов, благоприятствующих событию A , n – общее число исходов какого-нибудь испытания, тогда вероятность P события A равна отношению числа благоприятствующих этому событию исходов m к общему числу равновозможных исходов n :

$$P(A) = \frac{m}{n}.$$

Данная формула представляет собой классическое определение вероятности.

Пример. При бросании двух игральных костей каждый из 36 возможных исходов может быть обозначен $(i; j)$, где i – число очков, выпадающее на первой кости, j – на второй. Событию A (сумма очков равна 4) благоприятствуют три исхода $(1; 3), (2; 2), (3; 1)$. Таким образом, вероятность события A составит:

$$P(A) = \frac{3}{36} = \frac{1}{12}.$$

Согласно определению вероятности, значения вероятностей достоверного, невозможного и случайного событий будут равны:

если E – достоверное событие, то $m = n$ и $P(E) = \frac{m}{n} = 1$;

если U – невозможное событие, то $m = 0$ и $P(U) = \frac{m}{n} = 0$;

если A – случайное событие, то $m < n$ и $0 < P(A) = \frac{m}{n} < 1$.

Исходя из каких-либо нескольких событий, можно определить два новых события: их объединение (сумму) и совмещение (произведение). Например, событие B называется объединением событий A_1, A_2, \dots, A_n , если оно обозначает, что наступает или A_1 , или A_2, \dots , или A_n ; событие C называется совмещением событий A_1, A_2, \dots, A_n , если оно обозначает, что наступает и A_1 , и A_2, \dots , и A_n .

С операциями объединения и совмещения событий связаны две основные теоремы теории вероятностей – теоремы сложения и умножения вероятностей.

Сущность теоремы сложения вероятностей: если события A_1, A_2, \dots, A_n таковы, что каждые два из них несовместимы, то вероятность их объединения равна сумме их вероятностей.

Несовместимыми событиями называются любые два события, одновременное осуществление которых невозможно, т.е. события A и B являются несовместимыми, если среди исходов испытания не существует ни одного, благоприятствующего и A , и B .

Пример. При бросании двух игральных костей событие B (сумма очков не превосходит 4) есть объединение трех несовместимых событий A_2, A_3, A_4 , заключающихся в том, что сумма очков равна соответственно 2, 3, 4. Вероятности этих событий: $1/36, 2/36, 3/36$. По теореме сложения вероятностей вероятность события B составит:

$$P(B) = \frac{1}{36} + \frac{2}{36} + \frac{3}{36} = \frac{6}{36} = \frac{1}{6}$$

Теорема умножения вероятностей применяется для установления вероятности события, заключающегося в совмещении нескольких событий. Согласно этой теореме, вероятность совмещения независимых событий A_1, A_2, \dots, A_n равна произведению их вероятностей.

Независимыми событиями называются любые два события, вероятность наступления одного из которых не зависит от наступления второго события.

Пример. Производятся два бросания монеты. Результаты каждого бросания предполагаются независимыми событиями. Какова вероятность события C – выпадение «орла» один раз? Каждый исход испытания может быть обозначен последовательностью из двух букв. Например, (о, р) означает, что при первом бросании выпал «орел», при втором – «решка». Всего будет $2 \cdot 2 = 4$ исхода. Вероятность выпадения «орла» при одном бросании равна вероятности выпадения «решки» и составляет 0,5. По теореме умножения вероятностей вероятность исхода (о, р) будет равна:

$$P(o, p) = 0,5 \cdot 0,5 = 0,25.$$

Событию C благоприятствуют два исхода (o, p) и (p, o) , вероятность каждого одна и та же, следовательно, искомая вероятность равна:

$$P(C) = 2 \cdot 0,25 = 0,5.$$

Таким образом, при использовании законов теории вероятностей имеется возможность по вероятностям одних случайных событий находить вероятность других случайных событий, связанных с первыми.

Теория вероятностей в генотипоскопической экспертизе

Определив основные понятия и теоремы теории вероятностей, можно перейти к правилам использования ее законов в генотипоскопической экспертизе. Важно отметить, что главное назначение применения этих законов заключается не в простом расчете какого-то значения вероятности, а в определении степени его стремления к значению достоверного или невозможного события. Иначе говоря, с помощью теории вероятностей можно показать, что генетические признаки обладают или же не обладают такой идентификационной значимостью, которая позволяет утверждать, что вероятность наступления определенных событий близка либо к единице, либо к нулю.

Как отмечалось выше, факт совпадения генетических признаков исследуемого объекта и лица, проходящего по делу, может быть обусловлен одним из двух событий. Во-первых, данное лицо является тем лицом, от которого действительно произошел исследуемый объект; во-вторых, лицо не причастно к делу, и его генетические признаки случайно совпадают с признаками исследуемого объекта. Если генетические признаки обладают высокой идентификационной значимостью, то, на первый взгляд, может показаться, что вероятность первого события должна быть близка к единице, а вероятность второго – к нулю. Однако очевидно, что оба события являются **совместимыми**. Первое событие представляет собой достоверное событие, и, следовательно, его вероятность всегда должна быть равна единице (независимо от идентификационной значимости генетических признаков). Второе событие, напротив, является случайным, и его вероятность коррелирует с идентификационной значимостью исследуемых признаков. Поэтому вероятность этого события может быть использована при оценке идентификационной значимости признаков. Следует также отметить, что данному событию соответствует противоположное событие, которое заключается в том, что генетические признаки случайного лица и исследуемого объекта не совпадают. Вероятность именно этого события близка к единице, когда генетические признаки обладают высокой идентификационной

значимостью. Данная вероятность также может использоваться для оценки идентификационной значимости генетических признаков, однако ее использование в тексте или в выводе заключения эксперта при отсутствии каких-либо объяснений может восприниматься как вероятность происхождения исследуемого объекта от лица, проходящего по делу, что некорректно и недопустимо.

В настоящее время существуют два основных способа оценки идентификационной значимости генетических признаков.

Первый (и наиболее распространенный) способ заключается в оценке величины вероятности события: лицо, проходящее по делу, к этому делу не причастно, а его генетические признаки случайно совпадают с профилем исследуемого объекта, т.е. в оценке значения *вероятности случайного совпадения* генетических признаков. Чем меньше величина этой вероятности, тем меньше вероятность того, что это лицо является непричастным к делу, случайным лицом, и тем выше идентификационная значимость генетических признаков.

Во втором способе оценивается величина отношения вероятностей (*likelihood ratio*) двух альтернативных событий или, иначе говоря, двух противоположных гипотез, объясняющих происхождение исследуемого объекта, имеющего профиль E [41]:

$$LR = \frac{P(E|C)}{P(E|\bar{C})}.$$

Первая из этих гипотез (C) заключается в том, что исследуемый объект, имеющий профиль E , действительно произошел от лица (или лиц), проходящего по делу. Вторая гипотеза (\bar{C}), противоположная первой, заключается в том, что этот объект произошел от неизвестного лица (или лиц), а генетические признаки лица (или лиц), проходящего по делу, случайно совпадают с профилем E .

В простых случаях гипотеза C представляет собой достоверное событие, вероятность которого равна единице. При этом идентификационная значимость генетических признаков зависит только от величины вероятности гипотезы \bar{C} , представляющей собой вероятность случайного совпадения генетических признаков. В этих случаях оба способа оценки идентификационной значимости генетических признаков совпадают.

В сложных экспертных случаях, например при исследовании следов, содержащих ДНК нескольких лиц, выполнение гипотезы C может быть связано с каким-либо условием или условиями (определяются обстоятельствами дела) и ее вероятность будет меньше еди-

пищцы. При этом идентификационная значимость генетических признаков зависит от соотношения вероятностей двух гипотез. В этих случаях способ оценки с помощью LR имеет преимущества, так как позволяет наиболее полно учитывать все обстоятельства дела.

Вычисленная величина LR показывает во сколько раз вероятность гипотезы C больше, чем вероятность гипотезы \bar{C} . Чем значение LR больше, тем выше идентификационная значимость генетических признаков. Значение LR равно единице, когда вероятности обеих гипотез равны, – в этом случае ни одна из гипотез не имеет преимуществ. Если LR меньше единицы, т.е. вероятность гипотезы \bar{C} больше, чем вероятность гипотезы C , тогда чем меньше величина LR , тем выше вероятность того, что факт совпадения генетических признаков у сравниваемых объектов обусловлен случайными причинами.

Принцип определения величин вероятностей событий, изучаемых в генотипоскопической экспертизе

Расчеты величин вероятности случайного совпадения генетических признаков или вероятностей гипотез, объясняющих экспертный случай, сводятся к установлению вероятности встречаемости в популяции лица (группы лиц), обладающего определенными генетическими признаками. Данная вероятность теоретически будет равна частоте встречаемости в популяции такого лица (группы лиц).

Методы расчета частот генотипов в популяции основываются на закономерности, названной по имени установивших ее в 1908 г. ученых, на законе Харди-Вайнберга [42]. Смысл этого закона сводится к тому, что частоты аллелей из поколения в поколение в популяции будут оставаться постоянными при соблюдении определенных условий: популяция должна быть достаточно велика, чтобы обеспечить возможность случайного сочетания признаков; должен отсутствовать отбор, благоприятствующий (или неблагоприятствующий) определенным признакам; не должно возникать мутаций; не должна происходить миграция между популяциями. В естественных условиях данные ограничения часто не соблюдаются, однако использование закона как математической модели позволяет в большинстве случаев с достаточной степенью приближения определять частоты встречаемости признаков (и, соответственно, генотипов) в популяции.

Согласно закону, частоты всех аллелей одного локуса ДНК в популяции постоянны, а их сумма равна 1; если в локусе n аллелей, то:

$$p_1 + p_2 + \dots + p_n = 1,$$

где p_1, p_2, p_n – частоты аллелей, обозначенных номерами 1, 2, ... n .

Сумма частот всех генотипов одного локуса также равна 1, а так как каждый из генотипов содержит по два аллеля, то математически равна квадрату суммы частот аллелей:

$$(p_1 + p_2 + \dots + p_n)^2 = p_1^2 + 2p_1p_2 + p_2^2 + \dots + 2p_1p_n + 2p_2p_n + \dots + p_n^2 = 1,$$

где $p_1^2, p_2^2, \dots, p_n^2$ — частоты встречаемости гомозиготных генотипов; $2p_1p_2, \dots, 2p_1p_n, 2p_2p_n$ — частоты встречаемости гетерозиготных генотипов.

Конкретные значения частот встречаемости аллелей (p), используемых при вероятностно-статистической оценке идентификационной значимости результатов генотипоскопического исследования, устанавливаются экспериментально в результате популяционных исследований населения.

Расчет значения вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего определенными генетическими признаками по нескольким локусам, которые не являются сцепленными (наследование по ним происходит независимо), проводится согласно теореме умножения вероятностей (произведение вероятностей встречаемости признаков, вычисленных по каждому из локусов):

$$P = P_1 \cdot P_2 \cdot \dots \cdot P_n,$$

где P_1, P_2, \dots, P_n — значения вероятностей встречаемости признаков, вычисленных по локусам, обозначенным номерами 1, 2, ... n .

При вероятностно-статистической оценке идентификационной значимости результатов генотипоскопического исследования с использованием вероятности случайного совпадения признаков в заключениях эксперта данная вероятность может восприниматься как абстрактное понятие. Поэтому наряду с приведением значения вероятности, ее также целесообразно выразить через частоту встречаемости в популяции выявленного генотипа, например: *вероятность случайного совпадения генетических признаков, выявленных в исследуемом пятне крови и в образце крови подозреваемого гр. П., составляет $1,25 \cdot 10^{-5}$. Это означает, что в среднем один из 80 тыс. человек обладает генетическими признаками, выявленными в пятне крови.*

Вероятностно-статистическая оценка результатов при идентификационных исследованиях

Исследование объектов, содержащих ДНК одного лица

Анализ результатов исследования объектов, содержащих ДНК одного лица, обычно не вызывает особых трудностей. В результате исследования такого объекта могут быть выявлены либо гомозиготный, либо гетерозиготный аллельные профили¹. При этом не будет исключаться его происхождение от лица, обладающего профилем, идентичным профилю исследуемого объекта. В противном случае, т.е. при несовпадении или неполном совпадении аллельных профилей объекта и лица, проходящего по делу, происхождение объекта от этого лица исключается.

Рассмотрим на примерах оба способа оценки идентификационной значимости генетических признаков.

ОЦЕНКА С ПОМОЩЬЮ ВЕРОЯТНОСТИ СЛУЧАЙНОГО СОВПАДЕНИЯ

При исследовании пятна крови **X** выявлен гетерозиготный профиль *ab*, совпадающий с профилем ДНК проходящего по делу лица **A**:

	X	A
<i>a</i>	—	—
<i>b</i>	—	—

Вероятность случайного совпадения генетических признаков пятна крови **X** и проходящего по делу лица **A** равна вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего генотипом *ab*:

$$P = 2p_a p_b,$$

где p_a и p_b — частоты аллелей *a* и *b*; $2p_a p_b$ — частота гетерозиготного генотипа в популяции.

Допустим, что в объекте **X** выявлен гомозиготный профиль, а лицо **A**, проходящее по делу, обладает профилем, идентичным профилю исследуемого объекта:

	X	A
<i>a</i>	—	—

¹ Здесь и далее термины «профиль», «генетические признаки» и «генотип» используются для обозначения аллельного профиля, генетических признаков и генотипа одного локуса ДНК. Все рассматриваемые ниже примеры относятся к случаю, когда исследуется только один локус ДНК.

В этом случае вероятность случайного совпадения генетических признаков равна вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего генотипом aa :

$$P = p_a^2,$$

где p_a^2 — частота гомозиготного генотипа в популяции.

ОЦЕНКА С ПОМОЩЬЮ ВЕЛИЧИНЫ LR

Рассмотрим случай, когда при исследовании пятна крови X выявлен гетерозиготный профиль ab , совпадающий с профилем ДНК проходящего по делу лица A :

	X	A
a	_____	_____
b	_____	_____

Возможны две гипотезы, объясняющие происхождение пятна крови. Гипотеза C , заключающаяся в том, что лицо A действительно является лицом, от которого произошла кровь X , гипотеза \bar{C} — в том, что пятно крови произошло от неизвестного лица, а профили исследуемой крови X и лица A случайно совпадают. Вероятность гипотезы C равна единице, так как для справедливости гипотезы достаточно имеющегося факта совпадения генетических признаков. Гипотеза \bar{C} будет справедлива при факте случайного совпадения генетических признаков. Вероятность этого события равна вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего генотипом ab , т.е. $P(ab|\bar{C}) = 2p_a p_b$; отношение вероятностей равно:

$$LR = \frac{P(ab|C)}{P(ab|\bar{C})} = \frac{1}{2p_a p_b}.$$

Предположим теперь, что в объекте X выявлен гомозиготный профиль, а лицо A , проходящее по делу, обладает профилем, идентичным профилю исследуемого объекта:

	X	A
a	_____	_____

В этом случае анализ проводится аналогично.

Вероятность гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции лица, обладающего генотипом aa , т.е. $P(aa|\bar{C}) = p_a^2$; отношение вероятностей равно:

$$LR = \frac{P(aa|C)}{P(aa|\bar{C})} = \frac{1}{p_a^2}.$$

Исследование объектов, содержащих ДНК нескольких лиц

ПРИНЦИП ОЦЕНКИ ИДЕНТИФИКАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ

В экспертной практике нередки случаи, когда исследуемый объект представляет собой смесь биологических следов разных лиц. На «смешанный» характер происхождения объекта могут указывать обстоятельства дела, внешний вид следов, цитологическое исследование, выявление специфичного аллельного профиля, содержащего более двух аллелей хотя бы в одном из исследованных локусов. Разделение ДНК следов, содержащих биологические следы различного вида (например, сперму и кровь), принципиально возможно, но часто на практике полного разделения не происходит и получаемый аллельный профиль содержит смесь аллельных профилей нескольких лиц. Разделить ДНК следов одного вида, произошедших от разных лиц, вообще не представляется возможным.

Важным отличием профиля «смешанного» объекта от профиля объекта, содержащего ДНК одного человека, является то, что профиль, выявляемый при исследовании объекта, содержащего ДНК нескольких лиц, может отличаться от составляющих его аллельных профилей. Любое попарное сочетание выявленных аллелей будет соответствовать генотипу лица, от которого не исключается происхождение исследуемого объекта. Если у лица имеются аллели, отсутствующие в профиле объекта, то происхождение от него этого объекта исключается.

Оценка идентификационной значимости генетических признаков, выявляемых в «смешанных» объектах с помощью вероятности случайного совпадения, подробно изложена в методических рекомендациях [43] и поэтому здесь не приводится.

Вероятностно-статистическая оценка идентификационной значимости результатов исследования «смешанного» объекта с помощью величины LR проводится следующим образом. С учетом всех известных обстоятельств дела выдвигают две противоположные гипотезы, объясняющие происхождение «смешанного» объекта, и проводят анализ его профиля для каждой гипотезы. Сущность анализа заключается в том, что в зависимости от гипотезы, для которой проводят анализ, устанавливают: кто из лиц, проходящих по делу, является известным источником аллелей в профиль объекта; какие аллели произошли за счет неизвестных лиц. Затем, на основе проведенного анализа вычисляют вероятности гипотез и определяют отношение вероятностей LR [44]. Например, при исследовании пятна,

содержащего наряду со спермой кровь потерпевшей, выявлен профиль abc . Генотип потерпевшей ab , а генотип подозреваемого – cc . В этом случае гипотеза C заключается в том, что пятно произошло от потерпевшей и подозреваемого, а гипотеза \bar{C} – в том, что пятно произошло от потерпевшей и неизвестного лица.

Если верна гипотеза C , то источниками выявленных аллелей a , b и c являются известные лица – потерпевшая и подозреваемый. Вероятность гипотезы равна единице, так как происхождение всех трех аллелей объясняется за счет известных источников. Вероятность гипотезы C записывается как $P_0(\phi|abc) = 1$, где индекс 0 обозначает отсутствие неизвестных лиц, символ ϕ – отсутствие аллелей, которые должны быть внесены в профиль неизвестными лицами, abc – профиль исследуемого объекта.

В случае справедливости гипотезы \bar{C} известным источником аллелей является только потерпевшая, при этом она вносит в профиль объекта аллели a и b . Неизвестное лицо должно являться источником аллеля c и в своем генотипе не иметь никаких других аллелей, кроме a , b и c . Вероятность гипотезы равна вероятности встречаемости в популяции генотипов, удовлетворяющих этому условию, т.е. равна вероятности встречаемости трех генотипов: cc , ac и bc . Вероятность гипотезы \bar{C} записывается как $P_1(c|abc)$, что обозначает наличие одного неизвестного лица, которое является источником аллеля c в профиль abc .

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(\phi|abc)}{P_1(c|abc)}$$

В рассмотренном выше примере предполагалось, что кроме потерпевшей источником аллелей в смешанном объекте является только одно лицо. Допустим, что по обстоятельствам дела известно или предполагается, что таких лиц было два. В этом случае гипотеза C заключается в том, что пятно произошло от потерпевшей, подозреваемого и еще одного неизвестного лица, а гипотеза \bar{C} – в том, что пятно произошло от потерпевшей и двух неизвестных лиц.

При справедливости гипотезы C источниками всех выявленных аллелей a , b и c являются известные лица – потерпевшая и подозреваемый. Неизвестное лицо не является источником каких-либо определенных аллелей, но оно в своем генотипе не должно иметь никаких других аллелей, кроме a , b и c . Вероятность гипотезы равна вероятности встречаемости в популяции генотипов, представляющих

собой любое попарное сочетание аллелей a , b и c . Вероятность гипотезы C записывается как $P_1(\phi|abc)$. Индекс 1 обозначает наличие одного неизвестного лица, символ ϕ – отсутствие каких-либо определенных аллелей, которые должны быть внесены неизвестным лицом в профиль abc .

Если верна гипотеза \bar{C} , то известным источником аллелей является только потерпевшая, при этом она вносит в профиль объекта аллели a и b . Два неизвестных лица должны являться источниками аллеля c . Вероятность гипотезы равна вероятности встречаемости в популяции комбинации генотипов таких двух лиц, в генотипе хотя бы одного из которых имелся бы аллель c , а генотипы обоих лиц не имели бы никаких других аллелей, кроме a , b и c . Вероятность гипотезы \bar{C} записывается как $P_2(c|abc)$, что обозначает наличие двух неизвестных лиц, которые являются источником аллеля c в профиль abc .

В этом случае отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_1(\phi|abc)}{P_2(c|abc)}$$

Аналогичным образом анализируются случаи с большим числом участников.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРОЯТНОСТЕЙ ГИПОТЕЗ

Профиль из одного аллеля

Если профиль исследуемого объекта содержит единичный аллель a , то его источником может быть только лицо, обладающее гомозиготным генотипом aa . Вероятность того, что одно неизвестное лицо является источником аллеля a и не имеет никаких других аллелей, кроме a , будет равна вероятности встречаемости в популяции гомозиготного генотипа aa :

$$P_1(a|a) = p_a^2.$$

Вероятность того, что источником аллеля a являются x неизвестных лиц, равна вероятности встречаемости в популяции комбинации из x гомозиготных генотипов aa :

$$P_x(a|a) = p_a^{2x}.$$

Предположим, что известно лицо, которое является источником аллеля a в профиль исследуемого объекта, тогда неизвестные лица не должны вносить в профиль каких-то определенных аллелей, однако все эти лица должны обладать гомозиготным генотипом aa . Вероятность в этом случае будет равна: $P_x(\phi|a) = p_a^{2x}$.

Профиль из двух аллелей

Если профиль исследуемого объекта содержит аллели a и b , то источниками этих аллелей могут быть генотипы aa , ab и bb . Допустим, что известен источник аллеля b , тогда источником аллеля a могут быть только генотипы aa , ab . Вероятность того, что одно неизвестное лицо является источником аллеля a , равна сумме вероятностей встречаемости в популяции генотипов, обладающих аллелем a и не обладающих никакими другими аллелями, кроме a и b :

$$P_1(a|ab) = p_a^2 + 2p_a p_b = (p_a + p_b)^2 - p_b^2.$$

Вероятность того, что источниками аллеля a являются x неизвестных лиц, равна вероятности встречаемости в популяции комбинации из x лиц, в генотипе хотя бы одного из которых имелся бы аллель a , и генотипы этих лиц имели бы только аллели a и b :

$$P_x(a|ab) = (p_a + p_b)^{2x} - p_b^{2x}.$$

Данная формула представляет собой сумму вероятностей встречаемости всех возможных комбинаций из x генотипов, за исключением случая, когда все x генотипов являются гомозиготами bb , так как данная комбинация генотипов не может являться источником аллеля a . Например, если $x = 2$, то источником аллеля a могут быть следующие комбинации генотипов: aa и aa ; aa и ab ; aa и bb ; ab и ab ; ab и bb . Вероятность встречаемости каждой перечисленной пары генотипов будет соответственно равна: $p_a^2 \cdot p_a^2$; $2 \cdot p_a^2 \cdot 2p_a p_b$; $2 \cdot p_a^2 \cdot p_b^2$; $2p_a p_b \cdot 2p_a p_b$; $2 \cdot 2p_a p_b \cdot p_b^2$. Сумма вероятностей встречаемости перечисленных комбинаций после упрощения приведет к $(p_a + p_b)^4 - p_b^4$.

Допустим теперь, что известны источники аллелей и a и b , тогда неизвестные лица не должны вносить в профиль каких-то определенных аллелей, но генотипы этих лиц не должны иметь никаких других аллелей, кроме a и b . Вероятность будет вычисляться:

$$P_x(\phi|ab) = (p_a + p_b)^{2x}.$$

Таким образом, не исключается ни одна из возможных комбинаций.

Если не известны источники ни аллеля a , ни аллеля b , то неизвестные лица должны быть источниками обоих аллелей и a , и b :

$$P_x(ab|ab) = (p_a + p_b)^{2x} - p_a^{2x} - p_b^{2x}.$$

Эта формула представляет собой сумму вероятностей встречаемости всех возможных комбинаций из x генотипов, за исключением случая, когда все x генотипов являются гомозиготами aa или bb . Предположим, что гетерозиготный профиль исследуемого объекта произошел от одного человека, тогда $P_1(ab|ab) = 2p_a p_b$, т.е. при $x = 1$ источником аллелей a и b может быть только генотип ab .

Профиль из трех аллелей

Если профиль исследуемого объекта содержит аллели a , b и c , то источниками аллелей могут быть генотипы aa , ab , ac , bb , bc и cc . Если известны источники всех трех аллелей a , b и c , то неизвестные лица не должны вносить в профиль каких-то определенных аллелей, но генотипы этих лиц не должны иметь никаких аллелей, кроме a , b и c . Вероятность будет равна:

$$P_x(\phi|abc) = (p_a + p_b + p_c)^{2x}.$$

Вероятность того, что источником аллеля a являются x неизвестных лиц с генотипами, имеющими только аллели a , b и c , равна:

$$P_x(a|abc) = (p_a + p_b + p_c)^{2x} - (p_b + p_c)^{2x}.$$

Например, когда $x = 1$, $P_1(a|abc) = p_a^2 + 2p_ap_b + p_ap_c$, т.е. источником аллеля a могут быть только генотипы aa , ab и ac .

Вероятность того, что источником двух аллелей a и b являются x неизвестных лиц и генотипы этих лиц не имеют никаких других аллелей, кроме a , b и c , равна:

$$P_x(ab|abc) = (p_a + p_b + p_c)^{2x} - (p_b + p_c)^{2x} - (p_a + p_c)^{2x} + p_c^{2x}.$$

В случае, когда $x = 1$, $P_1(ab|abc) = 2p_ap_b$, т.е. источником аллелей a и b может быть только гетерозиготный генотип ab .

И наконец, когда отсутствуют известные источники аллелей, т.е. источниками всех трех аллелей a , b и c являются x неизвестных лиц, вероятность будет равна:

$$P_x(abc|abc) = (p_a + p_b + p_c)^{2x} - (p_a + p_b)^{2x} - (p_a + p_c)^{2x} - (p_b + p_c)^{2x} + p_a^{2x} + p_b^{2x} + p_c^{2x}, x > 1.$$

Значение вероятности равно нулю при $x = 1$, так как одно лицо не может одновременно являться источником всех аллелей: и a , и b , и c .

Профиль из четырех аллелей

Аналогичным образом устанавливаются вероятности для случая, когда получен профиль, состоящий из четырех аллелей:

$$P_x(\phi|abcd) = (p_a + p_b + p_c + p_d)^{2x};$$

$$P_x(a|abcd) = (p_a + p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_b + p_c + p_d)^{2x};$$

$$P_x(ab|abcd) = (p_a + p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_a + p_c + p_d)^{2x} + (p_c + p_d)^{2x};$$

$$P_x(abc|abcd) = (p_a + p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_a + p_c + p_d)^{2x} - (p_a + p_b + p_d)^{2x} + (p_c + p_d)^{2x} + (p_b + p_d)^{2x} + (p_a + p_d)^{2x} - p_d^{2x}, x > 1;$$

$$\begin{aligned}
 P_x(abcd|abcd) &= (p_a + p_b + p_c + p_d)^{2x} - (p_b + p_c + p_d)^{2x} - \\
 &\quad - (p_a + p_c + p_d)^{2x} - (p_a + p_b + p_d)^{2x} - (p_a + p_b + p_c)^{2x} + \\
 &\quad + (p_c + p_d)^{2x} + (p_b + p_d)^{2x} + (p_b + p_c)^{2x} + (p_a + p_d)^{2x} + \\
 &\quad + (p_a + p_c)^{2x} + (p_a + p_b)^{2x} - p_a^{2x} - p_b^{2x} - p_c^{2x} - p_d^{2x}, \\
 &\quad x > 1.
 \end{aligned}$$

Профиль из n аллелей

Для вычисления вероятности в случае, когда профиль E исследуемого объекта содержит более четырех аллелей и предполагается, что источниками U аллелей являются x неизвестных лиц, можно использовать следующую закономерность:

$$P_x(U | E) = (T_0)^{2x} - \sum_i (T_{1_i})^{2x} + \sum_{i,j} (T_{2_{i,j}})^{2x} - \sum_{i,j,k} (T_{3_{i,j,k}})^{2x} + \dots,$$

где T_0 – сумма частот всех аллелей профиля E ; T_{1_i} – сумма частот аллелей профиля E , за исключением i -того аллеля, перечисленного в U ; $T_{2_{i,j}}$ – сумма частот аллелей профиля E , за исключением i -того и j -того аллелей, перечисленных в U , и т.д.

Например, профиль объекта содержит пять аллелей a, b, c, d, e , и необходимо вычислить вероятность того, что источником двух аллелей a и b являются x неизвестных лиц. Данная вероятность определяется следующим образом:

$$\begin{aligned}
 P_x(ab|abcde) &= (p_a + p_b + p_c + p_d + p_e)^{2x} - (p_b + p_c + p_d + p_e)^{2x} - \\
 &\quad - (p_a + p_c + p_d + p_e)^{2x} + (p_c + p_d + p_e)^{2x}.
 \end{aligned}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ LR

При проведении вероятностно-статистической обработки результатов исследования следов, содержащих ДНК нескольких лиц, требуется информация о числе лиц, ДНК которых содержится в «смешанном» объекте. Обычно данная информация следует из известных обстоятельств дела, однако не исключены случаи, когда точное число лиц, от которых произошел исследуемый объект, не известно. В этих случаях необходимо проводить анализ для нескольких предполагаемых значений x , учитывая при этом характер профилей, которые были получены в результате исследования. Например, если при исследовании локусов хотя бы в одном выявлен профиль, содержащий более четырех аллелей, то это означает, что источников аллелей не могло быть меньше трех лиц. Поэтому вариант с участием двух лиц вообще не должен рассматриваться.

Кроме того, при исследовании объектов, содержащих ДНК нескольких лиц, рекомендуется проводить вероятностно-статистическую обработку результатов только после осуществления типирования нескольких высокополиморфных локусов ДНК. Это в значительной степени облегчает интерпретацию результатов, особенно когда генотипы потерпевшей и подозреваемого лица по отдельным локусам совпадают.

Теперь проиллюстрируем применение рассмотренных выше формул на двух примерах, приведенных в начале этого раздела. Итак, при исследовании объекта **X**, содержащего ДНК нескольких лиц, выявлен профиль *abc*. Генотип потерпевшей **A** – *ab*, а генотип подозреваемого **B** – *cc*:

	X	A	B
<i>a</i>	—	—	
<i>b</i>	—	—	
<i>c</i>	—		—

Согласно первому примеру рассмотрим следующие гипотезы:

C – объект произошел от потерпевшей и подозреваемого;

\bar{C} – объект произошел от потерпевшей и неизвестного лица.

Вероятность гипотезы C равна единице, так как происхождение всех трех аллелей объясняется за счет известных источников:

$$P_0(\phi|abc) = 1.$$

Вероятность гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции генотипов, которые могут являться источниками аллеля *c* и не имеют никаких других аллелей, кроме *a*, *b* и *c*, т.е. равна сумме вероятностей встречаемости трех генотипов *cc*, *ac* и *bc*:

$$P_1(c|abc) = (p_a + p_b + p_c)^2 - (p_a + p_b)^2 = p_c^2 + 2p_a p_c + p_b p_c.$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(\phi|abc)}{P_1(c|abc)} = \frac{1}{p_c^2 + 2p_a p_c + p_b p_c}.$$

Это означает, что исследуемый объект мог произойти от подозреваемого лица **B**. Вероятность того, что верна гипотеза C , в LR раз больше, чем вероятность того, что верна гипотеза \bar{C} .

Кроме того, в данном случае допустимо выразить результат с помощью вероятности случайного совпадения генетических признаков объекта **X** и лица **B**. При этом вероятность случайного совпадения генетических признаков исследуемого объекта **X** и лица **B** составляет: $P = p_c^2 + 2p_a p_c + p_b p_c$.

Согласно второму примеру возможны следующие гипотезы:

C – объект произошел от потерпевшей, подозреваемого и еще одного неизвестного лица;

\bar{C} – объект произошел от потерпевшей и двух неизвестных лиц.

Вероятность гипотезы C определяется вероятностью встречаемости в популяции лица, которое не должно вносить в профиль каких-то определенных аллелей, но при этом в своем генотипе не должно иметь никаких других аллелей, кроме a , b и c :

$$P_1(\phi|abc) = (p_a + p_b + p_c)^2.$$

Вероятность гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции комбинации генотипов из двух лиц, в генотипе хотя бы одного из которых имелся бы аллель c , а генотипы обоих лиц не имели бы никаких аллелей, кроме a , b и c :

$$P_2(c|abc) = (p_a + p_b + p_c)^4 - (p_a + p_b)^4.$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_1(\phi|abc)}{P_2(c|abc)} = \frac{(p_a + p_b + p_c)^2}{(p_a + p_b + p_c)^4 - (p_a + p_b)^4}.$$

Это означает, что исследуемый объект мог произойти от подозреваемого лица B . Вероятность того, что верна гипотеза C , в LR раз больше, чем вероятность того, что верна гипотеза \bar{C} .

ПРИМЕР РАСЧЕТА ВЕЛИЧИНЫ LR

При исследовании пятна, содержащего сперму и кровь потерпевшей, а также образцов крови потерпевшей и подозреваемого лица установлены генетические признаки, представленные в табл. 4.

Таблица 4

Результаты типирования локусов, выявленные аллели

Исследованный локус	Исследуемое пятно	Генотип потерпевшей	Генотип подозреваемого
CSF1PO	10, 12	10, 12	12, 12
TPOX	8, 9, 11	8, 11	8, 9
TH01	6, 9, 9,3	6, 9	9,3, 9,3
F13A01	3,2, 6, 7	7, 7	3,2, 6
FESFPS	11, 12	11, 12	11, 12
vWA	15, 16, 17, 18	15, 17	16, 18

Примечание. Аллели обозначены номерами в соответствии с принятой международной номенклатурой.

Согласно известным обстоятельствам дела и выявленным генетическим признакам допустимы две гипотезы:

C – пятно произошло от потерпевшей и подозреваемого;

\bar{C} – пятно произошло от потерпевшей и одного неизвестного лица.

Вероятность гипотезы C равна единице, так как происхождение всех аллелей во всех исследуемых локусах объясняется за счет известных источников – потерпевшей и подозреваемого.

Расчет вероятности гипотезы \bar{C} представлен в табл. 5.

Таблица 5

Расчет вероятности гипотезы \bar{C}

Исследованный локус	Частота встречаемости аллелей [38]	Формула расчета	Величина $P_i(\bar{C})$
CSFIPO	$p_{10} = 0.251$; $p_{12} = 0.330$	$P_1(\phi 10, 12) = (p_{10} + p_{12})^2$	0.338
TPOX	$p_8 = 0.528$; $p_9 = 0.093$; $p_{11} = 0.284$	$P_1(9 8, 9, 11) =$ $= (p_8 + p_9 + p_{11})^2 - (p_8 + p_{11})^2$	0.160
TH01	$p_6 = 0.237$; $p_9 = 0.155$; $p_{93} = 0,331$	$P_1(9,3 6, 9, 9,3) =$ $= (p_6 + p_9 + p_{93})^2 - (p_6 + p_9)^2$	0.369
F13A01	$p_{32} = 0.085$; $p_6 = 0.287$; $p_7 = 0.329$	$P_1(3,2, 6 3,2, 6, 7) =$ $= (p_{32} + p_6 + p_7)^2 - (p_6 + p_7)^2 -$ $- (p_{32} + p_7)^2 + p_7^2 = 2p_{32}p_6$	0.049
FESFPS	$p_{11} = 0.439$; $p_{12} = 0.225$	$P_1(\phi 11, 12) = (p_{11} + p_{12})^2$	0.441
vWA	$p_{15} = 0,082$; $p_{16} = 0,211$; $p_{17} = 0,265$; $p_{18} = 0.202$	$P_1(16, 18 15, 16, 17, 18) =$ $= (p_{15} + p_{16} + p_{17} + p_{18})^2 -$ $- (p_{15} + p_{17} + p_{18})^2 -$ $- (p_{15} + p_{16} + p_{17})^2 +$ $+ (p_{15} + p_{17})^2 = 2p_{16}p_{18}$	0.085
Итого:			$3,67 \cdot 10^{-5}$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(C)}{P_1(\bar{C})} = \frac{1}{3,67 \cdot 10^{-5}} \approx 27000.$$

Таким образом, сперма, вероятно, произошла от подозреваемого лица. Вероятность того, что исследуемое пятно, содержащее кровь и сперму, произошло за счет крови потерпевшей и спермы

подозреваемого, в 27 тыс. раз больше, чем вероятность того, что исследуемое пятно произошло за счет крови потерпевшей и спермы неизвестного лица.

Кроме того, в данном случае допустимо выразить результат с помощью вероятности случайного совпадения генетических признаков исследуемого пятна и подозреваемого лица. При этом вероятность случайного совпадения генетических признаков исследуемого пятна и подозреваемого лица составляет $3,67 \cdot 10^{-5}$. Это означает, что в среднем один из 27 тыс. человек обладает генетическими признаками, выявленными в исследуемом пятне.

Предположим, что полученный уровень идентификации не удовлетворил эксперта и исследование генетических признаков было продолжено. Было проведено типирование еще двух полиморфных STR-локусов LPL и F13B (табл. 6).

Таблица 6

Результаты типирования локусов, выявленные аллели

Исследованный локус	Исследуемое пятно	Генотип потерпевшей	Генотип подозреваемого
LPL	10, 11, 12	10, 12	10, 12
F13B	8, 9, 10	10, 10	9, 10

Примечание. Аллели обозначены номерами в соответствии с принятой международной номенклатурой.

Предложенные ранее гипотезы, объясняющие происхождение исследуемого пятна, противоречат полученным результатам, так как источник аллеля 11 локуса LPL и аллеля 8 локуса F13B ими не объясняется. Если обстоятельствами дела строго оговорено, что участником преступления являлось одно лицо, тогда подозреваемый исключается. Если число участников неизвестно, то согласно выявленным генетическим признакам допустимы следующие гипотезы:

C – пятно произошло от потерпевшей, подозреваемого и еще одного неизвестного лица;

\bar{C} – пятно произошло от потерпевшей и двух неизвестных лиц.

Вероятность гипотезы C в данном случае меньше единицы, так как ее выполнение связано с условием существования одного неизвестного лица с определенными генетическими признаками.

Расчет вероятностей гипотез C и \bar{C} представлен в табл. 7.

Расчет вероятностей гипотез C и \bar{C}

Исследованный локус и частота встречаемости аллелей [38]	Величина $P_1(C)$		Величина $P_2(\bar{C})$		
	Формула расчета	$P(C)$	Формула расчета	$P(\bar{C})$	
CSFIPO $p_{10} = 0,251$; $p_{12} = 0,330$	$P_1(\phi 10, 12) =$ $= (p_{10} + p_{12})^2$	0,338	$P_2(\phi 10, 12) =$ $= (p_{10} + p_{12})^4$	0,114	
TPOX $p_8 = 0,528$; $p_9 = 0,093$; $p_{11} = 0,284$	$P_1(\phi 8, 9, 11) =$ $= (p_8 + p_9 + p_{11})^2$	0,819	$P_2(9 8, 9, 11) =$ $= (p_8 + p_9 + p_{11})^4 -$ $- (p_8 + p_{11})^4$	0,015	
TH01 $p_6 = 0,237$; $p_9 = 0,155$; $p_{93} = 0,331$	$P_1(\phi 6, 9, 9.3) =$ $= (p_6 + p_9 + p_{93})^2$	0,523	$P_2(9.3 6, 9, 9.3) =$ $= (p_6 + p_9 + p_{93})^4 -$ $- (p_6 + p_9)^4$	0,250	
F13A01 $p_{32} = 0,085$; $p_6 = 0,287$; $p_7 = 0,329$	$P_2(\phi 3.2, 6, 7) =$ $= (p_{32} + p_6 + p_7)^2$	0,491	$P_2(3.2, 6 3.2, 6, 7) =$ $= (p_{32} + p_6 + p_7)^4 -$ $- (p_6 + p_7)^4 -$ $- (p_{32} + p_7)^4 + p_7^4$	0,069	
FESFPS $p_{11} = 0,439$; $p_{12} = 0,225$	$P_1(\phi 11, 12) =$ $= (p_{11} + p_{12})^2$	0,441	$P_2(\phi 11, 12) =$ $= (p_{11} + p_{12})^4$	0,194	
vwv $p_{15} = 0,082$; $p_{16} = 0,211$; $p_{17} = 0,265$; $p_{18} = 0,202$	$P_1(\phi 15, 16, 17, 18) =$ $= (p_{15} + p_{16} + p_{17} + p_{18})^2$	0,578	$P_2(16, 18 15, 16, 17, 18) =$ $= (p_{15} + p_{16} + p_{17} + p_{18})^4 -$ $- (p_{15} + p_{17} + p_{18})^4 -$ $- (p_{15} + p_{16} + p_{17})^4 +$ $+ (p_{15} + p_{17})^4$	0,160	
LPL $p_{10} = 0,412$; $p_{11} = 0,287$; $p_{12} = 0,203$	$P_1(11 10, 11, 12) =$ $= (p_{10} + p_{11} + p_{12})^2 -$ $- (p_{10} + p_{12})^2$	0,435	$P_2(11 10, 11, 12) =$ $= (p_{10} + p_{11} + p_{12})^4 -$ $- (p_{10} + p_{12})^4$	0,519	
F13B $p_8 = 0,259$; $p_9 = 0,215$; $p_{10} = 0,402$	$P_1(8 8, 9, 10) =$ $= (p_8 + p_9 + p_{10})^2 -$ $- (p_9 + p_{10})^2$	0,387	$P_2(8, 9 8, 9, 10) =$ $= (p_8 + p_9 + p_{10})^4 -$ $- (p_9 + p_{10})^4 -$ $- (p_8 + p_{10})^4 + p_{10}^4$	0,279	
Итого:		$3,05 \cdot 10^{-3}$	Итого:		$1,33 \cdot 10^{-7}$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_1(C)}{P_2(C)} = \frac{3,05 \cdot 10^{-3}}{1,33 \cdot 10^{-7}} \approx 23000.$$

Таким образом, сперма, вероятно, произошла от подозреваемого лица. Вероятность того, что исследуемое пятно, содержащее кровь и сперму, произошло за счет крови потерпевшей и спермы подозреваемого и еще одного неизвестного лица, в 23 тыс. раз больше, чем вероятность того, что исследуемое пятно произошло за счет крови потерпевшей и спермы двух неизвестных лиц.

Вероятностно-статистическая оценка результатов в экспертизах по установлению родства

ПРИНЦИП ОЦЕНКИ ИДЕНТИФИКАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ

Задачей экспертизы является установление возможности происхождения конкретного лица (ребенка) от одного или двух предполагаемых родителей. Особенностью анализа результатов исследования родства, по сравнению с идентификационным исследованием, является то, что каждый родитель передает своему ребенку только один аллель каждого локуса ДНК. Это означает, что потенциальным родителем ребенка может быть любой человек, имеющий в своем генотипе хотя бы один одинаковый с генотипом ребенка аллель по каждому исследованному локусу. В противном случае родство исключается (однако следует иметь в виду, что мутации, происходящие в полиморфных локусах, могут приводить к несовпадению генотипов ребенка и его истинного родителя, поэтому исключение родства допустимо только при установлении несовпадений в нескольких локусах ДНК).

Оценка идентификационной значимости генетических признаков с помощью вероятности случайного совпадения подробно изложена в методических рекомендациях [45] и поэтому здесь не приводится.

При проведении вероятностно-статистической обработки результатов исследования в экспертизах по установлению родства (с учетом всех известных обстоятельств дела) выдвигают две противоположные гипотезы, объясняющие родство ребенка и предполагаемых родителей. Затем для каждой гипотезы осуществляют анализ профиля ребенка, в результате которого из числа предполагаемых родителей устанавливают известные и неизвестные источники алле-

лей в профиль ребенка. После этого вычисляют вероятности гипотез и определяют отношение вероятностей LR .

Например, при исследовании образца крови ребенка выявлен гетерозиготный профиль ab . Генотип предполагаемого родителя ac , генотип второго родителя неизвестен. Очевидно, что предполагаемый родитель может являться истинным родителем ребенка, так как их генотипы имеют общий аллель a . В этом случае гипотеза C заключается в том, что родителями ребенка являются лицо, проходящее по делу, и неизвестное лицо, а гипотеза \bar{C} – в том, что родителями ребенка являются два неизвестных лица.

Если верна гипотеза C , то источником аллеля a в профиле ребенка является известное лицо – предполагаемый родитель. Неизвестное лицо является источником аллеля b и поэтому должно иметь генотип $bх$, где $х$ – это любой из аллелей, имеющихся в исследуемом локусе. Вероятность гипотезы равна вероятности встречаемости в популяции генотипов, удовлетворяющих это условие, т.е. равна вероятности встречаемости генотипа $bх$. Вероятность гипотезы C записывается как $P_1(b|ab)$, где индекс 1 обозначает наличие одного неизвестного родителя, от которого наследуется аллель b ; ab – профиль ребенка.

В случае справедливости гипотезы \bar{C} известных источников аллелей нет. Оба аллеля ребенка должны наследоваться от двух неизвестных лиц, при этом аллель a наследуется от одного лица, а аллель b – от другого. Вероятность гипотезы равна вероятности встречаемости в популяции таких комбинаций генотипов двух лиц, чтобы соблюдалось условие: в каждой комбинации один генотип – ax , а другой – $bх$. Вероятность гипотезы \bar{C} записывается как $P_2(a,b|ab)$, что обозначает наличие двух неизвестных лиц, от которых наследуются аллели a и b ; ab – профиль ребенка.

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_1(b|ab)}{P_2(a,b|ab)}$$

Аналогичным образом анализируются и другие случаи, рассматриваемые при проведении экспертиз по установлению родства.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРОЯТНОСТЕЙ ГИПОТЕЗ

Рассмотрим теперь, как вычисляются вероятности гипотез, объясняющих родство ребенка и предполагаемых родителей.

В первую очередь проанализируем ситуацию, когда у ребенка выявляется гомозиготный профиль, например aa . В этом случае

потенциальным родителем ребенка является любой человек, обладающий аллелем a . Вероятность того, что аллель a наследуется от одного неизвестного лица, равна сумме вероятностей встречаемости в популяции генотипов, обладающих аллелем a [45], т.е.:

$$P_1(a|aa) = 2p_1p_a + 2p_2p_a \dots + p_a^2 + \dots + 2p_np_a.$$

Данное выражение может быть упрощено следующим образом:

$$\begin{aligned} P_1(a|aa) &= 2p_1p_a + 2p_2p_a + \dots + p_a^2 + \dots + 2p_np_a + 2p_a^2 - 2p_a^2 = \\ &= p_a[(2p_1 + 2p_2 + \dots + 2p_n) + p_a - 2p_a] = \\ &= p_a(2 - p_a). \end{aligned}$$

Вероятность того, что аллель a наследуется от двух неизвестных лиц, равна вероятности встречаемости в популяции комбинации из двух генотипов, в каждом из которых имеется аллель a :

$$P_2(a, a|aa) = [p_a(2 - p_a)]^2.$$

Рассмотрим теперь случай, когда у ребенка выявляется гетерозиготный профиль, например ab . Допустим, что один из родителей известен и от него наследуется аллель b , тогда аллель a наследуется от неизвестного родителя. Вероятность того, что аллель a наследуется от одного неизвестного лица, равна сумме вероятностей встречаемости в популяции генотипов, обладающих аллелем a :

$$P_1(a|ab) = p_a(2 - p_a).$$

Возможна также ситуация, когда гетерозиготный профиль ребенка и профиль известного родителя полностью совпадают. В этом случае невозможно установить, какой из аллелей наследуется от неизвестного лица. Вероятность того, что от одного неизвестного лица наследуется или аллель a , или аллель b , равна сумме вероятностей встречаемости в популяции генотипов, обладающих или аллелем a , или аллелем b , т.е. $p_a(2 - p_a) + p_b(2 - p_b)$. Однако с учетом того, что каждое слагаемое данного выражения включает в себя частоту встречаемости гетерозиготного генотипа ab , окончательная формула расчета будет выглядеть следующим образом:

$$P_1(a, b|ab) = p_a(2 - p_a) + p_b(2 - p_b) - 2p_ap_b.$$

И наконец, если не известен ни один из родителей ребенка, имеющего гетерозиготный профиль ab , тогда от двух неизвестных лиц должны наследоваться оба аллеля — a , и b . Вероятность того, что от одного неизвестного лица наследуется аллель a , а от второго — аллель b , равна вероятности встречаемости в популяции таких комбинаций из двух генотипов, чтобы одновременно в одном

генотипе имелся бы аллель a , а в другом – аллель b . Данная вероятность будет вычисляться по следующей формуле:

$$P_2(a, b|ab) = 2 \cdot p_a(2 - p_a) \cdot p_b(2 - p_b) - 2p_a p_b \cdot 2p_a p_b.$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ LR

Проиллюстрируем применение рассмотренных выше формул на нескольких примерах.

Допустим, что при исследовании образца крови ребенка X выявлен гетерозиготный профиль ab . Генотип предполагаемого родителя $A - aa$, генотип второго родителя неизвестен:

	X	A
a	—	—
b	—	

Очевидно, что лицо A может являться истинным родителем ребенка, так как их генотипы имеют общий аллель a . Возможны следующие гипотезы:

C – родителями ребенка являются лицо A и неизвестное лицо;

\bar{C} – родителями ребенка являются два неизвестных лица.

Проанализируем гипотезу C . От известного лица наследуется аллель a , а так как генотип ребенка ab , то от неизвестного лица должен наследоваться аллель b . Вероятность гипотезы C равна вероятности встречаемости в популяции лица, которое имеет в своем генотипе аллель b :

$$P_1(b|aa) = p_b(2 - p_b).$$

Вероятность гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции таких комбинаций из двух генотипов, чтобы в одном генотипе имелся бы аллель a , а в другом – аллель b :

$$P_2(a, b|ab) = 2 \cdot p_a(2 - p_a) \cdot p_b(2 - p_b) - 2p_a p_b \cdot 2p_a p_b.$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_1(b|ab)}{P_2(a, b|ab)} = \frac{p_b(2 - p_b)}{2p_a(2 - p_a)p_b(2 - p_b) - 4p_a^2 p_b^2}.$$

Это означает, что лицо A может являться родителем ребенка X . Вероятность того, что верна гипотеза C , в LR раз больше, чем вероятность того, что верна гипотеза \bar{C} .

Аналогично вычисляется отношение вероятностей для случая, когда у ребенка гомозиготный профиль.

Теперь рассмотрим случай, когда один из родителей известен (типичный случай экспертизы спорного отцовства). Предположим,

что у ребенка **X** гетерозиготный профиль ab , генотип его матери **M** – bb , а генотип предполагаемого родителя **A** – ab :

	M	X	A
a	_____	_____	_____
b	_____	_____	_____

Предполагаемый родитель может являться истинным родителем ребенка, так как их генотипы имеют общий аллель a , и при этом данный аллель не наследуется от матери. Возможны следующие гипотезы:

\overline{C} – родителями ребенка являются известная мать и лицо **A**;

\overline{C} – родителями ребенка являются известная мать и неизвестное лицо.

Вероятность гипотезы \overline{C} равна единице, так как наследование обоих аллелей ребенка объясняется наличием этих аллелей в генотипах известных лиц:

$$P_0(\phi|ab) = 1.$$

Вероятность гипотезы \overline{C} равна вероятности встречаемости в популяции лица, которое имеет в своем генотипе аллель a :

$$P_1(a|ab) = p_a(2 - p_a).$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(\phi|ab)}{P_1(a|ab)} = \frac{1}{p_a(2 - p_a)}.$$

Это означает, что лицо **A** может являться родителем ребенка **X**. Вероятность того, что верна гипотеза \overline{C} , в LR раз больше, чем вероятность того, что верна гипотеза \overline{C} . Кроме того, в данном случае допустимо выразить результат с помощью вероятности случайного совпадения генетических признаков лица **A** и ребенка **X**. При этом вероятность случайного совпадения признаков составляет $p_a(2 - p_a)$.

Рассмотрим случай, когда генотипы известного родителя и ребенка совпадают. Например, допустим, что у ребенка **X** гетерозиготный профиль ab , генотип его матери **M** также ab , а генотип предполагаемого родителя **A** – ac :

	M	X	A
a	_____	_____	_____
b	_____	_____	_____
c	_____	_____	_____

Предполагаемый родитель может являться истинным родителем ребенка, так как их генотипы имеют общий аллель a , однако установить, какой из аллелей (a или b) наследуется от отца, не представля-

ется возможным. Возможны такие же гипотезы, как и в предыдущем случае:

C – родителями ребенка являются известная мать и лицо A ;

\bar{C} – родителями ребенка являются известная мать и неизвестное лицо.

Вероятность гипотезы C , как и в предыдущем случае, равна единице: $P_0(\phi|ab) = 1$.

Вероятность же гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции лица, которое имеет в своем генотипе или аллель a , или аллель b :

$$P_1(a, b|ab) = p_a(2 - p_a) + p_b(2 - p_b) - 2p_ap_b.$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(\phi|ab)}{P_1(a, b|ab)} = \frac{1}{p_a(2 - p_a) + p_b(2 - p_b) - 2p_ap_b}.$$

И наконец, рассмотрим ситуацию, когда устанавливается родство ребенка и пары предполагаемых родителей. Данный случай встречается в экспертизах по установлению факта замены или кражи детей, а также при идентификации останков неизвестных лиц. Предположим, что у ребенка X гетерозиготный профиль ab , генотипы предполагаемых матери M и отца O – соответственно bc и ac :

	M	X	O
a	_____	_____	_____
b	_____	_____	_____
c	_____	_____	_____

Данные два родителя могут являться истинными родителями ребенка, так как их генотипы имеют общие аллели с генотипом ребенка и все аллели ребенка присутствуют в этих генотипах. Возможны следующие гипотезы:

C – родителями ребенка является пара лиц, проходящих по делу;

\bar{C} – родителями ребенка являются два неизвестных лица.

Вероятность гипотезы C равна единице, так как наследование обоих аллелей ребенка объясняется наличием этих аллелей в генотипах известных лиц:

$$P_0(\phi|ab) = 1.$$

Вероятность гипотезы \bar{C} равна вероятности встречаемости в популяции таких комбинаций из двух генотипов, чтобы одновременно в одном генотипе имелся бы аллель a , а в другом – аллель b :

$$P_2(a, b|ab) = 2 \cdot p_a(2 - p_a) \cdot p_b(2 - p_b) - 2p_ap_b \cdot 2p_ap_b.$$

Отношение вероятностей двух гипотез равно:

$$LR = \frac{P_0(\phi|ab)}{P_2(a,b|ab)} = \frac{1}{2p_a(2-p_a)p_b(2-p_b) - 4p_a^2 p_b^2}$$

Это означает, что лица М и О могут являться родителями ребенка Х. Вероятность того, что верна гипотеза С, в LR раз больше, чем вероятность того, что верна гипотеза \bar{C} . Кроме того, в данном случае, как и в двух предыдущих, допустимо выразить результат с помощью вероятности случайного совпадения. В этом случае вероятность случайного совпадения генетических признаков ребенка Х и пары лиц М и О составляет:

$$2 \cdot p_a(2 - p_a) \cdot p_b(2 - p_b) - 2p_a p_b \cdot 2p_a p_b.$$

Особенности вероятностно-статистической обработки при объединении результатов установления группы и пола исследуемого объекта с результатами анализа ДНК

При проведении генотипоскопической экспертизы часто предварительно проводят установление генетического пола и группы объекта исследования (например, определяется группа по системам АВ0, GC и т.д.). Кроме того, в некоторых случаях пол лица, от которого произошел исследуемый объект, заранее известен (например, когда объектом является сперма).

Групповая принадлежность по какой-либо системе является таким же групповым генетическим признаком, как и генетические признаки, выявляемые при исследовании полиморфных локусов ДНК. Поэтому при выполнении расчетов вероятностей гипотез (объясняющих экспертный случай) по нескольким локусам ДНК в расчет вводят вероятность встречаемости в популяции лица, обладающего соответствующими признаками исследованной групповой системы.

Половая принадлежность также является групповым генетическим признаком, и поэтому логично было бы при расчетах вероятностей гипотез вводить и вероятность встречаемости определенных признаков пола (т.е. коэффициент 0,5). Однако половая принадлежность является особым признаком, который априори известен у лиц, проходящих по делу. При формулировании гипотез установленная половая принадлежность объекта обычно прямо указывается, тем самым сужая группу лиц, которые потенциально могли быть причастны к делу. Введение же коэффициента 0,5 в расчеты вероятностей привело бы к ошибочному завышению величины LR и формулировке вывода в некорректной форме.

Таким образом, при расчетах вероятностей гипотез не следует вводить коэффициент 0,5; при формулировании экспертных выводов необходимо указывать генетический пол исследуемого объекта и то, что при математической обработке результатов учитывались генетические признаки только лиц определенного пола.

Особенности вероятностно-статистической обработки при исследовании признаков, сцепленных с полом

В настоящее время у экспертов появилась возможность (наряду с исследованием полиморфных локусов, локализованных на аутосомах) проводить типирование полиморфных STR-локусов, располагающихся на половых хромосомах. Применение таких локусов в генотипоскопической экспертизе позволяет значительно упростить анализ аллельных профилей объектов, содержащих ДНК нескольких лиц (особенно, когда эти лица разного пола). В совокупности с остальными генетическими признаками исследование полиморфных локусов половых хромосом способствует значительному повышению идентификационной значимости исследования по сравнению с исследованием одних лишь локусов аутосом. Кроме того, применение этих локусов перспективно и в экспертизах по установлению родства.

К полиморфным STR-локусам, локализованным на Y-хромосоме, относятся локусы DYS19, DYS390 и DYS393; на X-хромосоме — локусы HPRTB и DXS7423.

Рассмотрим особенности локусов, локализованных на Y-хромосоме. Первой особенностью данных локусов является то, что они присутствуют только у лиц мужского генетического пола. Поэтому при исследовании объектов, содержащих смесь ДНК женщины и мужчины, будут выявлены только генетические признаки мужчины. Таким образом, установление генетических признаков исследуемого объекта по данным локусам эквивалентно установлению мужского генетического пола. Второй особенностью этих локусов является их присутствие в клетке только в одной хромосоме, т.е. в единственном числе. Иначе говоря, генотип по данным локусам не может быть гетерозиготен, а следовательно, частота встречаемости в популяции какого-либо генотипа равна частоте встречаемости в популяции аллеля, соответствующего этому генотипу.

Для расчета вероятностей гипотез, объясняющих экспертный случай, используются формулы, похожие на формулы, применяемые при анализе аутосомных локусов.

ПРОФИЛЬ ИЗ ДВУХ АЛЛЕЛЕЙ

Если профиль исследуемого объекта содержит единичный аллель a , то это единственный случай, когда объект мог произойти от одного лица. В этом случае вероятность того, что этот объект произошел от одного лица, равна вероятности встречаемости в популяции генотипа a :

$$P_1(a|a) = p_a.$$

Если объект мог произойти от нескольких лиц, то вероятность того, что источником аллеля a являются x неизвестных лиц, равна вероятности встречаемости комбинации из x генотипов a :

$$P_x(a|a) = p_a^x.$$

Профиль из двух аллелей

Если профиль исследуемого объекта содержит аллели a и b , то исследуемый объект произошел от двух или более лиц, т.е. является «смешанным». Допустим, что известны источник и аллеля a , и аллеля b , тогда неизвестные лица не должны вносить в профиль каких-то определенных аллелей, но генотипы этих лиц не могут быть никакими другими, кроме a и b . Вероятность будет вычисляться:

$$P_x(\phi|ab) = (p_a + p_b)^x.$$

Если известен источник только аллеля b , тогда не известен источник аллеля a . Вероятность того, что источником аллеля a являются x неизвестных лиц, равна вероятности встречаемости в популяции комбинации из x лиц, в генотипе хотя бы одного из которых имелся бы аллель a , а генотипы этих лиц были бы только a и b :

$$P_x(a|ab) = (p_a + p_b)^x - p_b^x.$$

Если не известны источники ни аллеля a , ни аллеля b , тогда неизвестные лица должны быть источниками обоих аллелей и a , и b :

$$P_x(ab|ab) = (p_a + p_b)^x - p_a^x - p_b^x, \quad x > 1.$$

Профиль из трех аллелей

Если профиль исследуемого объекта содержит аллели a , b и c , то исследуемый объект произошел от трех или более лиц.

Вероятности в этом случае устанавливаются аналогичным образом:

$$P_x(\phi|abc) = (p_a + p_b + p_c)^x;$$

$$P_x(a|abc) = (p_a + p_b + p_c)^x - (p_b + p_c)^x;$$

$$P_x(ab|abc) = (p_a + p_b + p_c)^x - (p_b + p_c)^x - (p_a + p_c)^x + p_c^x, \quad x > 1;$$

$$P_x(abc|abc) = (p_a + p_b + p_c)^x - (p_a + p_b)^x - (p_a + p_c)^x - (p_b + p_c)^x + p_a^{2x} + p_b^{2x} + p_c^{2x}, \quad x > 2.$$

Профиль из n аллелей

Для вычисления вероятности в случае, когда профиль E исследуемого объекта содержит более трех аллелей, и предполагается, что источниками U аллелей являются x неизвестных лиц, можно использовать следующую закономерность:

$$P_x(U|E) = (T_0)^x - \sum_i (T_{1,i})^x + \sum_{i,j} (T_{2,i,j})^x - \sum_{i,j,k} (T_{3,i,j,k})^x + \dots,$$

где T_0 — это сумма частот всех аллелей профиля E ; $T_{1,i}$ — сумма частот аллелей профиля E , за исключением i -того аллеля, перечисленного в U ; $T_{2,i,j}$ — сумма частот аллелей профиля E , за исключением i -того и j -того аллелей, перечисленных в U , и т.д.

Рассмотрим теперь особенности локусов, локализованных на X-хромосоме. Особенностью данных локусов является то, что хотя они и присутствуют у лиц женского и мужского генетического пола, но у лиц женского пола они представлены в двух X-хромосомах, а у лиц мужского пола — только в одной. Выявление в исследуемом объекте гетерозиготного профиля косвенно указывает на происхождение этого объекта от лица женского генетического пола. Гомозиготный профиль характерен как для женского, так и для мужского пола. Поэтому перед исследованием локусов, локализованных на X-хромосоме, необходимо проводить установление генетического пола исследуемого объекта.

Если исследуемый объект произошел от лица женского пола, то при вычислении вероятностей гипотез, объясняющих экспертный случай, используют такие же формулы, как и при исследовании аутосомных локусов. Если же объект произошел от лица мужского пола, то применяют формулы, используемые при анализе результатов исследования локусов, локализованных на Y-хромосоме.

Глава 4

ФОРМИРОВАНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЯ ЭКСПЕРТА

Общие требования к заключению эксперта

В УПК РСФСР требования к содержанию заключения эксперта сформулированы лишь в самой общей форме. Статья 191 гласит, что в заключении «...должно быть указано: когда, где, кем (фамилия, имя, отчество, образование, специальность, ученая степень и звание, занимаемая должность), на каком основании была произведена экспертиза, кто присутствовал при производстве экспертизы, какие материалы эксперт использовал, какие исследования произвел, какие вопросы были поставлены эксперту и его мотивированные ответы».

Однако имеется давно сложившаяся общая теория и практика формирования заключения эксперта. И естественно, существует определенная специфика формулирования ключевых положений заключения для каждого вида выполняемых экспертиз.

При рассмотрении особенностей формирования заключения эксперта по результатам генотипоскопической экспертизы мы остановимся на наиболее общих принципах и понятиях, и преимущественно на тех из них, которые не всегда учитывают эксперты при написании заключения, в первую очередь уделяя внимание принятой структуре (форме) заключения, а не его содержательной части. В связи с этим представляется чрезвычайно важным для грамотного составления заключения знание и понимание экспертом тех критериев и подходов, по которым оно будет оцениваться следствием и судом, т.е. органами, использующими специальные познания эксперта для установления истины по делу.

Прежде чем будет оценено собственно заключение, может встать вопрос о его допустимости вообще. Он включает в себя проверку: соблюдения процессуальности порядка назначения и проведения экспертизы (в частности, соблюдения правил получения, хра-

нения объектов исследования); не подлежит ли эксперт, которому поручено производство экспертизы, отводу (компетентность и не заинтересованность в исходе дела); а также правильности оформления заключения в соответствии с требованиями ст. 191 УПК (наличие всех необходимых реквизитов).

После того как заключение признано допустимым, уясняется его достоверность, т.е. насколько оно соответствует действительности. Большинство специалистов сходится во мнении, что условия, обеспечивающие достоверность заключения эксперта, могут быть сведены в три основные группы.

1. Применение подлинно научных методов и приемов исследования, обеспечивающих научную обоснованность выводов.

Несоблюдение данного условия рождает сомнения в надежности примененной экспертом методики. Чаще всего они появляются в отношении нетрадиционных, недавно разработанных, не получивших еще всеобщего признания и широкого распространения методов. Сомнения в надежности примененной экспертом методики, как правило, не возникают, если она заранее разработана, официально апробирована и утверждена. Следует особо отметить ситуации, когда методики заимствованы из зарубежной литературы. Сам факт отсутствия их опубликования на родном языке проходящих по делу лиц может стать серьезным препятствием для прохождения заключения в суде, т.е. для признания заключения эксперта в качестве доказательства.

2. Проведение полного, всестороннего и объективного исследования вещественных доказательств и материалов дела, относящихся к предмету экспертизы.

Возможны случаи, когда эксперт не применил наиболее современные методы исследования, и только на этом основании его заключение может быть поставлено под сомнение. При производстве экспертизы специалист обязан применить весь комплекс доступных в его условиях современных методов исследования для решения поставленных вопросов. Однако полнота и всесторонность (количество и индивидуализирующий потенциал примененных методов) исследования в судебно-биологической экспертизе определяются зачастую возможностями материально-технической базы лаборатории.

3. Выполнение экспертизы в соответствии с нормами процессуального законодательства и не противоречащими им подзаконными актами.

Названные условия призваны гарантировать получение достоверного заключения.

Завершающим элементом оценки заключения эксперта является определение его доказательственного значения (силы).

Судебно-биологическая экспертиза вообще, и генотипоскопическая в частности, в подавляющем большинстве случаев решают идентификационные задачи. В любой области судебных экспертиз максимальную доказательственную ценность имеет заключение эксперта с выводом об индивидуальном тождестве (полное сходство, совпадение). Такие факты считаются практически неопровержимыми доказательствами при одном условии: идентифицируемый след не мог быть оставлен при обстоятельствах, не связанных с событием преступления.

Однако до настоящего времени в подавляющем большинстве случаев в результате проведенного судебно-биологического исследования формулируется вывод о групповой принадлежности объекта. По сравнению с установлением индивидуального тождества такой вывод является более слабой уликой.

Основные формы выводов

Генотипоскопическая экспертиза — это практически всегда идентификационная экспертиза, в том числе и при установлении биологического (кровного) родства (отцовства, материнства), несмотря на определенные особенности исследования и экспертной оценки полученных результатов.

Целью любого идентификационного исследования является установление тождества. Следует отметить, что, с нашей точки зрения, при достижении такой цели говорить об установлении тождества сравниваемых объектов, т.е. о наличии полного сходства (совпадения), в отношении биологических объектов по аналогии с другими видами экспертиз не совсем корректно.

Особенность объектов биологических экспертиз заключается в том, что они изначально имеют разные внешний вид, структуру, агрегатное состояние, физиологию (кровь, сперма, слюна, волосы, костные останки и т.п.). При этом они постоянно изменяются, поскольку остаются «живыми» даже вне организма-источника. Например, говорить о тождестве между кровью в следах с места происшествия, кровью проверяемого лица в образцах сравнения, если даже эта кровь излилась (взята) из одного и того же кровеносного сосуда, и, тем более, кровью, находящейся непосредственно в организме, — большая натяжка. Даже внутри одного организма кровь, поступающая в легкие (дыхательные органы), перенасыщена углекислотой, а

кровь, выходящая из легких, уже освобождена от нее и насыщена кислородом. Одна и та же кровь в указанных состояниях имеет гораздо больше различий, чем совпадений, не говоря уже, например, о ситуациях по установлению единого источника происхождения следов спермы (слюны, волос, костных останков и т.п.) с места происшествия и крови проверяемого лица.

Понятно, что в соответствии с теорией идентификация проводится по отображаемым устойчивым свойствам объекта. Такие свойства, как индивидуальность (неповторимость), неизменяемость на момент исследования и способность отображаться с сохранением свойств, присущи биологическим объектам. Однако материальной первоосновой индивидуальности любого биологического объекта является его генетический материал. Он присутствует практически в любой клетке организма. Все биологические свойства (признаки) организма детерминированы генетически.

Поэтому при выявлении комплекса совпадающих признаков, неповторимых в своей совокупности, считаем более правильным говорить именно о генетическом тождестве сравниваемых биологических объектов. Следовательно, выводы по результатам криминалистического ДНК-типирования могут быть даны в следующих основных формах:

– категорический вывод о генетическом тождестве (идентичности) сравниваемых биологических объектов, т.е. о происхождении биологического материала в следах и в сравнительном образце от конкретного индивидуума (человека);

– категорический вывод об отсутствии генетического тождества (неидентичности) сравниваемых биологических объектов при наличии у них признаков, которые априори не могут быть свойственны одному индивидууму;

– вероятный вывод о генетическом тождестве (идентичности) сравниваемых биологических объектов на основании комплекса совпадающих индивидуализирующих признаков, недостаточного для формулирования вывода в категоричной форме.

Категорический вывод означает полную уверенность эксперта в его правильности, и результаты исследования это полностью подтверждают. Вероятный вывод означает, что такой уверенности у него нет, но эксперт близок к достижению уровня индивидуальной идентификации. В связи с этим представляется необоснованным формулирование выводов в вероятной форме по результатам исследования одной-двух генетических систем, в том числе и системы

ABO, что чаще всего наблюдается в первичных экспертизах. Поскольку происходит явное преувеличение доказательственной значимости результатов исследования.

Вывод о групповой (родовой, половой) принадлежности объекта относится скорее к классификационным выводам, чем к идентификационным; он дается в случаях: когда по каким-то причинам не представляется возможным выявить необходимый для идентификационного исследования комплекс индивидуализирующих признаков; когда установление групповой (половой) принадлежности по той или иной генетической системе (в том числе и по системе ABO) входит в задачи исследования.

Общие требования к формулировкам выводов

Выводы, как известно, являются квалифицированными ответами специалиста на поставленные перед экспертизой вопросы, сформулированными в лаконичной форме. Ответы должны быть даны на все заданные вопросы, в противном случае обоснован отказ от их разрешения.

Общие требования к выводам эксперта сводятся к трем основным положениям.

Квалифицированность. Эксперт должен решать вопросы и формулировать выводы, которые требуют высокой квалификации в соответствующей области специальных познаний и не могут быть решены на основе житейского опыта.

Определенность. Выводы не должны быть неопределенными, носить общий характер, допускающий различное их толкование. В заключении эксперта вообще следует избегать формулировок об «одинаковости», «отличаемости», «аналогичности» объектов (признаков) без указания на конкретные показатели (критерии). Такая терминология более свойственна человеку, не обладающему специальными познаниями в данной области. Результаты сравнительного исследования объектов должны иметь экспертную оценку с точки зрения значимости этих данных для решения вопроса о тождестве объектов.

Доступность. Выводы не должны требовать для своей интерпретации специальных познаний: должны быть доступными для понимания следователем, судьей и другими заинтересованными лицами. Это не означает, что они не могут содержать специальных терминов и обозначений, необходимых, например, для наименования выявленных признаков. Но незнание научной сути использованных терминов не

должно быть препятствием для однозначного понимания общего смысла вывода лицами, не обладающими специальными познаниями.

Вывод по результатам генотипоскопического исследования, как правило, содержит три основные составляющие:

1) указание на конкретный выявленный комплекс совпадающих (либо несовпадающих) признаков, которые являются определяющими (ключевыми) для формирования той или иной степени убежденности эксперта по существу поставленного перед ним вопроса. Это наиболее общий для любых видов экспертиз элемент выводов;

2) результат (данные) вероятностно-статистической оценки идентификационной значимости комплекса выявленных признаков (если происхождение объекта от конкретного лица не исключается). Эта составляющая особенно важна в случаях формулирования выводов в вероятной форме. Доказательственная сила таких выводов не является величиной постоянной, она обратно пропорциональна степени распространенности выявленного комплекса групповых (генетических) признаков в популяции, т.е. находится в обратной зависимости от объема установленной экспертом группы. Чем уже определяемая группа, чем уникальнее выявляемый комплекс генетических признаков, тем реже он встречается в популяции и соответственно выше доказательственное значение вывода эксперта и его цена как улики;

3) экспертная криминалистическая оценка результатов в форме прямого ответа на поставленный вопрос. В заключениях судебных биологов до настоящего времени наиболее распространенной остается формулировка вывода в вероятной форме с использованием ключевой фразы «могла произойти от ...», т.е. допускается возможность происхождения исследуемого объекта (крови) от того или иного лица (индивидуума). На наш взгляд, справедливой считается точка зрения некоторых авторов [46] о недопустимости подмены вероятных выводов выводами о возможности. В выводах о возможности констатируется лишь возможность какого-либо события, явления (возможность возникновения носового кровотечения, без нанесения травмы). Возможность, будучи достоверно установленной, не меняется от того, реализовалась ли она практически или нет.

Известны случаи, когда результаты первичной судебно-биологической экспертизы, в которой экспертом допускалась (по результатам серологических исследований) возможность происхождения следа от конкретного лица, вступали в противоречие с результатами дополнительной (генотипоскопической) экспертизы, где в категоричной форме исключалась такая возможность. В качестве

альтернативной может быть предложена, например, следующая формулировка: «вероятно, кровь произошла от ...».

Кроме того, справедливо признаются недопустимыми формулировки типа «не исключается», поскольку они приравниваются к выводу о невозможности решения вопроса. По нашему мнению, такие формулировки могут быть использованы, когда экспертом (по объективным причинам) были изучены единичные локусы (чаще всего от одного до трех) и распространенность выявленных признаков, как правило, превышает соотношение 1 на 1000; формулирование вывода в вероятной форме может необоснованно завесить его доказательственное значение. В таких случаях использование формулировки типа «не исключается» при наличии первых двух составляющих вывода (см. выше) можно считать допустимым. То есть указание конкретных совпадающих признаков (аллелей) наряду с данными об их распространенности в популяции (вероятностно-статистической оценкой), представленными в доступной форме в виде конкретного значения (например, «один из гысячи обладает выявленными признаками»), позволяет следователю и суду сформировать собственное представление о доказательственной значимости выявленных признаков. Пусть даже на основе житейского опыта.

Формулировки выводов в наиболее распространенной до настоящего времени вероятной форме должны отражать различную степень убежденности эксперта, что является залогом правильной оценки доказательственной значимости выводов (весомости улики) следствием и судом. Адекватность формулировки такого вывода (т.е. убежденности эксперта, выраженной в словесной форме) – доказательственной значимости полученных результатов – категория очень тонкая, поскольку в значительной мере основывается на индивидуальности восприятия.

В генотипоскопии часто бывает ситуация, когда эксперт, проведя огромный объем исследований, изучил порядка десяти генетических систем, но практически во всех случаях установил наиболее часто встречающиеся в популяции признаки. В этой ситуации в формулировках выводов эксперт подсознательно может стремиться к необоснованному усилению доказательственной значимости полученных результатов.

Поэтому на протяжении многих десятилетий проблема формулирования выводов в вероятной форме остается в судебной экспертизе одной из самых трудноразрешимых. Однако с приходом в судебную биологию современного криминалистического ДНК-анализа и при достижении соответствующего уровня финансирования лабо-

раторий генотипоскопии проблема теряет свою остроту. Уже сегодня типирование комплекса индивидуализирующих генетических систем, включающего примерно 13 STR-локусов ядерной ДНК, позволяет в подавляющем большинстве случаев решать вопросы однозначно, поскольку выявленные при этом признаки неповторимы в своей совокупности.

Варианты формулирования основных положений заключения эксперта и комментариев к ним

Генотипоскопическая экспертиза либо сразу назначается следователем по не исследовавшимся ранее биологическим объектам (первичная), либо, как правило, она является дополнительной. В первом случае в рамках одного исследования эксперт устанавливает наличие того или иного биологического материала на представленных предметах, его видовую принадлежность, и таким образом все необходимые «предварительные» этапы исследования в его заключении присутствуют. Во втором случае довольно распространена ситуация, когда в постановлении о назначении генотипоскопической экспертизы имеется информация о том, что первичная судебно-биологическая экспертиза уже проведена, но копии заключений в материалах, представленных на данное исследование, отсутствуют. В этом случае необходимо запросить копии ранее проведенных биологических экспертиз, поскольку в своем исследовании эксперт не должен основываться на результатах, приведенных в обстоятельствах дела.

Кроме того, эксперт не должен и повторять эти этапы исследования, потому что тем самым он как бы ставит под сомнение результаты первичной экспертизы и проводит фактически повторную экспертизу, хотя для этого у него пока нет никаких оснований. В процессе повторения начальных этапов исследования пятно может быть практически полностью израсходовано. Следует подчеркнуть, что в данной ситуации имеется в виду один и тот же след (пятно) или группа однородных пятен, имеющих дефекты после предыдущего исследования. Если же эксперт обнаружил «новое» пятно, не описанное и не исследованное в ходе предыдущей экспертизы, а для подтверждения этого ему опять же необходима копия заключения, то, естественно, он проводит все необходимые начальные исследования.

Общим требованием к изложению каждого этапа исследования является необходимость четкого указания на то, какие объекты исследовались, какие методы, реактивы и оборудование применялись на данном этапе и какой получен результат. Название исследуемого объекта (с нумерацией, если их два и более) и сравнительных образцов обычно выносят в заголовок этапа. Методику исследования либо

описывают полностью (это обязательно, если она не опубликована в отечественной литературе), т.е. в объеме, позволяющем ее воспроизвести на практике; либо просто указывают ее название и приводят литературную ссылку. Причем во втором случае в заключении также необходимо описание применяемой методики в той ее части, которая может иметь несколько вариантов исполнения (конкретизация параметров, режимов, используемых устройств). Кроме того, необходимо указывать названия используемых наборов реактивов, приборов и оборудования, их моделей и фирм-производителей. В экспертных исследованиях могут быть использованы только серийно произведенные известными фирмами и прошедшие необходимые испытания реактивы и приборы.

Исследование ДНК крови¹ в следах (объекты №...) и образцов крови гр. И. и Б.

Выделение ДНК из объектов и образцов крови проводили:

– фенольным методом. Фенольный метод имеет несколько вариантов исполнения, поэтому далее следует описать методику, примененную в конкретном исследовании;

– с помощью ионообменной смолы *Chelex 100* в соответствии с методикой, изложенной в учебном пособии «Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа» (М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001). Для дополнительной очистки и концентрирования препаратов ДНК использовали устройство *Centricon 100* производства фирмы *Amicon*, США.

Количественную и качественную оценку выделенной ДНК проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с последующей окраской геля бромидом этидия. В качестве стандарта длин фрагментов ДНК использовали *pGEM DNA Marker*, производства фирмы *Promega Corporation*, США.

Установлено, что из крови в следах (объект №...) выделена ДНК в количестве, недостаточном для визуализации. Из образцов крови гр. И. выделена высокомолекулярная ДНК с величиной фрагментов более 2 тыс. п.н.

Типирование ДНК осуществляли методом ПЦР на приборе *GeneAmp PCR system 9600* фирмы *Perkin-Elmer*.

Одним из принципиальных положений заключения являются указание на применение в исследовании контрольных проб, приведение конкретного генотипа контрольной ДНК, а в последую-

¹ Наличие и видовая принадлежность установлены.

щем и результатов ее типирования. Отсутствие данной информации ставит под сомнение специфичность проведенных реакций.

Для оценки специфичности реакции амплификации использовали положительный (проба с ДНК K562 из набора реагентов с известными генетическими признаками: исследуемый локус ... генотип ..., ...) и отрицательный (проба без ДНК) контроля.

Установление половой принадлежности ... (объект №...)

Приведенный ниже вариант описания установления половой принадлежности может быть использован в заключениях экспертов, в лабораториях которых ввиду отсутствия необходимого оборудования для типирования STR-локусов исследуются только VNTR-локусы. В остальных случаях типирование локуса Amelogenin может быть включено в следующий раздел.

Половую принадлежность ... определяли с помощью набора реагентов (производства фирмы ...) для амплификации сегмента половых гетероформ амелогенинового гена в соответствии с прилагаемой инструкцией. Надежность разделения дублета XY контролировали путем введения в реакцию ДНК заведомо мужской и женской крови.

Разделение амплифицированных фрагментов выполняли методом горизонтального электрофореза в ...% агарозном геле с последующим окрашиванием геля бромистым этидием. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли в УФ-излучении с помощью трансиллюминатора

В результате электрофоретического разделения продуктов ПЦР ДНК крови (объекты №...) в изучаемой области геля выявлены:

– по два аллеля, размеры которых соответствуют размерам X- и Y-специфичных фрагментов контрольной ДНК мужской крови. В контрольных продуктах ПЦР ДНК женской крови выявлен единственный X-специфичный фрагмент;

– единственный аллель, соответствующий по размеру X-специфичному фрагменту контрольной ДНК женской крови. В контрольных продуктах ПЦР ДНК мужской крови выявлен также Y-специфичный фрагмент.

Следовательно, кровь в следах (объекты №...) произошла от человека мужского (женского) генетического пола. Следует обратить внимание, что таким образом установлен именно генетический пол, т.е. выявлены Y- и X-хромосомы, характерные для мужчин, либо только X-хромосомы, характерные для женщин. При этом возможны случаи, когда вследствие врожденных хромосомных заболеваний (полисомии по половым хромосомам: ХХУ,

XXXУ и т.п.) лица мужского генетического пола по своей преобладающей физиологии и юридически (по паспорту) могут являться женщинами. (По некоторым данным, такие индивидуумы часто встречаются среди спортсменов.)

Исследование локусов ...

Для амплификации последовательностей локусов ... использовали набор реагентов фирмы ... в соответствии с прилагаемой инструкцией. Разделение амплифицированных фрагментов выполняли методом вертикального электрофореза в денатурирующем (нативном) ...% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием продуктов амплификации нитратом серебра.

Еще одним принципиальным моментом заключения является необходимость указания на то, какие стандарты величины молекулярных масс амплифицированных фрагментов ДНК использовали для установления выявляемых генотипов.

Величину амплифицированных фрагментов определяли с помощью соответствующих аллельных лэддеров из набора реактивов.

Результаты, для наглядности и удобства их интерпретации, приводят в виде таблиц. Если результаты оформлены в виде таблицы (фототаблицы, электрофореграммы), то в тексте заключения на нее должна быть ссылка. Таблицы могут быть приведены по ходу изложения или, как и фототаблицы, представлены в приложении к заключению.

Результаты исследования представлены в таблице №... и на фототаблицах №....

Таблица №..

Результаты исследования локусов ...

Объект исследования	Выявлены аллели локуса			
	A	B	C	D
Объект №...	18, 24	6, 9.3		.
Объект №...	18, 22			
Образец крови гр. И.	...			
Образец крови гр-ки Б. (жертва)	...			
Контроль положительный	16, 22			
Контроль отрицательный	Амплифицированные фрагменты не выявлены			

Примечание. Аллели обозначены цифрами и буквами в соответствии с принятыми международными номенклатурами.

По данным, приведенным в таблице, необходим краткий анализ, в результате которого формулируется предварительный вывод. Из-

ложение результатов анализа начинают, ставя на первое место информацию о признаках, выявленных в объектах, а не в образцах; затем (или одновременно) проводят сравнительный анализ.

Предварительный (окончательный) вывод должен доказываться на основании выявленных признаков, а не методом «от противного», например: «В ДНК спермы по локусу ... не выявлен аллель ..., свойственный генотипу гр. И. Происхождение спермы от гр. И. исключается». Во-первых, если следовать логике описания любого исследования, в начале излагается то, что установлено (выявлено). Во-вторых, факт невыявления (в приведенной выше редакции) можно толковать и как отсутствие признака у данного лица (что, собственно, и имеет в виду эксперт), и как тот факт, что эксперт в силу различных причин не смог его выявить. Отступление от данной рекомендации возможно при обсуждении результатов исследования смешанных следов, поскольку в таких случаях «исключение» проверяемого лица основывается на отсутствии (невыявлении) свойственных его генотипу аллелей среди выявленных в следах аллельных сочетаний; т.е. рассуждения эксперта будут строиться по принципу «от противного».

В результате проведенного исследования (см. таблицу №...) установлено следующее:

в препарате ДНК (объект № 1) по всем исследованным локусам выявлены аллели, присущие генотипу гр. И.;

в препарате ДНК (объект № 2) по локусу ... выявлен(ы) аллель(и) (24), не свойственный(е) генотипу гр. И., в связи с чем дальнейшее исследование объекта № 2 не проводили;

в препарате ДНК (объект № 3) по локусу(ам) ... выявлены аллели (18, 24, 28), присущие смеси ДНК (биологического материала в следах) гр. И. и Б.;

в препарате ДНК (объект № 4) по всем исследованным локусам выявлены аллели, присущие генотипу гр-ки Б.;

в препарате ДНК (объект № 5) по всем исследованным локусам амплифицированных фрагментов не выявлено.

Результаты исследования, явно выпадающие из общего ряда (например, выявление трех и более аллелей, невыявление амплифицированных фрагментов вообще или по отдельным объектам и локусам) должны быть объяснены в заключении.

В препарате ДНК (объект № 6) по локусу(ам) ... выявлен трехаллельный профиль (18, 24, 25), что свидетельствует о смешении ДНК (генетического материала в следах) двух или более лиц; не исключается смешение биологического материала потерпевшей (гр-ки Б.) и спермы одного или нескольких мужчин (по половым преступлениям). При этом среди выявленных в препаратах ДНК (объект №...) аллельных сочетаний, как минимум по двум

из исследованных локусов не обнаружены аллельные пары, свойственные генотипам подозреваемых.

Интерпретация результатов исследования смешанных следов требует особенно высокой квалификации эксперта. В таких случаях следует исходить из того, что в следах может присутствовать биологический материал (клетки организма) более чем двух индивидуумов (независимо от того, сколько аллелей выявлено по исследуемому локусу ДНК и сколько лиц подозревается в причастности к данному преступлению). Часто такие ситуации возникают по делам о половых преступлениях. Следы на тампонах (с содержимым влагалища, прямой кишки, ротовой полости и т.п.), содержащие сперму, и получаемые из них препараты ДНК практически всегда следует считать смешанными. Исключение может составить редкий случай, когда препарат ДНК получен по схеме дифференциального лизиса и при этом количество изученных локусов (естественно, имеется в виду, что жертва «исключается»), а по всем локусам не выявлено трех или более аллелей) таково, что рассчитанная величина вероятности случайного совпадения позволяет сформулировать категорический вывод о происхождении спермы от конкретного подозреваемого, т.е. достичь уровня индивидуальной идентификации.

Таким образом, кровь в следах (объекты № 1, 3) могла произойти от гр. И.; происхождение крови (объект № 2) от гр. И. исключается; кровь в следах (объект № 4) могла произойти от гр-ки Б. и не произошла от гр. И.; происхождение спермы (объект № 6) от гр. И., гр. ... исключается.

Установить генетические признаки крови (объект № 5) не представилось возможным, видимо, в связи с деградацией ДНК объекта либо выраженным ингибирующим влиянием компонентов предмета-носителя (красителей) на реакцию амплификации.

Предварительные выводы о подтверждении (или исключении) в отношении проверяемого лица являются ключевыми положениями заключения. Поэтому им должно предшествовать изложение (в доступной для лиц, не обладающих специальными познаниями, форме) принципа (критерия), на основе которого эксперт анализирует полученные данные и приходит к тем или иным выводам.

Отцовство (материнство) проверяемого лица в отношении конкретного ребенка не исключается лишь в том случае, если в ДНК ребенка по всем исследованным локусам выявлены аллели, присутствующие в генотипе предполагаемого отца (матери).

Как видно из табл. №..., по всем изученным локусам в ДНК крови Иванова Н. выявлены аллели, присутствующие в генотипе гр. Иванова А.

Таким образом, отцовство Иванова А. в отношении Иванова Н. не исключается.

Происхождение ребенка от конкретных супругов не исключается лишь в том случае, если аллельные пары, выявленные в ДНК ребенка, по всем исследованным локусам образованы аллелями, каждый из которых (аллель) мог быть унаследован только от одного либо, в случае гомозиготности, от обоих из предполагаемых родителей; т.е. аллельная пара, выявленная у ребенка, образована и аллелем предполагаемого отца, и аллелем предполагаемой матери.

Как видно из табл. №..., по всем изученным локусам в ДНК костных останков неизвестного выявлены аллели, которые могли быть унаследованы от родительской пары С. Таким образом, рождение неизвестного от данной супружеской пары не исключается.

Вероятностно-статистическая оценка идентификационной значимости выявленных генетических признаков

Вероятностная оценка идентификационной значимости генетических признаков, выявленных в исследованных объектах, производилась на основе статистических данных о частотах встречаемости (р) аллелей у лиц европейского происхождения (если отсутствуют опубликованные отечественные данные). В своих расчетах руководствовались учебным пособием «Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа» (М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001). Формулы расчета и полученные значения представлены в табл. №...

Таблица №...

Расчет вероятности случайного совпадения генетических признаков, выявленных в крови (объект №...) и образце крови гр. И.

Локус	Частота встречаемости выявленных аллелей (р)	Формула расчета	Вероятность случайного совпадения (Р)
A	$p_{18} = 0,31$ $p_{24} = \dots$	$P = 2(p_{18} \times p_{24})$...
...

По совокупности всех локусов: $P_{\text{общ}} = P_A \times P_B \times \dots = \dots$

В расчеты $P_{\text{общ}}$ не рекомендуется включать частоту встречаемости полов (0,5), поскольку это практически не меняет величину вероятности случайного совпадения, но значительно затрудняет формулирование и правильное понимание вывода.

Это означает, что в среднем 1 человек из ... обладает выявленным сочетанием генетических признаков.

Заключительные выводы могут быть представлены в следующих основных вариантах.

Выводы

1. Варианты выводов для случаев, когда генотипоскопия назначена как дополнительная экспертиза, т.е. наличие и видовая принадлежность объекта уже установлены.

В ДНК крови (объекты №...) по всем исследованным локусам (...) выявлены аллели, свойственные генотипу гр. И. Кровь (объекты №...) на ... произошла от гр. И. Данный вариант вывода предназначен для случаев, когда рассчитанное и приведенное в заключении значение величины вероятности случайного совпадения позволяет сформулировать вывод о происхождении крови от конкретного подозреваемого в категоричной форме, т.е. достигнут уровень индивидуальной идентификации.

В ДНК спермы (объекты №...) и крови гр. И по всем исследованным локусам (...) выявлены идентичные аллели. Сперма (объекты №...) на ..., вероятно, произошла от гр. И. Величина вероятности случайного совпадения составляет 1×10^{-n} , т.е. в среднем 1 человек из ... обладает установленными генетическими признаками.

Следы вещества ... цвета (объект №...) на тампоне с содержимым влагалища гр-ки Ж. содержат генетический материал (ДНК) двух или более лиц. В препаратах ДНК (объект №...), полученных из данных следов, по всем исследованным локусам (...) выявлены аллельные сочетания, свойственные генотипам и гр. И., и потерпевшей гр-ки Ж. Происхождение спермы (см. закл. №... от ...) в следах на тампоне с содержимым влагалища гр-ки Ж. от гр. И не исключается.

Если эксперт рассчитывает значение вероятности случайного совпадения по смешанным следам (в соответствии с методиками, приведенными в данном пособии), то вывод должен содержать полученное значение вероятности. Расчет вероятности целесообразен в заключениях по исследованиям, выполненным с использованием приема дифференциального лизиса клеток. В результате чего может быть получен профиль ДНК, свойственный одному человеку (несмешанный профиль), в том числе и подозреваемому. В таком случае в выводе необходима оговорка следующего характера:

значение вероятности случайного совпадения генетических признаков составляет ... при условии, что сперма оставлена одним мужчиной.

Следы вещества ... цвета (объект №...) на тампоне с содержащим влагалища гр-ки Ж. содержат генетический материал (ДНК) двух или более лиц. В препаратах ДНК (объект №...), полученной из данных следов, по всем исследованным локусам (...) выявлены аллельные сочетания, свойственные генотипу потерпевшей гр-ки Ж. По локусам ... ДНК (объект №...) не выявлены аллельные сочетания, свойственные генотипу гр. И. Происхождение спермы (см. закл. №... от ...) в следах на тампоне с содержащим влагалища гр-ки Ж. от гр. И. исключается. В случаях «исключения» конкретного подозреваемого нельзя ограничиваться только этим утверждением, нужно указывать характер выявленных различий (совпадений), другие данные («смешанность» следов), которые могут быть необходимы для построения и проверки других следственных версий.

Установить генетические признаки крови (объекты №...) не представилось возможным, вероятно, в связи:

с деградацией ДНК крови в следах;
возможно и другое объяснение:

с выраженным ингибирующим влиянием компонентов (красителей) предмета-носителя, посторонних примесей на реакцию амплификации.

2. Варианты выводов для случаев, когда в рамках одного исследования устанавливались наличие, видовая и половая принадлежность следа, т.е. генотипоскопическая экспертиза проводилась по первичным материалам.

На ... обнаружена кровь (объекты №...), генетические признаки которой по всем исследованным локусам (...) ДНК идентичны генетическим признакам крови гр. И. Кровь (объекты №...) на ..., вероятно, произошла от гр. И. Величина вероятности случайного совпадения составляет 1×10^{-n} , т.е. в среднем 1 человек из ... обладает выявленным сочетанием генетических признаков.

На ... обнаружена кровь (объекты №...), в ДНК которой по всем исследованным локусам (...) выявлены аллели, свойственные генотипу гр. И. Кровь (объекты №...) на ..., вероятно, произошла от гр. И. Величина вероятности случайного совпадения составляет 1×10^{-n} , т.е. в среднем 1 человек из ... обладает установленными генетическими признаками.

На ... обнаружена кровь (объекты №...) мужчины, в ДНК которой по локусу ... выявлен(ы) аллель(и) ... (признаки), не свойственный(е) генотипу гр. И. Происхождение крови (объекты №...) от гр. И. исключается.

3. Варианты выводов в случаях установления отцовства (материнства).

Иванов А., вероятно, является биологическим отцом Иванова Н. Величина вероятности случайного совпадения генетических признаков, выявленных в ДНК образцов крови ребенка и предполагаемого отца, составляет Это означает, что в среднем один мужчина из ... тысяч теоретически может быть биологическим отцом ребенка с выявленным сочетанием генетических признаков.

В ДНК крови Иванова Н по локусам ... выявлены аллели, не свойственные генотипу Иванова А.; Иванов Н. не является биологическим сыном Иванова А.

Неизвестный, останки которого представлены на исследование, вероятно, является биологическим сыном супругов Сидоровых. Величина вероятности случайного совпадения генетических признаков, выявленных в ДНК костных останков неизвестного, и образцов крови предполагаемых биологических родителей составляет Это означает, что в среднем одна родительская пара из ... теоретически может быть биологическими родителями ребенка с выявленным сочетанием генетических признаков.

В ДНК костных останков неизвестного по локусам ... выявлены аллельные сочетания, которые не могут быть образованы в результате наследования от родительской пары Сидоровых. Неизвестный(ая), костные останки которого(ой) представлены на исследование, не является биологическим сыном (дочерью) супругов Сидоровых.

Глава 5

ВОПРОСЫ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДАННЫХ ДНК И ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ И РАСКРЫТИИ ПРЕСТУПЛЕНИЙ

Проблема раскрытия тяжких преступлений против личности у нас в стране одна из самых острых. В решении коллегии МВД России от 15.01.99 г. № 1 км записано: «Особую тревогу вызывает состояние работы по раскрытию наиболее тяжких преступных посягательств, удельный вес которых в общей структуре нераскрытых преступлений достигает 90 %. В их числе 14,5 тыс. умышленных убийств, случаев причинения тяжкого вреда здоровью...» [47]. Именно эти виды преступлений практически невозможно эффективно расследовать и раскрывать без использования современных возможностей биологических экспертиз. Так, применение высокоэффективных методов криминалистического ДНК-анализа позволяет уже сегодня решать поставленные перед экспертизой идентификационные задачи на уровне индивидуальной идентификации.

Однако традиционно эксперт может сделать вывод о возможности происхождения поступившего на исследование биологического объекта (вещественного доказательства) от конкретного лица лишь в том случае, если на экспертизу представлен полученный у проверяемого сравнительный образец, т.е. у следствия должен быть конкретный подозреваемый, который в том или ином качестве уже проходит по материалам данного уголовного дела. При наличии соответствующей базы данных ДНК поиск лица, являющегося возможным источником происхождения изъятого биологического объекта, может осуществляться и при отсутствии сравнительных образцов — сопоставлением генетических признаков исследуемого объекта и хранящихся в базе данных ДНК крови подучетных лиц.

База данных может использоваться и иным образом, если в нее вносить информацию о генетических признаках объектов, изъятых с

Прописи растворов, используемых на различных этапах ДНК-анализа

Растворы, используемые при выделении ДНК

1. 5М раствор NaCl (1 л).

Растворяют 292,2 г NaCl в 800 мл дистиллированной воды и доводят объем раствора до 1 л. Разливают на порции по 100 мл. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

2. 0,5М раствор ЭДТА, рН 8,0 (1 л).

Медленно вносят 186,1 г $\text{Na}_2\text{ЭДТА}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл дистиллированной воды. Перемешивают, используя магнитную мешалку. Доводят рН раствора до 8,0 с помощью NaOH (приблизительно 20 г), затем доводят объем раствора до 1 л. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

Примечание. $\text{Na}_2\text{ЭДТА}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ не растворяется при рН раствора ниже 8,0.

3. 1М раствор трис-HCl, рН 7,5 (1 л).

Внимание! Соляная кислота (HCl) вызывает ожоги. Работать в химически устойчивых перчатках, халате и защитных очках. Использовать вытяжной шкаф.

Растворяют 121,1 г трисгидроксиметиламинометана в 800 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 7,5 с помощью концентрированной соляной кислоты (приблизительно 65 мл). Доводят объем раствора до 1 л. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

4. 1М раствор трис-HCl, рН 8,0 (1 л).

Растворяют 121,1 г трисгидроксиметиламинометана в 800 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 8,0 с помощью концентрированной соляной кислоты (приблизительно 45 мл). Доводят объем раствора до 1 л. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

5) 20% раствор додецилсульфата натрия (SDS) (1 л).

Внимание! Додецилсульфат натрия – раздражающее, чрезвычайно летучее вещество. Работать в вытяжном шкафу, в перчатках и защитной маске.

Медленно вносят 200 г SDS в 800 мл дистиллированной воды. Для ускорения растворения нагревают. Доводят объем раствора до 1 л. Хранят при комнатной температуре.

6. Лизирующий раствор, pH 7,5 (100 мл): 10mM трис-HCl; 10mM ЭДТА; 50mM NaCl; 2% SDS.

Смешивают 1 мл 1M трис-HCl (pH 7,5), 2 мл 0,5M ЭДТА, 1 мл 5M NaCl, 10 мл 20% SDS, добавляют 86 мл деионизованной воды. Хранят при комнатной температуре.

7. 1M раствор ацетата натрия, pH 5,2 (100 мл).

Растворяют 13,6 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 80 мл дистиллированной воды, доводят pH до 5,2, добавляя ледяную уксусную кислоту (примерно 2 мл), доводят объем до 100 мл. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

8. 1M раствор дитиотрейтола, pH 5,2 (5 мл): 1M DTT; 10mM CH_3COONa .

Растворяют 0,77 г DTT в 5 мл деионизованной воды, добавляют 50 мкл 1M ацетата натрия, pH 5,2. Разделяют на аликвоты по 500 мкл и хранят при температуре -20°C .

9. 10 мг/мл раствор протеиназы К (10 мл).

Растворяют 100 мг протеиназы К в 10 мл деионизованной воды. Разделяют на аликвоты по 500 мкл и хранят при температуре -20°C .

10. 0,1% раствор азура II (100 мл).

Растворяют 100 мг азура II в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в темной посуде в темном месте при комнатной температуре.

11. 0,1% раствор эозина (100 мл).

Растворяют 100 мг эозина в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в темной посуде в темном месте при комнатной температуре.

12. 10% раствор лаурета 10 (10 мл).

Растворяют 1 г лаурета 10 (полиоксиэтилен 10 лауриловый эфир) в 10 мл горячей стерильной деионизованной воды. Хранят при комнатной температуре.

13. Быстрый лизирующий раствор, рН 8,0 (10 мл): 10mM трис-НCl; 0,9% лаурет 10; 50 мкг/мл протеиназы К; 35mM DTT.

К 8,6 мл стерильной деионизованной воды добавляют: 100 мкл 1M трис-НCl, рН 8,0; 0,9 мл 10% раствора лаурета 10; 50 мкл раствора, содержащего 10 мг/мл протеиназы К; 0,35 мл 1M DTT, рН 5,2. Тщательно перемешивают. Разделяют на аликвоты по 100 мкл и хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

14. ТЕ-буфер, рН 8,0 (1 л): 10mM трис-НCl, рН 8,0; 1mM ЭДТА.

Смешивают: 10 мл 1M трис-НCl, рН 8,0; 0,2 мл 0,5M ЭДТА; 990 мл дистиллированной воды. Раствор автоклавируют и хранят при комнатной температуре.

15. Фенол, насыщенный буфером.

В н и м а н и е! Фенол вызывает тяжелые ожоги, хлороформ является канцерогеном. Работать в химически устойчивых перчатках и защитных очках. Использовать вытяжной шкаф. При попадании фенола на кожу, его нужно смыть большим объемом воды. Не использовать этанол.

Кристаллический фенол можно использовать без редистилляции, если его кристаллы не окрашены или белого цвета. Если кристаллы имеют розовый или желтый цвет, то фенол необходимо очистить редистилляцией при температуре $160\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого фенол хранят при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Насыщают фенол следующим образом:

– расплавляют аликвоту фенола при температуре $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ и добавляют к ней 8-гидрооксихинолин до конечной концентрации 0,1 % (1 г на 1 л фенола). Это соединение является антиоксидантом; придает желтый цвет фенольной фракции;

– полученное соединение помещают в делительную воронку, содержащую равный объем 1M раствора трис-НCl, рН 8,0; тщательно перемешивают и оставляют до разделения фаз. Верхнюю, неокрашенную водную фазу удаляют;

– повторяют предыдущий шаг еще два раза или до тех пор, пока рН водной фазы не будет между 7,0 и 8,0;

– однократно насыщают фенольную фракцию 0,1M раствором трис-НCl, рН 8,0. Удаляют водную фазу.

Насыщенный раствор фенола хранят в темной посуде, защищая от света, при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ под слоем 0,1M раствора трис-НCl, рН 8,0, в течение 3 мес.

16. Смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1).

Смешивают: 25 частей фенола, насыщенного буфером; 24 части хлороформа; 1 часть изоамилового спирта. Смесь хранят в темной емкости, защищая от света, при температуре 4 °С под слоем 0,1М раствора трис-НСl, рН 8,0, в течение 2 мес.

17. Водонасыщенный *n*-бутанол (150 мл).

К 100 мл *n*-бутанола добавляют 100 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. После разделения двух фаз нижнюю, водную фазу удаляют. Хранят *n*-бутанол при комнатной температуре.

18. Водонасыщенный диэтиловый эфир (100 мл).

Внимание! Диэтиловый эфир – летучее и легковоспламеняющееся вещество. Работать во взрывобезопасном шкафу.

К 100 мл диэтилового эфира добавляют 100 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. После разделения двух фаз нижнюю, водную фазу удаляют. Хранят диэтиловый эфир при комнатной температуре.

19. 20%, 5% Chelex 100 (100 мл).

Примечание. Для выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100 рекомендуется использовать коммерческие растворы Chelex 100, оптимизированные специально для выделения ДНК (например, ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System, Cat. # A7710, производства фирмы Promega).

Помещают 20 г (5 г) натриевой формы Chelex 100 в 80 мл воды, рН раствора должна быть между 9,0–11,0, в противном случае раствор непригоден для выделения ДНК. Доводят объем до 100 мл. Chelex 100 в воде не растворяется.

Раствор для амплификации

4 мг/мл раствор BSA fraction V (25 мл).

Примечание. Рекомендуется использовать реактив производства фирмы Sigma, США (Sigma Cat. # A2153).

Растворяют 100 мг BSA fraction V в 25 мл стерильной деионизованной воды. Разделяют на аликвоты по 500 мкл и хранят при температуре 4 °С.

Растворы для электрофореза

1. 10× ТВЕ-буфер (1 л): 0,89М трис-борат; 2,5мМ ЭДТА.

Растворяют 108 г трисгидроксиметиламинометана, 55 г борной кислоты и 9,3 г $\text{Na}_2\text{ЭДТА}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде. Доводят объем до 1 л. Хранят при комнатной температуре.

2. 1% и 3% агароза (100 мл).

Медленно вносят 1 г (3 г) агарозы в 100 мл 1× ТВЕ-буфера. Нагревают раствор в СВЧ-печи до полного растворения агарозы. Раствор не должен подвергаться кипению. Хранят при температуре 4 °С.

3. 6× буфер для нанесения проб ДНК на агарозные гели (10 мл).

Растворяют 20 мг бромфенолового синего в 4 мл деионизованной воды; добавляют: 200 мкл 1М трис- HCl , pH 8,0; 50 мкл 0,5М ЭДТА; 5 мл глицерина. Разделяют на алиquotы по 1 мл и хранят при температуре 4 °С.

4. 6× буфер для нанесения проб ДНК на нативный полиакриламидный гель (10 мл).

Растворяют 20 мг бромфенолового синего и 20 мг ксилен цианола в 4 мл деионизованной воды; добавляют: 200 мкл 1М трис- HCl , pH 8,0; 50 мкл 0,5М ЭДТА; 5 мл глицерина. Разделяют на алиquotы по 1 мл и хранят при температуре 4 °С.

5. 10 мг/мл раствор бромида этидия (10 мл).

Внимание! Бромид этидия является мутагеном. Избегать контакта с кожей. Работать в перчатках, халате и защитных очках.

Растворяют 100 мг бромида этидия в 10 мл воды. Бромид этидия растворяется несколько часов. Раствор хранят в темной емкости при температуре 4 °С.

6. 30% раствор акриламида-бисакриламида (29:1, 100 мл).

Внимание! Акриламид и бисакриламид – токсичные вещества. Избегать контакта с кожей. Работать в перчатках, халате и защитных очках.

Растворяют 29 г акриламида и 1 г бисакриламида в деионизованной воде, доводят объем до 100 мл. Фильтруют раствор и хранят при температуре 4 °С один месяц.

7. 40% раствор акриламида-бисакриламида (19:1, 100 мл).

Растворяют 38 г акриламида и 2 г бисакриламида в деионизованной воде, доводят объем до 100 мл. Фильтруют раствор и хранят при температуре 4 °С один месяц.

8. 10% этанол (1 л).

Смешивают 104 мл 96% этанола с 896 мл воды. Хранят при комнатной температуре.

9. 1% азотная кислота (1 л).

Добавляют 15 мл концентрированной (65%) азотной кислоты к 985 мл воды. Хранят при комнатной температуре.

10. 0,012M раствор нитрата серебра (1 л).

Растворяют 2 г нитрата серебра в воде, доводят объем до 1 л. Хранят в темной посуде, защищая от света, при комнатной температуре.

11. Раствор карбоната натрия (1 л): 0,28M Na₂CO₃; 0,037% формальдегид.

Растворяют 29,7 г безводного Na₂CO₃ в дистиллированной воде, доводят объем до 1 л. Добавляют 1 мл 37% раствора формальдегида. Раствор не хранится. Готовить непосредственно перед использованием.

12. 10% раствор уксусной кислоты (1 л).

Добавляют 100 мл уксусной кислоты к 900 мл воды. Хранят при комнатной температуре.

Растворы для дот-блот гибридизации

1. 20× SSPE-буфер, pH 7,4 (1 л): 3,6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄·H₂O; 20mM ЭДТА.

Растворяют 7,4 г Na₂ЭДТА·2H₂O в 800 мл дистиллированной воды. Доводят pH раствора до 6,0 (±0,2) с помощью 10N NaOH. Добавляют 210 г NaCl и 27,6 г NaH₂PO₄·H₂O. Доводят pH раствора до 7,4 (±0,2) с помощью 10N NaOH. Доводят объем раствора до 1 л. Хранят при комнатной температуре.

2. Раствор для гибридизации (1 л): 5× SSPE; 0,5% SDS.

Добавляют 250 мл 20× SSPE-буфера и 25 мл 20% раствора додецилсульфата натрия (SDS) к 725 мл дистиллированной воды. Хранят при комнатной температуре.

Примечание. При комнатной температуре в растворе образуется осадок. Перед использованием раствор прогревают до температуры 37–55 °С и хорошо перемешивают.

3. Раствор для промывания (2 л): 2,5× SSPE; 0,1% SDS.

Добавляют 250 мл 20× SSPE-буфера и 10 мл 20% раствора додецилсульфата натрия (SDS) к 1740 мл дистиллированной воды. Хранят при комнатной температуре.

Примечание. При комнатной температуре в растворе образуется осадок. Перед использованием раствор прогревают до температуры 37–55 °С и хорошо перемешивают.

4. Раствор цитратного буфера, pH 5,0 (1 л): 0,1М цитрат натрия.

Растворяют 18,4 г цитрата натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 800 мл дистиллированной воды. Доводят pH раствора до 5,0 ($\pm 0,2$), добавляя лимонную кислоту $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (примерно 6 г). Доводят объем раствора до 1 л. Хранят при комнатной температуре.

5. 3% раствор перекиси водорода (1 мл).

Смешивают 100 мкл 30% раствора перекиси водорода с 900 мкл деионизованной воды. Хранят при температуре 4 °С, защищая от света не более 1 мес.

6. 200mM раствор ЭДТА (10 мл).

Смешивают 4 мл 0,5М раствора ЭДТА и 6 мл деионизованной воды. Разделяют на аликвоты по 300 мкл и хранят при температуре 4 °С.

Справочные данные по электрофорезу ДНК

Скорость миграции маркерных красителей
в нативных полиакриламидных гелях

Содержание полиакриламида, %*	Диапазон длин фрагментов ДНК, п.о.**	Бромфеноловый синий***	Ксилен цианол FF***
3,5	1000–2000	100	460
5,0	80–500	65	260
8,0	60–400	45	160
12,0	40–200	20	70
15,0	25–150	15	60
20,0	6–100	12	45

* Соотношение акриламида и бисакриламида 29:1.

** Диапазон длин фрагментов ДНК показывает величину фрагментов, которые наиболее эффективно разделяются в гелях с указанным содержанием полиакриламида.

*** Число обозначает ориентировочный размер фрагментов ДНК (в парах оснований), с которыми мигрирует маркерный краситель.

Скорость миграции маркерных красителей в денатурирующих полиакриламидных гелях

Содержание полиакриламида, %	Бромфеноловый синий*	Ксилен цианол FF*
5	35	130
6	26	106
8	19	76
10	12	55
20	8	28

* Число обозначает ориентировочный размер фрагментов ДНК (в нуклеотидах), с которыми мигрирует маркерный краситель.

Разделение фрагментов ДНК в агарозных гелях

Содержание агарозы, %	Диапазон длин фрагментов ДНК, тыс. п.о.*
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

* Диапазон длин фрагментов ДНК показывает величину фрагментов, которые наиболее эффективно разделяются в гелях с указанным содержанием агарозы.