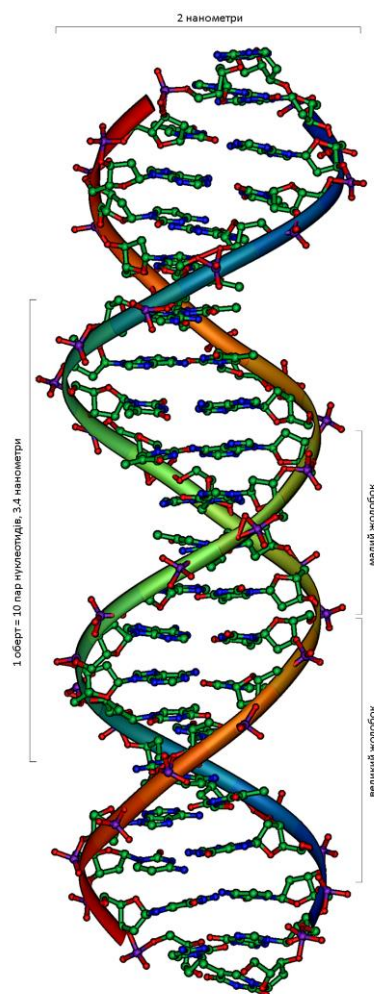


Міністерство охорони здоров'я України

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені О. О. БОГОМОЛЬЦЯ
НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ імені П. Л. ШУПИКА
АСОЦІАЦІЯ СУДОВИХ МЕДИКІВ УКРАЇНИ

МИХАЙЛИЧЕНКО Б.В., МІШАЛОВ В.Д., БІЛЯКОВ А.М., ВОЙЧЕНКО В.В.

СУДОВО-МЕДИЧНА ЕКСПЕРТИЗА
ОБ'ЄКТІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ
ЗА STR ЛОКУСАМИ ЯДЕРНОЇ ДНК
З ВИКОРИСТАННЯМ
ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ



Київ 2013

УДК 340.6:616-008.8
ББК 58.1

**Автори: Б.В. Михайличенко, В.Д. Мішалов,
А.М. Біляков, В.В. Войченко**

Рекомендовано Вченою радою Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 3 від 28 грудня 2012 р.).

Рецензенти:

1.Бачинский В.Т. - доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри судової медицини та медичного правознавства Буковинського державного медичного університету, начальник Чернівецького обласного бюро судово-медичної експертизи, заслужений лікар України;

2.Оболенська М.Ю. - завідувач лабораторії системної біології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України доктор біологічних наук, професор.

Судово-медична експертиза об'єктів біологічного походження за STR локусами ядерної ДНК з використанням полімеразно-ланцюгової реакції: Навчально - методичний посібник /Б.В. Михайличенко, В.Д. Мішалов, А.М. Біляков, В.В. Войченко. – Київ, 2012. – 83 С.

У навчально-методичному посібнику представлені матеріали стосовно використання ДНК для вирішення питань судово-медичної експертизи різних об'єктів. Наведено загальні відомості про ДНК, особливості полімеразно-ланцюгової реакції та методичні рекомендації щодо її виконання. Висвітлено дані про виявлення слідів біологічного походження від людини, правила вилучення зразків для судово-медичного дослідження, яке передбачає подальший ДНК-аналіз. Значна увага приділена регламентації ДНК-досліджень та добору діагностичної панелі. Висвітлено вимоги до ДНК-досліджень в Україні, етапні алгоритми проведення аналітичної процедури, особливості оцінки результатів дослідження та принципи формування архіву.

Посібник призначений для судово-медичних експертів-імунологів бюро (центрів) судово-медичної експертизи, ДНДКЦ МВС України, для правоохоронців, адвокатів, інтернів та студентів вищих медичних та юридичних навчальних закладів.

ISBN 978-966-2696-31-8

© Михайличенко Б.В., Мішалов В.Д.,
Біляков А.М., Войченко В.В.

ЗМІСТ

	ВСТУП	4
1	ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО ДНК	6
2	ВИКОРИСТАННЯ ДНК У СУДОВО-МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ	8
3	ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВУ РЕАКЦІЮ	11
4	ВИМОГИ ДО ЛАБОРАТОРІЇ	13
5	ВИМОГИ ДО ПЕРСОНАЛУ	16
6	РЕГЛАМЕНТАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В ЄВРОПІ	21
7	ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРОВЕДЕННЯ ПЛР	25
8	ВИЯВЛЕННЯ СЛІДІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ ВІД ЛЮДИНИ	33
9	ВИЛУЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКІВ ДЛЯ СУДОВО-МЕДИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	35
10	ОБ'ЄКТИ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА	37
11	ЗБЕРІГАННЯ ВИДІЛЕНОЇ ДНК	43
12	ДОБІР ЛОКУСНОЇ ПАНЕЛІ ДНК	43
13	ВИМОГИ ДО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В УКРАЇНІ	48
14	ЕТАПНІ АЛГОРИТМИ ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІТИЧНОЇ ПРОЦЕДУРИ ПЛР ДЛЯ РІЗНИХ ОБ'ЄКТІВ	49
15	ПРОВЕДЕННЯ ОЦІНКИ РЕЗУЛЬТАТІВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ	52
16	ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФІЛЮ ДНК БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ, В ЯКИХ НАЯВНА СЛІДОВА ЇЇ КІЛЬКІСТЬ	77
17	ФОРМУВАННЯ АРХІВУ	81
	ЛІТЕРАТУРА	82

ВСТУП

Молекулярно-генетичні (генотипоскопічні) дослідження являють собою новий крок у судово-медичній експертизі речових доказів, оскільки мають більший потенціал, ніж звичайні судово-імунологічні дослідження. Крім того, ці дослідження є високотехнологічними та мають високий рівень складності. У зв'язку із цим молекулярно-генетичні дослідження, які націлені на вирішення питань судово-медичної експертизи, мають мати відповідну регламентацію, яка б дозволила не тільки виконувати у законодавчому полі такі дослідження, але й надавати можливість формування міжлабораторної бази даних ДНК-аналізу, її інтеграцію із закордонними базами, можливість проведення повторних судово-медичних експертиз одних і тих самих зразків в інших лабораторіях бюро судово-медичної експертизи, що підвищить об'єктивність виконаних експертиз.

Тому, для забезпечення високого рівня і більшої ефективності роботи молекулярно-генетичних лабораторій в Україні, нами була реалізована перша спроба на шляху до створення державних стандартів молекулярно-генетичних тест-систем та уніфікованих методик ДНК-аналізу, сумісних із зарубіжними, і запропонований посібник «Судово-медична експертиза об'єктів біологічного походження за STR-локусами аутосомної ДНК з використанням полімеразно-ланцюгової реакції».

В ньому вперше, для потреб судово-медичної експертизи систематизовані та достатньо повно, на наш погляд, висвітлені основні питання, що стосуються вимог до обладнання, устаткування ДНК-лабораторії та її персоналу, рекомендації щодо проведення ПЛР та вилучення біологічних зразків для судово-медичного дослідження, а з них - вилучення зразків для ДНК-дослідження, зберігання виділеної ДНК, етапні алгоритми проведення аналітичної процедури ПЛР для різних об'єктів, проведення оцінки результатів ПЛР та інш.

Посібник призначений для судово-медичних експертів-імунологів бюро (центрів) судово-медичної експертизи, ДНДКЦ МВС України, для правоохоронців, адвокатів, інтернів та студентів вищих медичних та юридичних навчальних закладів.

1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО ДНК

Кожне ядро соматичної клітки тіла людини містить 23 пари хромосом, а кожна хромосома має одну молекулу ДНК, яка є універсальним носієм генетичної інформації та спадкових ознак усіх організмів, за виключенням деяких мікроорганізмів.

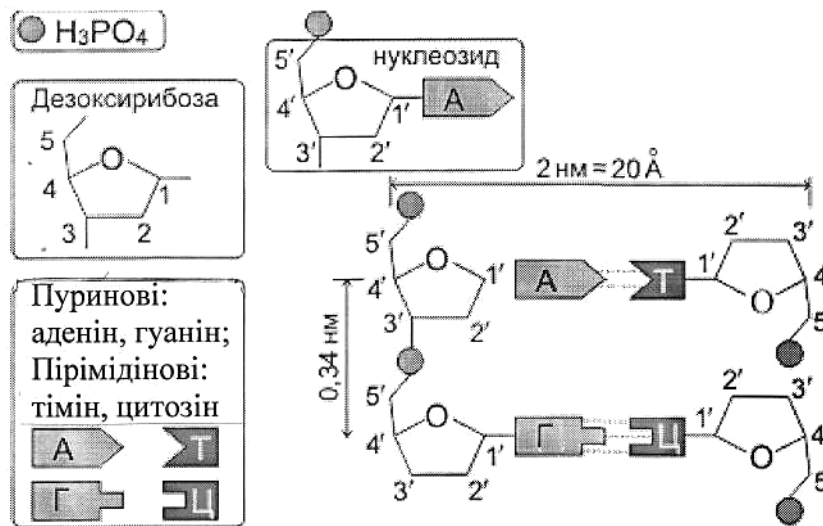
ДНК було відкрито у 1953 р. Френсісом Криком та Джеймсом Уотсоном як подвійну спіраль, що було відмічено Нобелівською премією у 1962 р. Відповідно до моделі Крика та Уотсона, ДНК являє собою подвійну нитку, яка скручена у спіраль. Кожна нитка складається із послідовно сполучених нуклеотидів. Кожен нуклеотид являє собою одне з чотирьох азотистих основ – гуанін (G), аденін (A), які є пуринами, та тимін (T), і цитозин (C), які є піримідинами. Ці азотисті основи сполучені із дезоксирибозою, до якої приєднана фосфатна група, і ці фрагменти, на відміну від основ, є однаковими у молекулі ДНК (мал.1). При цьому, аденін завжди пов'язаний тільки з тиміном, створюючи пару А-Т, а цитозин – з гуаніном: С-Г. Такі пари називаються комплементарними. Кількість комплементарних пар в організмі людини складає майже 3-3,5 млрд.

Між собою сусідні нуклеотиди сполучені в ланцюгу фосфодієфірним зв'язком, який утворений 3'-гідроксильною (3'-ОН) та 5' –фосфатною групою (5'-РО₃). Це обумовлює наявність полярності у ДНК – тобто, протилежної направленості, а саме, 5' – та 3'- кінців: 5' - кінцю однієї нитки відповідає 3'-кінець іншої нитки ДНК. Тобто, ланцюги ДНК антипаралельні між собою.

Діаметр подвійної спіралі ДНК складає 2 нм, відстань між сусідніми нуклеотидами 0,34 нм, на один оберт спіралі приходить 10 пар нуклеотидів. Довжина ДНК хромосоми сягає декількох см. Молекулярна маса (вага) становить десятки та сотні мільйонів. Сумарна довжина ДНК ядра клітини людини близько 2 м.

Ядро будь-якої клітини ссавців містить близько $6-7 \times 10^{-12}$ г ДНК, яка представлена у хромосомах. І тільки в яйцеклітинах та сперматозоїдах вміст ДНК у два рази менший, ніж у соматичних клітинах.

ДНК має первинну та вторинну структуру. Первинна структура ДНК являє собою лінійну послідовність нуклеотидів у ланцюгу, яку записують літерною формулою, наприклад – GAATGCCAT, причому, запис ведуть з 5'-кінця на 3'- кінець. Послідовність нуклеотидів являє собою генетичний код, який передається від покоління до покоління. Окремі ділянки молекули ДНК, в яких спадкова інформація закодована у вигляді пар нуклеотидів, являє собою ген.



Мал. 1. Структура ДНК

Причому, ознаки, які спадкуються, саме закладені у генах, що розташовуються у хромосомах клітинного ядра. Ген є одиницею спадкового матеріалу, відповідає за формування будь-якої ознаки. Він займає певну ділянку молекули ДНК. Сукупність генів, яка наявна в одинарному наборі хромосом, має назву геному, а генетична конституція організму – сукупність усіх його генів – називається генотипом.

Вторинна структура ДНК утворюється за рахунок взаємодії нуклеотидів між собою та водневих зв'язків, що призводить до утворення подвійної спіралі. Таким чином, ДНК являє собою два полінуклеотидні ланцюга.

Важливою властивістю ДНК є її здатність до реплікації – подвоювання. Цей процес відбувається у клітинах в три етапи:

- розплетення спіралі ДНК та розходження її ниток;
- приєднання праймерів;
- утворення нового ланцюжка ДНК.

У ядрі клітини за допомогою ферментів-каталізаторів відбувається розплетення спіралі у тій ділянці, де саме має відбутися реплікація. В подальшому, водневі зв'язки, які зв'язують нитки ДНК між собою, розриваються, а самі нитки-ланцюжки ДНК розходяться. Для побудови нового ланцюжка ДНК залучається фермент ДНК- полімераза, а також має бути стартовий блок (фундамент), яким є невеликий дволанцюжковий фрагмент ДНК. Комплементарна ділянка ланцюжка ДНК взаємодіє із праймером – одноланцюговим фрагментом, який складається із 20-30 нуклеотидів. Відбувається реплікація або клонування ДНК одночасно на обох нитках. Причому, із однієї молекули ДНК утворюється дві її молекули, в яких одна нитка походить від материнської молекули ДНК, а інша – заново

синтезована. Реплікація забезпечує точне копіювання генетичної інформації, яка міститься в ділянці ДНК та передає її від покоління до покоління.

Побудова нового ланцюга ДНК відбувається за принципом компліментарності, тобто, кожній азотистій основі з одного ланцюжка ДНК відповідає виключно комплементарна азотиста основа іншого ланцюжка, причому, напроти А (аденін) стоїть Т (тимін), а навпроти G (гуанін) – наявний С (цитозін).

Після утворення ланцюга молекула ДНК спочатку згортається, утворюючи нуклеосому, а потім - гетерохроматін, з якого і складаються хромосоми.

2. ВИКОРИСТАННЯ ДНК У СУДОВО-МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Сучасний стан науки дозволяє використовувати гіперваріабельні ділянки ДНК, яких відкрито у геномі людини у значній кількості. Ці ділянки зветься локусами, що означає "фіксоване положення", наприклад, гена, на хромосомі. Гіперваріабельність локусів вказує, що по кожному локусу у популяції наявні різні варіанти алелів, і тому люди різняться між собою. Алельний поліморфізм обумовлений різницею у кількості тандемних повторювань у різних алелях. Кількість тандемних повторювань у кожному конкретному алелі може бути різною та сягати декількох десятків. У кожній людини наявно по два алелю кожного поліморфного локуса, які можуть бути однакової довжини у випадку гомозиготності локуса, або мати різну довжину для гетерозіготного локуса. Це дає можливість їх використовувати для судово-медичних цілей – ідентифікації особи, встановлення належності біологічних об'єктів певній особі, а також визначати ймовірність батьківства.

У таких експертизах проводять дослідження ядерної аутосомальної ДНК, мітохондріальної ДНК та статевих Х та У хромосом.

Однак, можливості проведення ідентифікаційної процедури за локусами ДНК різного походження не є однаковими.

До гіперваріабельних локусів ДНК з високополіморфними ділянками генома відносяться VNTR локуси – тандемно-повторювальні послідовності з варіюючим числом копій. Кількість повторюваних однакових послідовностей визначається як номер алелю. Наприклад, якщо в ділянці ДНК наявно 12 однакових повторюваних копій, то ця ділянка зветься алелем 12. Ці локуси мають значний розмір (300-10000 bp), широку варіабельність, мультиалельність та значний ступінь гетерозіготності. Їх ще називають мінісателітами, оскільки вони мають повтори у 15-100 пар нуклеотидів та локалізуються у теломірних ділянках хромосоми. Крім того, ці локуси не є

кодуєчими. Такі локуси досить детально вивчені для потреб судово-медичної практики. Однак, їх використання обмежене довжиною алелей, яка сягає декількох сотень пар основ. У зв'язку із цим, їх використання для вивчення деградованої ДНК, яка досить часто зустрічається у судово-медичній практиці, має значні обмеження, не дивлячись на доступність приладів та реактивів.

Для ДНК-аналізу можуть бути використані кодуєчі її ділянки, наприклад, локуси HLA, DQA1, LDLR, GYPA, GC, які можливо використовувати у випадках незначної кількості ДНК та її деградації ДНК. Однак, в багатьох країнах використання кодуєчих ділянок ДНК заборонено.

Для вирішення питань судово-медичної ідентифікації використовують також мітохондріальну ДНК. В соматичній клітині знаходиться від сотень до тисяч мітохондрій, і кожна мітохондрія має багато копій своєї власної ДНК, яка має циркулярну кільцеподібну будову, внаслідок чого ДНК більш стійка до ушкоджуючої дії екзонуклеаз. Це обумовлює їх використання в випадках незначної кількості ДНК. Зазвичай, мітохондріальну ДНК використовують при дослідженні кісток, зубів, волосся. Крім того, мітохондріальну ДНК також використовують при дослідженні досить давніх – старих біологічних об'єктів, наприклад, історичного матеріалу. Важливим є те, що мітохондріальна ДНК ідентична у осіб по материнській лінії. Однак, її використання обмежене невисокою інформативністю, порівняно із ядерними маркерами та значною дороговизною самої аналітичної процедури. Мітохондріальна ДНК має два гіперваріабельні регіони, які використовують для ідентифікації: 342 bp HVІ та 268 bp HVІІ, які успадковуються по материнській лінії. У зв'язку із цим, мітохондріальна ДНК не дозволяє розрізнити осіб, які мають одну материнську лінію.

До некодуєчих ділянок ДНК відносяться STR (short tandem repeat) локуси, які є досить розповсюдженими у геномі людини. STR маркери називають мікросателітами ДНК.

Такі локуси мають короткі послідовності у межах від 3 до 7 нуклеотидів, а довжина алелей становить від 100 до 500 п.н. і, таким чином, STR локуси є найбільш перспективні для дослідження деградованої ДНК, в якій може бути незначна кількість придатних для аналізу ділянок. У більшості випадків STR маркери складаються із 4 нуклеотидних послідовностей. Причому, кількість таких повторів може бути різною. Такі 4-х нуклеотидні послідовності використовуються у судовій медицині для генотипоскопічних досліджень при проведенні ідентифікаційних процедур. Невеликі розміри STR локусів дають більше шансів провести ДНК дослідження, особливо для зразків, які мають мінімальні кількості ДНК або

деградовану ДНК. Біологічний матеріал, який є речовим доказом та який знаходять на місці пригоди, може бути досліджений з використанням STR маркерів. Тому, профіль ДНК може бути з'ясований навіть при судово-медичному дослідженні таких об'єктів, як відбитки пальців, слюна, плями поту, за умов, якщо в них наявні клітини з ядрами. Ці маркери використовують у випадках деградації ДНК мікроорганізмами, а також при наявності інгібіторів ПЛР. Наприклад, вплив ультрафіолетових променів сонячного світла на біологічні зразки із ДНК індукує утворення піримідинів, які інгібують ПЛР. Крім того, ПЛР може бути інгібована гуміновими кислотами, деякими текстильними барвниками, наприклад, індиго, або гематином крові.

Останнім часом в науковій генетиці з'явилися повідомлення про використання ампліфікаційних систем, що отримали назву «міні STR». Ці системи по фланкам поліморфної ділянки ДНК мають зменшену послідовність нуклеотидів, що обумовлює розмір продуктів ПЛР, який не перебільшує 200 пар нуклеотидів. Безперечно, такі системи розраховані, перш за все, на дослідження саме деградованої ДНК. Однак, найсуттєвішим їх недоліком є можливість отримання хибно позитивного висновку про гомозиготність алелю, в той час як алель є гетерозиготним. Це обумовлене тим, що в ділянці розташування праймерів на матричній ДНК, де саме наявна зменшена послідовність нуклеотидів та прикріплюються праймери, наявні мутаційні заміщення.

В останній час почалися дослідження поліморфних локусів статевих X та Y-хромосом. Інформативність ділянок ДНК Y-хромосоми досить незначна, оскільки варіації в ДНК відбуваються в межах 1 нуклеотида (т.зв. SNP – single nucleotide polymorphism). Такий аналіз обмежений використанням виключно чоловічого біологічного матеріалу, оскільки генетичні властивості Y-хромосоми передаються виключно по батьківській лінії. При цьому, якщо у STR маркера наявно, наприклад, 7 повторів, то така ж кількість повторів буде наявна у сина цього чоловіка. Гаплотип, який є унікальним набіром алелів відповідних локусів на Y-хромосомі, дозволяє простежувати батьківські лінії в родинах. Наприклад, якщо STR ділянка хромосоми, яка складається із TCGA–нуклеотидів має 12 повторів, то така ж їх кількість буде передана і сину цього чоловіка. Крім того, використання STR ділянок Y-хромосоми дозволяє також вирішувати питання еволюційного характеру людини. Враховуючи появу мутацій, можливо вирахувати для чоловіка приблизний час, коли жив його загальний предок.

У X-статевій хромосомі також локалізовані короткі тандемні повтори – STR локуси.

Враховуючи, що батько передає Х-хромосому своїм дочкам, то Х-хромосома може бути використана для встановлення батьківства, коли дитина жіночої статі. Сини отримують цю хромосому від матері, що може бути використано при встановленні материнства та у випадках встановлення батьківства кровних родичів.

3. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ ПРО ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВУ РЕАКЦІЮ

В лабораторних умовах вдалося відтворити контрольовану реплікацію ДНК методом полімеразно-ланцюгової реакції. При цьому відтворюють реплікацію не всієї молекули ДНК, а тільки її невеликого фрагмента.

У 1983 р. К. Мюллісом було розроблено метод клонування послідовностей ДНК *in vitro*, який отримав назву полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). До зразку ДНК додають в надлишку 2 синтетичних олігонуклеотида – праймера, розмір якого становить близько 20 нуклеотидів. Кожен з них комплементарний одному із 3-кінців фрагмента ДНК.

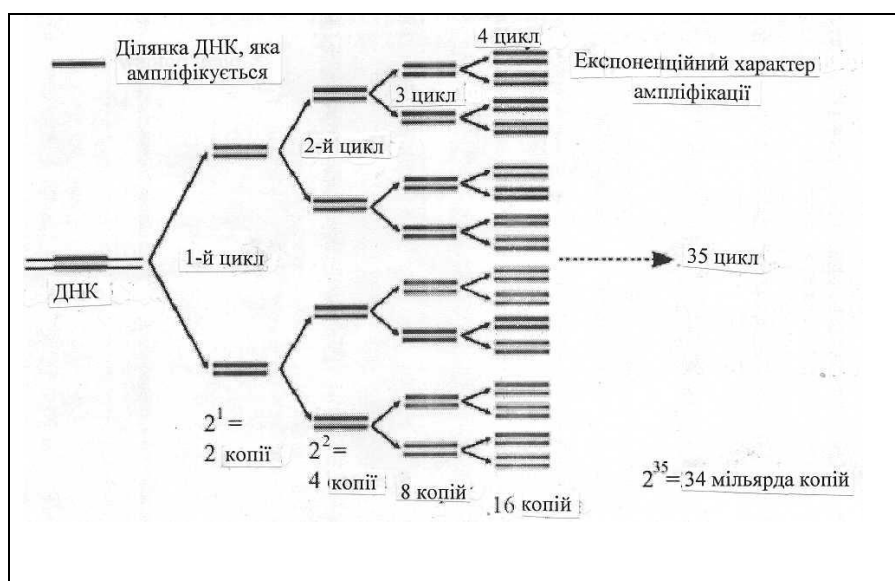
ДНК нагрівають для розділення подвійної спіралі, а після наступного охолодження відбувається гібридизація праймерів з комплементарними ділянками фрагментів ДНК. В результаті, у розчині будуть знаходитися одониткові ДНК з короткими дволанцюжковими ділянками-затравками (праймерами). Якщо додають у розчин нуклеотиди та ДНК-полімерази, то синтезуються комплементарні ланцюги і утворюються ідентичні фрагменти ДНК. Це перший цикл контрольованої реплікації. В подальшому реакція зупиняється і ДНК знову денатурується прогріванням.

В процесі охолодження праймери, які знаходяться у надлишку, знову гібридизуються, але не тільки з початковою ДНК, але й з тією, яка заново була синтезована. І так відбувається впродовж декількох циклів. Повторення цієї процедури дозволяє провести 30 та більше циклів. Під час цієї реакції ампліфікується тільки та послідовність нуклеотидів, яка обмежена праймерами. При такій реакції кількість фрагментів ДНК зростає у геометричній прогресії, що і обумовило її визначення - ланцюгова реакція. Після 30-40 циклів кількість фрагментів ДНК перевищує декілька мільярдів, що надає можливість їх детекції різними методами (мал. 2).

ПЛР дозволяє виявляти однакові копії генів у геномі. Чутливість методу така, що *теоретично* дозволяє ампліфікувати в ПЛР та виявити необхідну послідовність навіть у тому випадку, якщо вона зустрічається навіть один раз у зразку із 100 000 клітин.

Розмножений *in vitro* фрагмент ДНК отримують у достатніх кількостях, що дозволяє його безпосередньо визначити.

Однак, для процесу ампліфікації необхідно, щоб структура праймерів була ідентичною (комплементарною) до ділянки вихідної ДНК. Якщо цього не відбувається у випадку відсутності специфічної ДНК, то подвоєння ДНК не відбувається. Якщо у розчині не буде жодної молекули ДНК з ділянкою, яка комплементарна внесеним праймерам, то реакція ПЛР не відбувається, не дивлячись на те, що у розчині буде наявно інші молекули ДНК. Як раз цим і обумовлена висока специфічність ПЛР.



Мал. 2. Схема полімеразно-ланцюгової реакції
(за Andy Vierstraete, 2001)

ПЛР виконують у декілька етапів, а саме:

1-й етап - виділення нуклеїнової кислоти із досліджувального матеріалу.

2-й етап: проведення ПЛР (ампліфікації). У розчин, в якому наявна суміш нуклеотидів, ПЛР-буфер, полімераза, праймери, додають ДНК, яку виділили на першому етапі. Цю реакційну суміш нагрівають до температури 90-94°C, що призводить до денатурації ДНК. Надалі температуру знижують до 50-70°C залежно від нуклеотидної послідовності праймерів таким чином, щоб віджиг (сполучення) відбувався виключно у комплементарних ділянках. Надалі у суміші встановлюють температуру, яка є оптимальною для роботи ДНК-полімерази. При повторенні таких циклів кількість копій ділянки ДНК, яка знаходиться між місцями посадки праймерів, збільшується у геометричній прогресії.

Ампліфікація алелей локусів може бути проведена у монолокусному форматі, коли вона відбувається у роздільній для кожного локусу реакційній суміші із відповідними праймерами. У випадку мультилокусного формату,

якщо умови ПЛР є однаковими для декількох локусів, то ампліфікацію проводять за загальною методикою для низки локусів. Мультилокусний формат проведення ПЛР є переважним перед монолокусним, оскільки потребує меншої кількості ДНК. Тобто, маючи одну якусь кількість ДНК, можна у мультилокусному форматі визначити не одну генетичну характеристику, а декілька.

3-й етап: врахування результату реакції. Накопичені продукти ампліфікації, тобто, копії ДНК між місцями посадки праймерів, виявляють електрофорезом у гелі.

Однак, як і будь-який метод дослідження, ПЛР має свої недоліки.

Передусім, висока чутливість методу ПЛР обумовлює проблему контамінації – випадкового потрапляння в досліджувальну пробу іншої ДНК з іншої проби або іншого об'єкту. Це призводить до хибно-позитивного результату. У зв'язку із цим, в лабораторії, де проводять ДНК-аналіз, необхідно суворо дотримуватися умов захисту від контамінації.

Крім того, в реакційній суміші можуть бути інгібітори ДНК-полімерази, що обумовлює появу хибно-негативного результату.

4. ВИМОГИ ДО ЛАБОРАТОРІЇ

Генотипоскопічні дослідження мають проводитися у відділенні судово-медичної імунології відділу судово-медичної експертизи речових доказів. Зважаючи на особливість таких досліджень, порівняно із судово-імунологічними, це відділення має мати відповідну лабораторію для проведення генотипоскопічних досліджень з відповідним комплексом приміщень.

При виконанні молекулярно-генетичних досліджень певного значення мають кваліфікація експерта, рівень технічного забезпечення лабораторії, дотримання технології проведення аналітичної процедури та коректність висновків. Такі вимоги повинні забезпечити отримання однакових діагностичних характеристик, які мають бути доказовими та валідними незалежно від лабораторії.

Молекулярно-генетичні лабораторії бюро судово-медичної експертизи повинні підлягати сертифікації.

Вимоги до лабораторії молекулярно-генетичного аналізу

Лабораторія для проведення ПЛР має складатися із 4-х робочих зон (мал. 3), кожна з яких повинна мати окреме лабораторне обладнання та забезпечувати принцип попередження контамінації.

В лабораторії повинні бути виділені спеціальні зони таким чином, щоб зона, де проводять маніпуляції із уже ампліфікованою ДНК, була фізично ізольована від робочої зони, де проводять попереднє дослідження речових доказів та вилучення зразка для ДНК-екстракції, із зоною де проводять саму ПЛР. Суворі фізична ізоляція має попередити можливість контамінації шляхом перенесення ампліфікованої ДНК за межі робочої зони.

Ампліфікована ДНК та обладнання, яке використовується для проведення маніпуляцій із ампліфікованою ДНК, не повинні виноситися за межі зони, де визначаються продукти ПЛР. При цьому, слід виключити можливість контамінації шляхом повітряних потоків.

Зона для дослідження речових доказів Огляд направлених для ДНК-дослідження речових доказів, пробовідбір для наступного ДНК-аналізу	Зона для проведення екстракції ДНК із відібраних зразків Виділення ДНК із зразку Контроль процедури лізису	Зона підготовки до ПЛР Зберігання виділеної ДНК, реактивів для ПЛР (за виключенням алельного леддера) Підготовка реактивів для ПЛР
	Визначення кількісного вмісту ДНК у зразку	Зона ПЛР Змішування реактивів із зразками ДНК
Зона для проведення ампліфікації ДНК Визначення придатності виділеної ДНК для ампліфікації. Зберігання ампліфікованої ДНК. Зберігання алельного леддера. Проведення ампліфікації ДНК. Проведення детекції.		

Мал. 3. Структура лабораторії ПЛР

1. Зона для дослідження речових доказів. В цій зоні відбувається вивчення надісланих на експертизу речових доказів. Вони фотографуються та з них вилучають зразки для наступного аналізу.

Проведення огляду та вилучення зразків з речових доказів для аналізу доцільно проводити в різний час. Це дає можливість мінімізувати потенційну крос-контамінацію між речовими доказами, вилученими зразками для аналізу та контролюми до них.

Весь час роботи із речовими доказами слід користуватися рукавичками, які необхідно замінювати при роботі із різними зразками. Це

дозволяє попередити контамінацію від зразка до зразка, особливо при вивченні зразків-порівняння (контролів).

Для вилучення зразка для аналізу із речового доказу слід використовувати ножиці, які для роботи з новим зразком речового доказу попередньо обробляють етанолом та водою або використовують нові леза для скальпеля.

2. Зона для проведення екстракції ДНК з досліджувальних зразків.

З метою мінімізації можливої контамінації під час екстракції зразків зі значним вмістом ДНК, наприклад, кров, необхідно проводити їх екстракцію окремо від зразків, які мають незначний вміст ДНК (поодинокі волосся, малі сліди крові). Крім того, важливим попереджувальним заходом також є проведення різної за часом екстракції із речових доказів та контрольних зразків до них. Для проведення екстракції ДНК із наданих на дослідження зразків необхідно використовувати їх у мінімально необхідній кількості. Це забезпечить в подальшому можливість повторного їх дослідження.

Піпетки, які використовували для ДНК-екстракції, не можна використовувати при проведенні ПЛР. Перед кожним забором зразку необхідно замінювати піпетку та виключити розбрикування особливо під час відкриття пробірок.

Розчини, які використовують для ДНК-екстракції, мають бути стерильними, що забезпечується стерилізацією паром або фільтрацією (з урахуванням стабільності реактиву). Стерилізація паром призводить до деградації ДНК на малі фрагменти, які унеможливають їх ампліфікацію.

При проведенні кожної процедури ДНК-екстракції необхідно проводити контроль реактивів на контамінацію ДНК. Після роботи в зоні для екстракції ДНК її необхідно вимити, а поверхні обробити 10% розчином відбілювачем.

Якщо зона для екстракції ДНК не відмежована від зони, де проводять огляд речових доказів, то перед початком процесу екстракції ця зона має бути чисто вимитою. Зони для ДНК-екстракції та проведення ПЛР мають бути відокремлені одна від іншої для попередження переносу екзогенної людської ДНК у зону для проведення ПЛР.

Крім екстракційної процедури, у цій зоні також контролюють ступінь лізису клітин та визначають кількісний вміст ДНК у зразку.

3. Зона підготовки до ПЛР. Ця зона призначена для зберігання виділеної із зразків ДНК, реактивів для проведення ПЛР. Крім того, в цій робочій зоні готують реактиви для проведення ПЛР. Поруч із цією зоною розташовується окрема кімната, в якій відбувається змішування реактивів із зразками ДНК.

Виходячи із цієї зони, необхідно завжди знімати рукавички та лабораторний халат для виключення можливості перенесення ДНК у інші робочі зони. Лабораторне обладнання цієї зони використовують виключно за його призначенням.

4. Зона для проведення ампліфікації ДНК. В цій зоні проводять визначення придатності виділеної ДНК для ампліфікації, виконують ампліфікацію ДНК, її детекцію, зберігають уже ампліфіковану ДНК та алельний леддер.

Ідентифікація алелів у локусах може бути проведена в автоматичному режимі, коли використовують колоночну хроматографію з флуоресцентною міткою, як, наприклад, у ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Якщо ж проводять електрофорез у гелі, то саму гелеву пластинку із наявними на ній фрагментами ампліфікованої ДНК аналізують у спеціальній темній кімнаті. При цьому проводять забарвлення гелю, його промивання та проявлення смуг, які вказують на наявність ампліфікованих алелів. Для отримання відеозображень і розмірів ампліфікованих фрагментів ДНК використовують гель-документування "Image Master VDS" (Amersham Pharmacia Biotech, USA) або проводять візуальне порівняння із фрагментом леддера. Гелі підлягають фотографуванню, і в подальшому цифровий знімок аналізують.

5. ВИМОГИ ДО ПЕРСОНАЛУ

Молекулярно-генетичні дослідження може проводити лікар-судово-медичний експерт-імунолог, який пройшов не тільки спеціалізацію із судово-медичної імунології, але й підвищив свій фах в галузі генетики та володіє методами молекулярно-генетичного аналізу, зокрема, технологією проведення полімеразно-ланцюгової реакції. Такий фахівець має суворо дотримуватися технології проведення аналітичної процедури молекулярно-генетичного аналізу та трактувати результати дослідження відповідно до сучасних наукових даних у галузі судово-медичної генетики.

Процесуальні основи діяльності судово-медичного експерта

Діяльність судово-медичного експерта регламентується низкою нормативно-правових актів, серед яких особливе значення мають закон України „Про судову експертизу” та Кримінально-процесуальний кодекс України (від 13.04.2012 р. №4651-VI).

Відповідно до закону України „Про судову експертизу” (ст.1) «Судова експертиза - це дослідження експертом на основі спеціальних знань матеріальних об'єктів, явищ і процесів, які містять інформацію про обставини справи, що перебуває у провадженні органів дізнання, досудового та судового слідства».

Під час проведення судових експертиз об'єкти дослідження можуть бути пошкоджені або витрачені лише у тій мірі, в якій це необхідно для дослідження (Ст. 5).

Судовими експертами можуть бути особи, які мають необхідні знання для надання висновку з досліджуваних питань.

Судовими експертами державних спеціалізованих установ можуть бути фахівці, які мають відповідну вищу освіту, освітньо-кваліфікаційний рівень не нижче спеціаліста, пройшли відповідну підготовку та отримали кваліфікацію судового експерта з певної спеціальності (Ст. 10).

Одже, вся професійна діяльність судового експерта має бути підпорядкована вимогам чинного законодавства.

Під час виконання своїх експертних функцій держава надає гарантії незалежності судовому експерту та правильності його висновку (ст. 4). Незалежність судового експерта та правильність його висновку забезпечуються:

- процесуальним порядком призначення судового експерта;
- заборонаю під загрозою передбаченої законом відповідальності втручатися будь-кому в проведення судової експертизи;
- існуванням установ судових експертиз, незалежних від органів дізнання, досудового та судового слідства;
- створенням необхідних умов для діяльності судового експерта, його матеріальним і соціальним забезпеченням;
- кримінальною відповідальністю судового експерта за дачу свідомо неправдивого висновку та відмову без поважних причин від виконання покладених на нього обов'язків;
- можливістю призначення повторної судової експертизи;
- присутністю учасників процесу в передбачених законом випадках під час проведення судової експертизи.

Відповідно до статті 69 Кримінально-процесуального кодексу „1. **Експертом** у кримінальному провадженні є особа, яка володіє науковими, технічними або іншими спеціальними знаннями, має право відповідно до Закону України „Про судову експертизу” на проведення експертизи і якій доручено провести дослідження об'єктів, явищ і процесів, що містять

відомості про обставини вчинення кримінального правопорушення, та дати висновок з питань, які виникають під час кримінального провадження і стосуються сфери її знань.

2. Не можуть бути експертами особи, які перебувають у службовій або іншій залежності від сторін кримінального провадження або потерпілого.

Експерт має право:

1) знайомитися з матеріалами кримінального провадження, що стосуються предмета дослідження;

2) заявляти клопотання про надання додаткових матеріалів і зразків та вчинення інших дій, пов'язаних із проведенням експертизи;

3) бути присутнім під час вчинення процесуальних дій, що стосуються предметів та об'єктів дослідження;

4) викладати у висновку експертизи виявлені в ході її проведення відомості, які мають значення для кримінального провадження і з приводу яких йому не були поставлені запитання;

5) ставити запитання, що стосуються предмета та об'єктів дослідження, особам, які беруть участь у кримінальному провадженні;

6) одержати винагороду за виконану роботу та відшкодування витрат, пов'язаних із проведенням експертизи і викликом для надання пояснень чи показань, у разі, якщо проведення експертизи не є службовим обов'язком особи, яка залучена як експерт;

7) заявляти клопотання про забезпечення безпеки у випадках, передбачених законом;

8) користуватися іншими правами, передбаченими Законом України „Про судову експертизу”.

Експерт не має права за власною ініціативою збирати матеріали для проведення експертизи. Експерт може відмовитися від давання висновку, якщо поданих йому матеріалів недостатньо для виконання покладених на нього обов'язків. Заява про відмову має бути вмотивованою.

Експерт зобов'язаний:

1) особисто провести повне дослідження і дати обґрунтований та об'єктивний письмовий висновок на поставлені йому запитання, а в разі необхідності – роз'яснити його;

2) прибути до слідчого, прокурора, суду і дати відповіді на запитання під час допиту;

3) забезпечити збереження об'єкта експертизи. **Якщо дослідження пов'язане з повним або частковим знищенням об'єкта експертизи або зміною його властивостей, експерт повинен одержати на це дозвіл від особи, яка залучила експерта;**

4) не розголошувати без дозволу сторони кримінального провадження, яка його залучила, чи суду відомості, що стали йому відомі у зв'язку з виконанням обов'язків, або не повідомляти будь-кому, крім особи, яка його залучила, чи суду про хід проведення експертизи та її результати;

5) заявити самовідвід за наявності обставин, передбачених цим Кодексом.

Експерт невідкладно повинен повідомити особу, яка його залучила, чи суд, що доручив проведення експертизи, про неможливість проведення експертизи через відсутність у нього необхідних знань або без залучення інших експертів.

У разі виникнення сумніву щодо змісту та обсягу доручення експерт невідкладно заявляє клопотання особі, яка призначила експертизу, чи суду, що доручив її проведення, щодо його уточнення або повідомляє про неможливість проведення експертизи за поставленим запитанням або без залучення інших осіб”.

Експерт несе відповідальність, про що йдеться у статті 70:

„За завідомо неправдивий висновок, відмову без поважних причин від виконання покладених обов'язків у суді, невиконання інших обов'язків експерт несе відповідальність, встановлену законом”.

Також КПК регламентує зміст висновку експерта (стаття 102), згідно якої:

1. У висновку експерта повинно бути зазначено:

1) коли, де, ким (ім'я, освіта, спеціальність, свідоцтво про присвоєння кваліфікації судового експерта, стаж експертної роботи, науковий ступінь, вчене звання, посада експерта) та на якій підставі була проведена експертиза;

2) місце і час проведення експертизи;

3) хто був присутній при проведенні експертизи;

4) перелік питань, що були поставлені експертові;

5) опис отриманих експертом матеріалів та які матеріали були використані експертом;

6) докладний опис проведених досліджень, у тому числі методи, застосовані у дослідженні, отримані результати та їх експертна оцінка;

7) обґрунтовані відповіді на кожне поставлене питання.

2. У висновку експерта обов'язково повинно бути зазначено, що його попереджено про відповідальність за завідомо неправдивий висновок та відмову без поважних причин від виконання покладених на нього обов'язків.

3. **Якщо при проведенні експертизи будуть виявлені відомості, які мають значення для кримінального провадження і з приводу яких не**

ставилися питання, експерт має право зазначити про них у своєму висновку. Висновок підписується експертом”.

Алгоритм дій судово-медичного експерта при проведенні молекулярно-генетичного дослідження

Під час проведення судово-медичної експертизи речових доказів судово-медичний експерт-імунолог, який виконує молекулярно-генетичні дослідження:

- знайомиться з наданою документацією;
- оглядає упаковку та після її розкриття – і самий речовий доказ.

Під час вивчення речового доказу судово-медичний експерт має звернути свою увагу на правильність пакування речових доказів та дотримання принципу попередження контамінації. У зв'язку із цим, необхідно працювати у гумових рукавичках, які необхідно замінювати при роботі із об'єктами порівняння.

- планує хід проведення дослідження речового доказу. При цьому, відповідно до поставлених питань обирає необхідні методики, які будуть використані в ході аналітичної процедури. Досить важливим аспектом цього етапу є проведення оцінки можливості виділення ДНК із об'єктів та її кількості у ньому, з'ясування умов зберігання речового доказу для попереднього вирішення питання про можливість деградації ДНК.

В ході такого аналізу судово-медичний експерт користується відомими науковими даними про вміст ДНК у різних об'єктах та аналізує дані щодо умов та тривалості зберігання надісланих об'єктів.

- вилучає об'єкт або його частину для дослідження. Під час цієї процедури обов'язково використовує тільки мінімально необхідну частину об'єкту, оцінюючи вміст у ньому ДНК. Інша частина об'єкта залишається в якості контрольного матеріалу для можливого проведення повторного дослідження. Всі процедури виконуються із дотриманням принципу попередження контамінації.

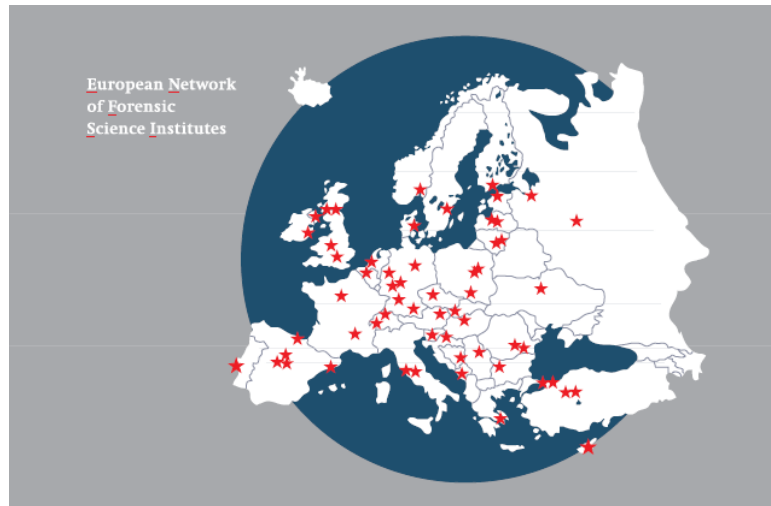
- виконує саме дослідження відповідно до аналітичного регламенту проведення, який вказаний у керівництвах до діагностичної панелі;

- архівує результати або частину виділеної ДНК із речового доказу;
- проводить аналіз отриманих результатів;
- складає „Висновок експерта” з повною аргументованою відповіддю на поставлені питання з урахуванням сучасного стану генотипоскопічних досліджень. При цьому, у „Висновку експерта” мають бути наведені дані щодо стану об’єкта дослідження, можливості деградації наявної у ньому ДНК під час зберігання, визначення кількості виділеної з нього ДНК, можливості її ампліфікації, виявлені алелі, показники, які використовують при розрахунках та наведена інформація про відповідні контролю.

6.РЕГЛАМЕНТАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В ЄВРОПІ

На теренах об’єднаної Європи існує Європейське співтовариство судових наукових інститутів - European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), яке було організоване як орган, що має виняткову думку щодо забезпечення якості розвитку та розповсюдження знань в галузі судових наук у Європі. Одним із напрямків діяльності цього європейського співтовариства є заохочення та підтримка всіх ENFSI лабораторій використовувати в своїй діяльності міжнародні стандарти для забезпечення якості та компетентності досліджень.

Історія ENFSI почалася у 1992 р, коли директори урядових судових лабораторій погодилися про необхідність проведення регулярних зустрічей конференцій для дискутування питань, що мають спільне значення. І вже у 1993 р. на першій конференції в Rijswijk (Нідерланди) приймали участь 11 судових лабораторій. Офіційне заснування ENFSI відбулося 20 жовтня 1995 р., коли засновники ENFSI підписали відповідний Меморандум. У 1999 р. на щорічній конференції у Москві була прийнята перша Конституція ENFSI та було організовано вебсайт – www.enfsi.eu. Зараз ENFSI налічує своїми членами майже 60 судових лабораторій з усіх країн європейського союзу та країн-кандидатів до ЄС.



Мал. 4. Країни, судові лабораторії яких є членами ENFSI

Судова лабораторія може стати членом ENFSI за умов, якщо:

- походить із Європейської країни;
- належить до сфери діяльності судової експертизи;
- має акредитацію ISO 17025 або планує її отримати;
- має гідний довіри статус в своїй країні;
- в лабораторії працює не менш, ніж 25 експертів, яким дозволено досліджувати речові докази.

ENFSI має 16 експертних робочих груп відповідно на різних напрямків, 2 постійних комітети, в тому числі і комітет з якості та компетентності (Quality and Competence Committee – QCC), та європейську академію судових наук (EAFS).

Серед 16 робочих груп ENFSI наявна також робоча група з ДНК досліджень. У квітні 2012 р. ця робоча група розробила рекомендації, в яких розглядаються різні аспекти стосовно менеджменту судових ДНК-досліджень. Цих рекомендацій мають дотримуватися відповідні судові лабораторії.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ENFSI

1. Кожна країна Європейського Союзу має створити базу даних ДНК та законодавство для її імплементації і контролю.

2. Дані зразків, які безпосередньо відносяться до злочину, та які можуть бути внесені у базу даних ДНК, мають бути відкритими для їх поповнення.

3. Для збільшення шансу впізнання особи за зразком ДНК, інформація про осіб, які внесені у базу даних ДНК, та які можуть співпадати, має бути законодавчо та фінансово доступною.

4. Керівники державних баз даних ДНК мають разом із посередниками встановлювати критерії для включення необхідної інформації у бази даних для того, щоб досягти прийняттого балансу між мінімально допустимою кількістю важливих улік і максимальною кількістю випадкових співпадінь.

5. Бази даних ДНК, які раніше були сформовані, необхідно по можливості, поповнювати після перевірки з державною базою даних ДНК для того, щоб впевнитися, що зразок, який є улікою, відповідає критеріям міжнародного співставлення, якщо уряд країни має за мету внести такі бази даних в міжнародну пошукову систему.

6. Для збільшення ймовірності отримання релевантних відповідностей зразків ДНК, які відносяться до злочину, тільки стандартні зразки ДНК мають бути внесені в базу, яка вміщує повну інформацію, що отримана за допомогою ПЛР.

7. Лабораторії, які досліджують зразки ДНК, для внесення в бази даних мають відповідати стандарту ISO-17025 (або національному стандарту), бути акредитованими та приймати участь у проведенні спеціалізованих лабораторних досліджень.

8. У випадку, якщо зразки ДНК отримані із матеріалу із низьким вмістом ДНК, але включені в базу даних, їх слід вважати достовірними і для них застосовується метод співставлення.

9. Змішані зразки ДНК мають бути отримані із зразків одного й того ж матеріалу (екстрактів) ДНК, оскільки не можна виключити того факту, що такі зразки можуть бути отримані від різних людей.

10. Якщо новий алель присутній у зразку ДНК, його наявність необхідно підтвердити методом повторюваних виділень ДНК, ПЛР, капілярним електрофорезом та надати назву такому алелю.

11. Алелі, які отримані із локусів з хромосомними порушеннями, не мають бути включеними в базу ДНК, оскільки вони можуть бути викликані соматичними мутаціями, які можуть зустрічатися тільки у відповідних тканинах та рідинах організму.

12. Для аналізу змішаних зразків необхідно дотримуватися вказівок, які наявні у документі з аналізу змішаних зразків.

13. Кількісне співставлення між стандартними та змішаними зразками має завжди перевірятися на предмет відповідності структурі змішаного ДНК.

14. Змішані зразки, які отримані більш, ніж у 2-х осіб, не можуть бути включені в базу даних ДНК, оскільки існує ймовірність отримання випадкових відповідностей.

15. Якщо видалення зразку із бази даних ДНК сталося внаслідок впровадження інформації із зовнішніх джерел, то необхідно надати тримачу бази даних ДНК доступ до цієї інформації, переважно за рахунок автоматичного повідомлення безпосередньо після випадку, який призвів до видалення даних ДНК.

16. Має існувати процедура, яку співробітники лабораторії можуть використовувати для того, щоб впевнитися, що інформація про клієнта вже внесена у базу даних ДНК.

17. Процедура, якою можуть скористатися співробітники лабораторії, які проводять аналіз ДНК, щоб впевнитися, чи занесена інформація про клієнта у базу даних ДНК, має сполучатися з системою швидкої біометричної ідентифікації, наприклад, відбитками пальців для підтвердження факту про наявність інформації про клієнта в базі даних ДНК.

18. Будь-яка база даних ДНК має мати власну систему видалення даних. Це має стосуватися співробітників всіх рівнів лабораторії, а також персоналу, який має доступ до бази даних. Дані, для яких наявний доступ (наприклад, у поліції), також мають бути приєднані до неідентифікованих зразків ДНК, які знаходяться в матеріалах, що потрапили у категорію негативного контролю, із виробничих предметів одноразового використання та хімічних речовин. Остання категорія зразків ДНК має бути представлена у всі бази даних ДНК, в тому числі і всіх країн Європейського Союзу.

19. Поява помилок під час вводу даних в базу даних ДНК, які обумовлені людським фактором, має бути виключена, що має забезпечуватися шляхом автоматичного найменування алеля та введення його в базу даних ДНК. Під час введення даних у базу необхідно використовувати програму по видаленню помилок, наприклад, програму подвійного введення даних.

20. Для попередження помилкових негативних співпадінь зразків ДНК, їх необхідно співставляти, зокрема, з одним неспівпадінням. Дані ДНК, які потрапляють під категорію ймовірного співпадіння, мають бути перевірені на наявність можливих помилок під час проведення аналізу та обробки цих даних.

21. Оскільки державна база даних ДНК знаходиться під пильною увагою суспільства, політиків та засобів масової інформації, відповідальна особа має визначати параметри діяльності баз даних ДНК та забезпечити максимальний доступ до них громадськості.

22. Відповідальна особа щодо бази даних ДНК має враховувати можливість випадкових співпадінь та бути готовою спрогнозувати їх очікувану кількість у своїй звітній документації. Необхідно звернути увагу на фактор, який збільшує можливість знайдення випадкових співпадінь (розмір бази даних, кількість спроб пошуку, кількість змішаних та часткових зразків/ ймовірність випадкового співпадіння, кількість членів родини).

23. Співпадіння зразків ДНК, які отримані з місця скоєння злочину, із зразками бази даних має бути інформативним та не залежати від звичайного способу визначення доказової цінності співпадінь зразку; необхідно також враховувати можливість випадкового співпадіння (як

було вказано у п.21) ще й той факт, що це співпадіння має прийматися до уваги із іншою інформацією.

24. Зразки мають бути внесені у базу даних таким методом, який гарантує їх коректне введення. Доступ до бази даних ДНК слід обмежити для тих осіб, які можуть мати до неї доступ, використовуючи механічні та організаційні ресурси. Має проводитися періодичне резервне копіювання даних, які будуть зберігатися в безпеці та систематично оновлюватися, щоб не була знищена база.

У випадку, якщо бази даних ДНК та відповідна інформація наявна у різних системах, то ці системи мають регулярно звірятися для їх синхронізації. Коли співпадіння між двома зразками ДНК має співпадіння в одному локусі, дані обох зразків необхідно контролювати та періодично впевнюватися в тому, чи немає помилки в одному зразку.

25. Для того, щоб визначити помилкові негативні співпадіння (тобто, співпадіння, які необхідно знайти, однак вони не були знайдені внаслідок помилки в базі даних) необхідно проводити регулярний контроль всієї бази даних ДНК, під час якого можливо припустити одне або більше неспівпадінь.

26. Інформація, яка отримана із державної бази даних ДНК, повинна бути представлена разом з іншими видами улік для виявлення факторів, які сприяють розкриттю злочинів.

27. Автоматизовані програми зменшують ймовірність появи помилок, які обумовлені людським фактором, і тому їх необхідно використовувати в інноваційних програмах.

28. З судової точки зору клітинний матеріал стандартних зразків необхідно зберігати разом з відповідним зразком ДНК впродовж одного й того ж часу.

29. Оскільки бази даних ДНК відіграють важливу роль у суспільстві, посадова особа бази даних ДНК має розробити інструмент для створення об'єктивної інформації про базу даних ДНК, яка доступна суспільству, політикам та засобам масової інформації.

7. ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ПРОВЕДЕННЯ ПЛР

1. Умови попередження контамінації

Контамінація зразків при проведенні полімеразно-ланцюгової реакції ДНК, об'єктом, який не походить від приматів, не впливає на результат дослідження. Однак, забір та дослідження зразків має попередити контамінацію людською ДНК.

Гумові рукавички мають використовуватися весь час роботи із зразком та мають замінюватися досить часто, особливо перед роботою з іншим зразком.

Зразки у пробірках мають бути закритими під час зберігання. Під час проведення дослідження, коли зразки знаходяться у пробірках, має бути виключена можливість утворення аерозолів. У зв'язку із цим, не можна пробірки із зразками активно трясти.

Під час проведення аналізу також має бути виключена можливість крос-контамінації, тобто, перенесення ДНК з одного зразка до іншого. Крос-контамінації запобігає використання кожен раз нових піпеток та нових рукавичок. Після розкриття пробірки та вилучення піпеткою проби вона має бути зразу ж закрита.

Ампліфікований зразок не має контактувати із неампліфікованим. Відомо, що у разі простої ампліфікації продукується ненормована кількість копій, більше, ніж 10^{13} . Така велика їх кількість потенційно може контамінувати зразки, які ще не ампліфіковані. Крім того, зважаючи на досить велику кількість копій, існує можливість їх простого перенесення навіть мінімальними об'ємами бризок або аерозолів. Наприклад, якщо піпетка переносить 0,1 мл рідини, то її повторне використання після забору вже ампліфікованої ДНК може внести в неампліфіковану ДНК досить значну кількість копій зразка для ампліфікації, яка детектується при дослідженні.

2. Екстракція ДНК

ДНК може бути виділена з будь-яких тканин чи рідин, в яких наявні клітини із ядром. Це, насамперед, з рідкої крові, кров'яних плям, сперми, волосся, тканин тіла людини, кісток, піднігтьового вмісту, тканин, які пройшли гістологічну фіксацію, цитологічних препаратів, а також з предметів, які контактували з рідинами тіла чи тканинами, та на яких наявні клітини, наприклад, з нашарувань на знаряддях злочину, з жувальних гумок тощо.

Однак, можливість проведення ДНК – дослідження обмежується не тільки наявністю у біологічному об'єкті самої ДНК та її станом, але й кількістю виділеної з нього ДНК, яка має бути ефективною для проведення ПЛР, станом ДНК, в якій або відсутня деградація, або вона слабо виражена, а також впливом інгібіторів ПЛР з предмету-носія біологічного зразка.

3. Ефективна кількість ДНК для ПЛР

Ефективна кількість ДНК для проведення ПЛР обумовлюється властивостями діагностичної панелі. Так, набори ТАПОТІЛІ дають

можливість отримувати результати при використанні не менш 5 нг ДНК із біологічного зразка за умов відсутності інгібіторів ПЛР.

В діагностичних панелях Applied Biosystems ефективною кількістю для проведення ПЛР вважається 0,5-1,25 нг виділеної з об'єкта ДНК в об'ємі 10 мкл для ПЛР.

Діагностичні панелі для ДНК аналізу Promega є оптимальними для 0,5- 1,0 нг ДНК. Крім того, за даними деяких авторів, повний профіль ДНК в досліджувальному форматі може бути отриманий навіть тоді, коли кількість ДНК становить 100 пг та менше.

Для встановлення ефективної кількості ДНК, яка має бути використана для ПЛР, необхідно враховувати формат проведення ПЛР – чи то монолокусний, чи мультилокусний. У випадку монолокусного формату проведення ПЛР необхідно мати значну кількість ДНК, оскільки для ампліфікації кожного локусу необхідно використовувати відповідну кількість виділеної ДНК для кожного наступного локусу.

Якщо ДНК деградована або об'єкт старий, то для проведення ПЛР необхідно використовувати більшу кількість ДНК.

Враховуючи наведене, перед проведенням ПЛР необхідно завжди визначати кількість виділеної ДНК із об'єкта і у разі її перебільшення над ефективною кількістю, проводити відповідне розбавлення проби таким чином, щоб в ПЛР було внесено саме ефективну кількість ДНК. Якщо ж виділена кількість ДНК є меншою, ніж ефективна кількість, рекомендують проводити „концентрацію проби” шляхом пропорційного зменшення об'ємів реактивів, які використовують під час ПЛР, ніж ті, що рекомендовані у керівництвах. При цьому, необхідно дотримуватися особливої точності при дозуванні.

При незначній кількості ДНК можливо звичайні 30—35 циклів ампліфікації доповнити додатковими 10-15 циклами ампліфікації після повторного додавання Таq-полімерази, або одномоментно проводити ПЛР впродовж 40-50 циклів.

У випадку пг кількості ДНК потребують оптимізації як кількість циклів ПЛР, так і умови детекції алелей.

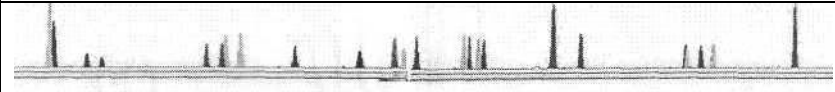


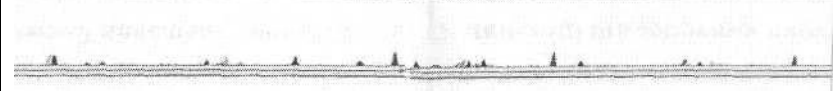
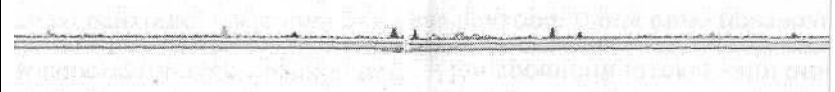

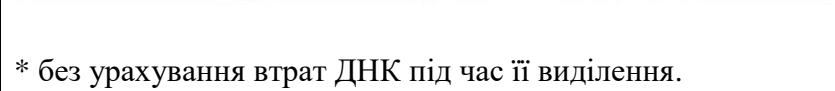
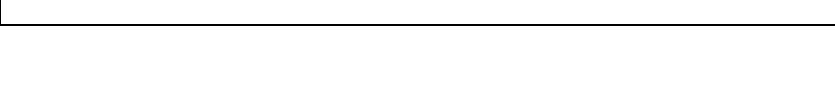
При визначенні кількості ДНК у зразку для аналізу доцільно керуватися відомими даними, а саме, 1 мкл крові містить близько 7000-8000 ядерних клітин (за умов нормальної їх кількості у крові), що вміщують приблизно 500 нг ДНК. Крім того, необхідно враховувати ще й втрати ДНК під час її виділення, які становлять до 20-30 % від її кількісного вмісту. 0,5 нг ДНК може міститися приблизно у 70 ядерних клітинах, що становить 0,01 мкл крові.

При виділенні ДНК із кісток необхідно враховувати, що для аналізу за одним локусом ДНК необхідно мати не менше, ніж 70 нг виділеної ДНК.

4. Чутливість ПЛР

Теоретично ДНК можна досліджувати навіть, якщо вона була виділена із однієї клітини. Однак, практично, для ПЛР необхідно декілька десятків клітин із ДНК-вмісними ядрами за умови, що формат проведення ПЛР є мультилокусним.

Згідно проведених досліджень Applied Biosystems при виконанні ПЛР в мультилокусному форматі повну локусну панель можна отримати, якщо наявно не менш, ніж з 10 ДНК-вмісних клітин, в яких наявно приблизно 70 пг ДНК. Однак, висота піків алелів локусів при розшифровці електрофореграм є мінімальною, у зв'язку із чим такі мінімальні піки алелів аналізувати необхідно вкрай обережно. Із збільшенням кількості клітин та ДНК, яку з них можна виділити, висота піків при розшифровці аналізу збільшується. При кількості ДНК не менш 500 пг, яку виділено із приблизно 70 клітин, отримують найбільш збалансовані між собою та прийнятні для ідентифікації за висотою піки алелів локусів ДНК. Показано, що при кількості ДНК, яка становить 10 пг, не виявляють окремі алелі локусів ДНК, які можна виявити при 10-кратному збільшенні ДНК для ПЛР (мал.4).

Електрофоретичний профіль локусів із виділеної ДНК	Кількість	
	ДНК, пг	Клітин*
	1000	185-216
	500	93-108
	250	46-54
	120	22-26
	60	10-11
	30	5-6
	15	3
	контроль	

* без урахування втрат ДНК під час її виділення.

Мал. 5. Співвідношення між локусами ДНК, її вмістом у зразку та кількістю клітин, з яких виділено ДНК. Кількість клітин розраховано для 6-7 пг ядерної ДНК

Встановлено, що оптимальними кількостями ДНК для ПЛР є 0,5-2 нг, які містяться приблизно у 70-290 соматичних клітинах, враховуючи втрати ДНК під час її виділення .

5. Вплив деградації ДНК

Використання STR локусів ДНК дозволяє проводити ПЛР при дослідженні деградованих зразків ДНК, чому сприяє переважно 4-х нуклеотидна структура STR. Однак, плануючи хід дослідження, завжди необхідно враховувати можливий негативний вплив деградації, яка обумовлена умовами та тривалістю зберігання зразків, впливом на об'єкт факторів зовнішнього середовища. Наявність деградації ДНК визначається при електрофорезі зразку.

В слідах, які утворенні трупною кров'ю, деградація ДНК вже наявна. Ступінь її деградації обумовлена ДНС. Деградація біологічних об'єктів, наприклад, крові чи тканин тіла, відбувається і при їх гнитті.

Перші ознаки деградації ДНК у плямах сухої крові, яка зберігається у звичайних умовах, виявляють вже через 3 місяці. В подальшому, ступінь деградації ДНК збільшується.

Досить швидко відбувається деградація ДНК, якщо кров зберігають у звичайних умовах в рідкому стані. У зв'язку з чим, вилучену рідку кров необхідно зразу ж переносити на марлю та висувувати.

Деградація ДНК не відбувається, якщо біологічний зразок зберігають у замороженому стані. Повторення циклів розморожування та заморожування біологічного зразка обумовлює деградацію ДНК.

Кісткові фрагменти можуть зберігатися у сухому вигляді в паперових пакетах при температурі 18-20 град впродовж до 3 –х років і ступінь деградації ДНК у такому разі є незначним.

У зв'язку із наведеним, перед проведенням ПЛР необхідно проводити визначення придатності виділеної ДНК для аналізу методом ПЛР. Якщо при електрофорезі виділена ДНК відповідає контрольній високомолекулярній ДНК, а її смуга не має шлейфу (або він незначний), то виділена ДНК є придатною для аналізу.

6. Вплив факторів, що інгібують ПЛР

ПЛР інгібується гематином, який присутній у разі недотримання процедури очищення ДНК після її екстракції. Інгібуючу властивість на ПЛР проявляють також барвники деяких тканин. Чим темніша тканина, тим більш

негативний її вплив на можливість дослідження ДНК. Це обумовлено фарбниками, які використовують для забарвлення текстильної тканини. Зокрема, наприклад, якщо кров знаходиться на джинсовій тканині синього кольору, то під час екстракції майже не вдається повністю позбутися самого барвника, що обумовлює інгібування ПЛР.

ПЛР буде інгібована, якщо під час виділення ДНК отримують водну забарвлену фазу, і яка не знебарвлюється під час обробки проби фенолом та хлороформом.

Однак, негативний вплив інгібіції ПЛР може бути мінімізований використанням найменших кількостей ДНК, приблизно 1 нг ДНК.

Р. Кривдою (2009) розроблено спосіб очищення „проблемних” об’єктів, що мають інгібітори. Автором запропоновано введення в аналітичну процедуру виділення ДНК додаткового етапу, який полягає в тому, що одержаний осад ДНК розчинюють у 5% суспензії іонообмінної смоли Chelex -100 з подальшою інкубацією впродовж 2 годин при температурі 60-65 град і кип’ятінням. Очищена таким чином ДНК зберігає здатність до ПЛР декілька місяців.

7. З’ясування наявності інгібіторів у пробі ДНК

Під час аналізу результатів проведеної ампліфікації ДНК на агарозному гелі можуть бути відсутніми ампліфіковані фрагменти, що може бути обумовлене неякісним очищенням ДНК від супутніх речовин, або впливом умов її екстрагування. У таких випадках проводять повторну ампліфікацію із зміненими умовами її проведення, додатковою очисткою ДНК або зміною умов її виділення. Однак, найчастіше відсутність ампліфікованих фрагментів у зразках ДНК, які досліджують, обумовлюється впливом речовин, які інгібують перебіг реакції.

Наявність або відсутність речовин, які інгібують ПЛР, з’ясовують шляхом проведення відповідної реакції ампліфікації з використанням тесту на інгібітори. На кожну пробу ДНК, яку досліджують, проводять тест на наявність інгібіторів. Для цього готують спеціальний PCR Master Mix. Паралельно проводять також «позитивний» та «негативний» контролю реакції ампліфікації. Тобто, для з’ясування наявності інгібіторів у одному досліджувальному зразку ДНК проводять 4 реакції ампліфікації, а саме, для зразку, який досліджують, для теста на інгібітори у цьому зразку, для «позитивного» контролю, та для «негативного» контролю реакції.

Оцінюють результат після горизонтального електрофорезу у 2% агарозному гелі. Якщо у пробі тесту на інгібітори відсутні ампліфіковані фрагменти ДНК, то у досліджувальному зразку наявні інгібітори. Якщо

фрагменти ампліфікованої ДНК будуть наявні у досліджувальному зразку, то це вказує на відсутність у ньому інгібіторів. Крім того, менша інтенсивність смуг на електрофореграмі досліджувального зразку порівняно із позитивним контролем, також може свідчити про наявність інгібіторів.

8. Особливості екстракції ДНК із зразків

Для екстракції ДНК з різних об'єктів використовують або фенол-хлороформний метод або проводять її за допомогою іонообмінної смоли Chelex-100.

Фенол-хлороформний метод видаляє майже всі протеїни та інші клітинні компоненти з нуклеїнових кислот, що дозволяє отримати відносно очищені зразки ДНК. Цей метод рекомендується для екстракції ДНК з відносно великих зразків, якщо кількість ДНК у зразку більше ніж 100 нг.

На відміну від фенол-хлороформного методу проведення екстракції з використанням іонообмінної смоли Chelex-100 є доцільним, коли в досліджувальному зразку кількість білка невелика, його клітини легко лізуються, а об'єкт тривало не зберігався. При такій екстракції отримують ДНК із невисоким ступенем очистки. Іонообмінну смолу Chelex-100 використовують для екстракції ДНК із крові, сперми, слину, а також із волосся, лупи. Вважають, що неприпустимо таким методом виділяти ДНК із зафіксованої чи гемолізованої крові, із біологічних об'єктів, які розташовані на предметах-носіях, що мають інгібітори ПЛР (барвники, гумінові кислоти), із м'язової чи кісткової тканини. Однак, дослідження Р.Г. Кривди показали можливість проведення екстракції ДНК із кісток з використанням іонообмінної смоли Chelex-100, і значення має не реактив, який використовують, а метод попередньої обробки кісток.

Зараз розроблені методи екстракції ДНК, що базуються на використанні абсорбуючих речовин. При цьому, із екстракту видаляють на абсорбенті саме ДНК, яку потім піддають елюції. В результаті отримують високо очищену ДНК, яка не має інгібіторів ПЛР. Такою екстракцією може бути виділена ДНК із крові, плям крові, сперми, плям сперми, жувальної гумки, волосся, кісток, сечі, сигаретних кінців, букальних мазків, біологічних тканин, фіксованих у формаліні та з гістологічних зрізів у парафіні.

9. Оцінка чистоти виділених зразків ДНК

Для з'ясування чистоти зразків ДНК, які були виділені із досліджувальної проби, визначають показники абсорбції розчинів. При цьому, показники А320 та А410 мають бути меншими за 0,05 од абсорбції, що вказує на відсутність у зразку часточок гему або інших домішок.

Чистоту виділених зразків ДНК визначають за співвідношенням A260/A280. Якщо показник складає більш, ніж 1,7, то у зразку майже немає забруднюючих білків та інших макромолекул.

10. Особливості проведення концентрації ДНК

Концентрація ДНК з використанням Centricon-100 рекомендується для біологічних зразків, які вміщують менш ніж 500 нг ДНК. Якщо зразок-речовий доказ, який досліджують, вміщує більшу кількість ДНК, то виділена із зразків ДНК може бути концентрована етанольною преципітацією.

11. Критерії ефективності виділення ДНК із біологічного зразка

Перед проведенням ПЛР необхідно впевнитися, що виділена ДНК придатна для подальшої ПЛР. Критеріями, які обумовлюють використання виділеної ДНК для подальшої ПЛР є:

- кількість виділеної ДНК, яка має бути достатньою.
- ступінь лізису тканин і клітин.
- ступінь деградації ДНК.

12. Визначення кількості виділеної ДНК

Кількість виділеної ДНК визначають шляхом порівняння з еталонною високомолекулярною ДНК, яку розводять у межах 1-500 нг/мкл. При цьому, проводять електрофорез в агарозному гелі і після проявлення порівнюють інтенсивність смуг виділеної ДНК та еталонної. Чутливість такого аналізу становить 10 нг ДНК. Однак, цим методом не можливо розрізнити ДНК людського походження із ДНК бактерій. Це може обумовити внесення в реакційну суміш для ПЛР меншої кількості ДНК, ніж ефективна.

Одночасно при визначенні кількості ДНК з'ясовують наявність її деградації. Якщо деградації ДНК немає, то виявляють чітку смугу, яка розташовується вище фрагментів з довжиною 2000 п.н. У випадку наявності деградації ДНК виявляють шлейф із її фрагментів ДНК різної довжини, що проявляється нечіткими межами смуги вище та нижче основної смуги.

Кількість виділеної ДНК можливо також визначити полімеразно-ланцюговою реакцією в реальному часі (RT-PCR). За отриманими показниками кількості ДНК після кожного циклу ампліфікації будують кінетичну криву, за якою і встановлюють відносну концентрацію досліджуваних проб ДНК.

Якщо у досліджувальних пробах концентрацію ДНК визначити не можливо, то це означає, що вміст ДНК у досліджувальному зразку є нижчим за поріг чутливості методу (< 0,068-0,023 нг/мл) або ДНК відсутня взагалі.

Якщо у пробі концентрація ДНК визначена в межах 50,0-0,068 нг/мл, то отримані результати вважаються вірогідними, тобто, вміст ДНК відповідає визначеному рівню.

У випадку, коли у пробі концентрація ДНК перевищує 50,0 нг/мл, то це вказує на наявність значної кількості ДНК і точну її концентрацію можливо визначити після розведення проби та проведення повторного аналізу.

Існує також флюорометричний метод визначення концентрації ДНК у розчині. Сутність методу полягає у тому, що за умов наявності ДНК відбувається зміна параметрів флюоресценції бісбензimidу, який зв'язується тільки із дволанцюговою ДНК. Це дозволяє вимірювати концентрацію ДНК навіть у присутності білка та РНК. Інтенсивність флюоресценції утвореного між ДНК та барвником продукту пропорційна концентрації ДНК.

Ступінь лізису тканин і клітин визначається при мікроскопічному дослідженні на етапі виділення ДНК із об'єкта дослідження.

13. Особливості використання локусів для ПЛР

При STR аналізі важливо отримати низку локусних характеристик. Якщо кількість об'єкта достатня, а його стан з точки зору деградації ДНК задовільний, то дослідження проводять із використанням триплексів, наприклад, у випадку спірного батьківства.

Якщо ж кількість ДНК незначна та/або вона деградована, чи об'єкт піддавався негативному впливу факторів зовнішнього середовища, то дослідження починають із монолокусних систем.

У випадку мультилокусного формату проведення ПЛР одночасно аналізують низку локусів ДНК, які розрізняють за флуоресцентною міткою.

14. Використання контролів при проведенні ПЛР

Під час проведення досліджень ДНК, особливо із судово-медичною метою, має бути впевненість про відсутність будь-яких сторонніх ДНК. Тому ПЛР потребує обов'язкового використання декількох контролів, а саме, під час ПЛР мають обов'язково бути:

- Негативний контроль, за допомогою якого з'ясовують відсутність контамінації реактивів сторонньою ДНК. В реакційній суміші наявні всі компоненти за виключенням ДНК.
- Позитивний контроль, в якості якого використовують контрольну ДНК, яка входить до складу діагностичної панелі. Один позитивний контроль має вміщувати максимальну кількість послідовностей-мішеней, інший – незначну їх кількість. Це дозволяє визначити чутливість та ефективність ПЛР. Таким чином, необхідно використовувати не тільки ту високомолекулярну ДНК, яка наявна у діагностичних панелях, але ще й деградовані її зразки.
- Алельний леддер, за допомогою якого визначають наявність відповідних алелів у досліджуваних локусах ДНК.

15. Відсутність ампліфікації у досліджувальному зразку

Після проведеної ПЛР та електрофорезу може бути з'ясовано відсутність ампліфікації у зразку. Це може бути пов'язане із інгібіцією фермента, який використовується під час ПЛР, сильною деградацією ДНК у зразку, незначною кількістю об'єкта для дослідження та ДНК у ньому. В такому разі проводять повторну ампліфікацію із збільшеною та зменшеною кількістю ДНК-матриці або при збільшенні концентрації ДНК-полімерази, збільшують кількість циклів ПЛР для отримання необхідної для детекції кількості фрагментів ДНК. Однак, перед проведенням ПЛР доцільно з'ясувати кількісний вміст ДНК у зразку та стан самої ДНК, і після цього планувати хід подальших досліджень.

8. ВИЯВЛЕННЯ СЛІДІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ ВІД ЛЮДИНИ

Під час проведення огляду місця події однією із функцій спеціаліста в галузі судово-медичної експертизи є пошук, опис та вилучення речових доказів біологічного походження.

Найчастіше під час огляду місця події можуть бути виявлені **сліди крові**. Вони можуть бути представлені у різному вигляді, а саме: у вигляді калюж, плям від крапель або від бризок, патьоків, помарок (мазків або відбитків), просякувань. За зовнішнім виглядом сліди крові можуть мати червоний, брунатний або зеленкуватий колір, якщо вони давні. При їх опроміненні ультрафіолетовим світлом свіжі сліди крові мають темно-брунатний колір, а давні – померанчово-червоний.

Іноді для виявлення слідів крові потрібне використання приладів і реактивів. Для цього можуть бути використані проби з перекисом водню, хромогенним субстратом, наприклад, бензидиновим реактивом або розчином люмінолу.

В затемненому приміщенні сліди крові іноді виявляють за допомогою ультрафіолетового випромінювання від переносного люмінесцентного освітлювача, під дією променів якого сліди крові флуоресцюють і мають “оксамитовий” вигляд. Проте іржа, анілін тощо також мають ці властивості.

Виявлення слідів сперми *проводять орієнтовними методами, які допомагають експерту виявити найбільш перспективні для подальшого дослідження сліди.* Спочатку предмети *оглядають візуально* та встановлюють ділянки крохмальної щільності, що мають звивисті краї та сіруватий колір. На темних тканинах вони мають білуватий колір, на світлих — сірий з жовтим або брунатним відтінком. Надалі їх досліджують в затемненому приміщенні в променях *ртутно-кварцевого освітлювача, який є*

джерелом ультрафіолетових променів, виявляючи При цьому, білувато-блакитні ділянки, які характерні для слідів, що мають білок, в тому числі і сперми. Виявлені ділянки обшивають контрастною ниткою та саме ці ділянки і підлягають лабораторному дослідженню.

Плями слини на місці події звичайно є на недопалках сигарет. Внаслідок того, що слина може містити групові антигени АВО, епітеліальні клітини, то їх дослідження дозволяє встановити групу крові курця і з'ясувати, одній чи кільком особам належать недопалки. У разі наявності клітин у слині можна використати дослідження ДНК. З місця події предметності слини потрібно вилучати лише пінцетом, якщо вони вологі, слід висушити при кімнатній температурі. Кожний недопалок вміщують в окремий конверт. Слина може виявлятися на кляпах, якими закривали жертві рота. Об'єктом дослідження є також анонімні листи, на клапанах конвертів і марках яких можуть бути виявлені сліди слини. Сліди слини виє також на залишках їжі.

Сліди поту є об'єктом дослідження у випадках, коли виникає потреба встановлення належності одягу, взуття, гребінців тощо певній особі шляхом дослідження пото-жирових виділень, в яких можуть бути групові антигени системи АВО, а в деяких випадках можуть бути наявні і клітини з ядрами. Крім того, за відбитками пальців рук проводиться надзвичайно важливе дактилоскопічне дослідження, результати якого дозволяють установити особу, яка їх залишила.

Волосся часто є речовим доказом у кримінальних справах при розслідуванні вбивств, крадіжок, дорожньо-транспортних пригод, статевих злочинів. Нерідко волосся можна виявити на руках трупа, знаряддях травми, одязі, тілі потерпілих і звинувачуваних тощо.

Виявлення волосся на місці події не становить значних труднощів, проте потребує достатнього освітлення і огляду за допомогою лупи. Всі схожі на волосся об'єкти вилучають пальцями або пінцетом із гумовим наконечником, щоб їх не пошкодити. Волосся, виявлене в різних місцях, вміщують в окремі пакети, які нумерують і вказують, де воно було знайдене, його кількість, колір, довжину, забрудненість тощо. Для дослідження потрібно направляти якомога більше волосся, тому що в разі незначної його кількості, зменшується можливість визначити його відповідність волоссю певної особи.

Частини тканин і органів, як правило, вилучають із різних транспортних засобів, знаряддях травми та інших предметів, які виявляють на місці події, а також із піднігтьового вмісту трупа або підозрюваних у скоєнні злочину осіб.

Частини тканин, які виявляють на невеликих знаряддях травми, як правило, направляють разом з ними. На громіздких предметах частинки тканин вилучають шпателем і у висушеному вигляді направляють для подальшого дослідження.

9. ВИЛУЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКІВ ДЛЯ СУДОВО-МЕДИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Після опису речового доказу, наприклад, крові, проводять вилучення зразку. Під час цієї процедури особливо ретельно необхідно дотримуватися принципу попередження контамінації зразків як сторонньою ДНК, так ДНК з різних зразків одного і того ж самого речового доказу. У зв'язку із цим, спеціаліст в галузі судово-медичної експертизи, який приймає участь в огляді місця події, має передбачити можливість та необхідність подальшого ДНК аналізу речових доказів біологічного походження та вжити заходів для попередження контамінації.

Зокрема, описуючи і вилучаючи речовий доказ, необхідно використовувати печатки. Якщо ж на ньому декілька ділянок із біологічними нашаруваннями, які в подальшому можуть бути об'єктом генотипоскопічного дослідження, то такі ділянки необхідно відокремити одна від одної такими чином, щоб вони між собою не контактували. Для цього найдоцільніше використовувати спеціальну захисну плівку PROSTIR®.

Вилучаючи речовий доказ біологічного походження, необхідно дотримуватись таких вимог:

1. Якщо зразок речового доказу, наприклад, крові, можливо вилучити з предметом-носієм, на якому він розташований, то такий слід крові вилучають разом з його носієм.

2. Якщо зразок речового доказу вилучити з предметом-носієм неможливо, то його вилучають шляхом зіскрібання лезом з поверхні, на якій він розташований, або шляхом змивів, протираючи досліджувальну поверхню ватно-марлевым тампоном, змоченим дистильованою водою.

3. Якщо речовий доказ біологічного походження розташований на біологічному зразку або на зразку, що має біологічні складові, наприклад, на дереві, ґрунті, то вилучають зразок носія з речовим доказом та зразок носія без речового доказу для контролю.

4. Якщо речовий доказ розташований на носії, який може змінити свій агрегатний стан, наприклад, сніг, лід, то зразок носія з речовим доказом розміщують у лійці, на дні якої є складена в декілька шарів марля,

розтоплюють носій (сніг або лід) при кімнатній температурі, внаслідок чого на марлі залишаються сліди речового доказу.

5. Вилучати пото-жирові відбитки на липку стрічку для подальшого молекулярно-генетичного аналізу не можна.

6. Всі вологі речові докази біологічного походження підлягають попередньому висушуванню за умов відсутності прямої дії тепла та сонячного світла, оскільки вологі біологічні субстрати швидко загнивають, що робить їх непридатними для проведення експертизи. Висушувати об'єкти потрібно при кімнатній температурі, а не в сонячному промінні і не біля джерел тепла. Під час висушування речового доказу необхідно також дотримуватися принципу попередження контамінації.

7. Кожний вилучений предмет упаковують окремо так, щоб не пошкодити сліди під час перевезення. Всі упаковані окремо предмети вміщують в загальну тару та запечатують печаткою слідчого. На загальному пакеті зазначають, які предмети, коли, за якою справою вилучені.

Разом із речовими доказами в імунологічне або цитологічне відділення бюро судово-медичної експертизи направляють постанову про призначення експертизи, в якій наведені обставини справи, а також перелічені питання, які потрібно розв'язати. До постанови додають протокол огляду місця події та (або) протокол вилучення речових доказів.

10. ОБ'ЄКТИ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ПОПЕРЕДНЯ ОБРОБКА

Найдоцільніше для ДНК-аналізу плями крові готувати безпосередньо після вилучення (забору) крові, оскільки при зберіганні крові у рідкому стані швидко відбувається деградація ДНК.

Рідку кров збирають у кількості 5-10 мл у пробірку з ЕДТА, або з кислотою цитратною декстрозою, або з гепарином (Applied Biosystems). Для цього доцільно використовувати стандартні системи-пробірки. Об'ємне співвідношення між антикоагулянтом ЕДТА, цитратом натрію має бути 1:10. Зразки такої крові можуть зберігатися у холодильнику впродовж до одного місяця.

Рідка кров може бути перенесена у вигляді плями на автоклавовану бавовняну тканину, висушена при кімнатній температурі та може зберігатися при цій температурі не більше 3-х місяців без явних ознак деградації ДНК. Для цього на аптечний стерильний бинт, який згорнуто у 4-8 шарів та поміщено у чашку Петрі, наносять декілька мл (1-4) рідкої крові, формуючи

пляму діаметром 3-4 см. Такі зразки висушують і можуть незначний час тримати в окремих паперових конвертах при кімнатній температурі, а в подальшому такий зразок потребує зберігання в умовах морозильної камери.

При підготовці плями для екстрагування з неї ДНК необхідно вирізати її фрагмент та проводити попереднє її розмочування з використанням спеціально призначеного для цього обладнання з розкачувальним режимом, який забезпечує ефективне просякування плями екстрагуючою рідиною.

Кісткові залишки. Дослідження кісток проводять у випадку неможливості аналізу інших тканин, наприклад, при екстумації трупа, спалюванні трупа, обробці черепа киплячою водою тощо. Для наступного ДНК-дослідження попередньо із кістки видаляють різні сторонні нашарування та залишки м'яких тканин та кісткового мозку в діафізах трубчастих кісток. Пилкою відпилюють від довгої трубчастої кістки фрагмент завдовжки 10-15 см, який миють розчином детергенту та висушують. Надалі об'єкт стерилізують високо реактивною сполукою для руйнації ДНК із зовнішніх джерел. Висушений об'єкт зберігається для подальшого ДНК-дослідження.

Для дослідження ДНК у **кістках** необхідно використовувати губчасту речовину плоских кісток, в якій кількість ДНК втричі більша, ніж, наприклад, у діафізі стегнової кістки. Найефективнішим у якісному та кількісному відношенні способом руйнування кісткової тканини є розтирання кісткового порошку з абразивом.

Вихід ДНК із кісток залежить від ДНС. Так, його вміст із 100 мг стегнової кістки становив через 76 год після смерті — 6 мкг, через 123 год - 0,1-1,5 мкг.

Для проведення ПЛР у мультилокусному форматі з аналізом 14 гіперваріабельних локусів необхідно мати не менше, ніж 23 мг кісткового порошку (Кривда Р., 2009).

Сліди слини, які були виявлені на недопалках, поштових конвертах, різному посуді, на одязі, на шматках тканини у разі їх використання як кляпа потребують поділу на дві частини разом із предметом-носієм. Одну частину використовують для цитологічного дослідження, а іншу – для генотипоскопічного, для чого проводять подрібнення цієї частини предмета-носія із слідом слини та наступну екстракцію.

Волосся. Для виділення ДНК із волосся використовують його кореневу частину, тому що саме циліндричні клітини кутикули нижньої частини кореня й клітини серцевини кореня мають ядра. Спочатку волосся обробляють ксилолом, абсолютним етиловим спиртом і деіонізованою водою для очищення від поверхневих забруднень і контамінантів з наступним

висушуванням на повітрі. Стерильним скальпелем відрізають частину волосся довжиною 1 мм з кореневого кінця разом з цибулиною. Суміжна частина волосини служить контролем. Відрізана порція волосся підлягає наступному екстрагуванню.

ДНК може бути досліджена із **відбитків та змивів** зі статевих органів. Змиви, які представлені в рідкому вигляді, підлягають подальшій процедурі виділення з них ДНК. Якщо змиви були адсорбовані шматочком стерильної марлі, змоченої ізотонічним розчином хлориду натрію, і потім висушені, то на ДНК-дослідження направляють саме цю марлю, яка підлягає екстрагуванню.

Для вилучення **букального епітелію** попередньо ротову порожнину прополіскують 2-3 рази водою і через 3-5 хвилин починають вилучати булакальний епітелій. Для цього аптечною ватною паличкою з нажимом протирають внутрішню поверхню обох щік впродовж 15-30 сек. Це призводить до отримання достатньої кількості булакальних клітин слизової оболонки ротової порожнини. Надалі ватну паличку просушують та вмішують у сухому вигляді у пластикові пробірки, які можуть зберігатися деякий час при +4 град С у холодильнику.

Знайдену на місці події **використану жувальну гумку** переносять у 2 мл пластикову пробірку, та проводять її екстрагування, заливаючи 1,5 мл бідистильованої води й інкубуючи впродовж 1 доби при температурі 4 °С, постійно погойдуючи пробірку. Потім жувальну гумку обережно видаляють з пробірки, а розчин, що залишився в пробірці, центрифугують при 10 000-16 000 об/хв для отримання клітинного осаду, із якого надалі і виділяють ДНК.

Для ДНК-дослідження **піднігтьового вмісту рук** нігтьові зрізи, після їх огляду під стереомікроскопом, кладуть до пробірки (пробірок), заливають дистильованою водою та витримують 18-24 години в холодильнику. Потім нігтьові зрізи видаляють, а вміст пробірок центрифугують при 1500 об/хв упродовж 5 хвилин. Надосадову рідину використовують для визначення наявності крові, виду білка та групи крові, а осад, який залишився в пробірках, збовтують у 2-4 краплях фізіологічного розчину, переносять на нитки стерильної марлі або у вигляді краплі на предметне скло, потім висушують, упаковують та опечатують. Саме цей матеріал і використовується для ДНК-аналізу.

Для ДНК-дослідження може бути наданий цитологічний матеріал після проведення його судово-цитологічного дослідження.

Попередня обробка цитологічного матеріалу для подальшого ДНК-дослідження полягає у наступному:

- а) при наявності мікронакладень біологічних об'єктів на знаряддях травми Використовують частину зіскобу або змиву.
- б) при наявності недопалків сигарет використовують частину фільтра сигарети або цигаркового паперу, на якому при огляді в ультрафіолетових променях відмічалось наявність слину у вигляді блакитного світіння.
- в) при можливій наявності піхвового епітелію на одязі підозрюваного у згвалтуванні, досліджується частина підозрілої плями.
- г) при дослідженні змиву зі статевого члена підозрюваної особи використовують частину матеріалу, на який робили змив.
- д) якщо необхідно визначити ДНК на мазках-відбитках зі статевого члена, то попередньо вміст мазків-відбитків із предметних стекол переносять на марлю, яку висушують та використовують для подальшого дослідження. Крім того, матеріал з мазків-відбитків можна безпосередньо перенести шляхом змивання дистильованою водою у пробірку, матеріал з якої в подальшому і аналізують.

Якщо для дослідження надійшли **тканини та фрагменти органів**, то необхідно невідкладно виділити з них ДНК та перевірити її якісний та кількісний склад. Якщо стан ДНК задовільний, то частину тканин, яка залишилась, необхідно заморозити. У разі необхідності, коли характеристики ДНК сумнівні, то проводять повторне виділення ДНК, після чого залишки тканин заморожують.

Транспортувати тканини для ДНК аналізу необхідно у замороженому стані. Розморжування негативно впливає на ДНК.

Якщо необхідно виділити ДНК із **забарвлених архівних гістологічних чи цитологічних препаратів, або із мазків, забарвлених по Папаниколау**, то препарат зішкрібають з предметного скла та обробляють таким чином, як і висушену депарафіновану тканину. При цьому, утворюється велика кількість фрагментів тканини.

Використання тканин, які пройшли гістологічну фіксацію. Для ДНК-досліджень можуть бути використані тканини, які попередньо пройшли фіксацію у 10% забуференому формаліні, етанолі або ацетоні та залиті у парафінові блоки.

Фіксація біологічної тканини (шматочки внутрішніх органів та тканин) не в 10 % забуференому формаліні, обробка тканин кислими розчинами або гнильні зміни зразка обумовлюють неможливість проведення ДНК-дослідження.

Дослідження, які проведені М. Falconi та співавт. (2007), показали, що суміш 4% розчину параформальдегіду/0,1% розчину глютардегіду є найкращою не тільки для збереження морфології тканин і клітин для

електронної мікроскопії, але й для подальшої екстракції ДНК, проведення гібридизації *in situ*, оскільки такий розчин незначно впливає на організацію хроматину у ядрі.

З'ясування наявності ДНК із екстрактів клітин, які були зафіксовані впродовж 1 год показало, що найкраще ДНК виявлялася в клітинах, які були зафіксовані розчином оцтової кислоти/метанолом (1:3), в той час як при фіксації культури клітин сумішшю 4% параформальдегід/0,5% глутаральдегід ДНК не виявлялася взагалі. При фіксації культури клітин впродовж 4 годин було виявлено значне зменшення вмісту ДНК при фіксації розчинами 10% нейтрального забуференого формаліну, 4% параформальдегіда, 1% глутардегіду, а після фіксації 4% параформальдегіда/0,5% глутардегіду та 4% параформальдегіду/0,1% глутардегіду ДНК взагалі не виявлялася.

Обробка тканин середовищами, які мають кислі значення рН, призводить до деградації ДНК, оскільки при рН 1-2 відбувається деструкція ДНК.

Тривалість фіксації тканин у 10% забуференому формаліні не може перебільшувати 3 доби. Після заливки тканини у парафін стабільність ДНК підвищується, але повільна її деградація все ж таки відбувається. Тому, ампліфікація ДНК із досить старих зразків (більше 10 років) може бути з меншою ефективністю.

Зрізи тканин з парафінового блоку товщиною 5-10 мкм на площині до 1-3 см² вміщують у мікроцентрифужну пробірку.

Якщо площа зрізу до 1-2 мм² (біоптати), то використовують декілька зрізів, наприклад, 1-3. У випадку більшої площі зрізів - більше 2 мм², то використовують, зазвичай, 1 зріз.

Парафін із зрізів видаляють звичайною депарафінізацією ксилолом або октаном. Парафін впродовж 2 хв розчиняється, а тканину збирають центрифугуванням при 12000 об впродовж 5 хв. В подальшому працюють із осадом, в який додають 1 мл 95% етанолу та струшують. Центрифугують, а супернатант видаляють. Таку процедуру із додаванням етанолу повторюють ще раз. Отриману тканину висушують в ексикаторі або вакуумному концентраторі і в подальшому її використовують для виділення ДНК.

Висушену біологічну тканину – зріз після їх депарафінізації можна зберігати при кімнатній температурі впродовж декількох тижнів.

При роботі із **невеликими зрізами** ампліфікацію ДНК необхідно проводити безпосередньо після депарафінування зрізів. При цьому, до тканини, яку депарафінували, додають 50 мкл стерильної дистильованої води. Пробірку закривають та впродовж 7 хв вона перебуває на киплячій

водняній бані, після чого її охолоджують. Додають 50 мкл ампліфікаційної суміші, тканину подрібнюють кінчиком мікропіпетки для забезпечення доступу реактивів до ДНК. Надалі проводять саму ампліфікацію у термоциклері.

Якщо працюють із великими гістологічними зрізами, то до висушеної тканини додають 50 мкл буферу, 1 мкл протеїнази К. Тканину подрібнюють кінчиком мікропіпетки, інкубують при 37 град С впродовж ночі або при 50 град С впродовж 3 годин. Надалі зразок встряхують 30 сек на Vortex та кип'ятять 7 хв для інактивації протеїнази.

Пробу центрифугують при 12000 G 5 хвилин, супернатант видаляють і проводять у ньому ПЛР.

Якщо зразок невеликий, то краще ампліфікувати його повністю. Якщо ж зріз великий, то для ампліфікації достатньо 1/10-1/50 матеріалу. Кількість виділеної ДНК та ступінь її деградації визначають при електрофорезі 5-10 мкл розчину ДНК.

Для ампліфікації найкраще використовувати розмір послідовностей – мішеней, що не перевищує 200 п.н. Оптимальною являється довжина менше 100 п.н.

Якщо необхідно дослідити невеликі чи слабо насичені плями, змиви з твердих предметів, то можливо проведення прямої ампліфікації ДНК без її виділення. Для цього вирізають квадрат розміром 2x2 мм, обробляють його метанолом 15 хв, який потім видаляють і зразок висушують. У пробірку із цим зразком додають компоненти ампліфікаційної суміші, крім Таq-полімерази, охолоджують до кімнатної температури, конденсат осаджують центрифугуванням, додають 2,5 од Таq-полімерази, нашаровують 20 мкл мінеральної олії та проводять ампліфікацію з урахуванням вимог для відповідної пари праймерів.

В деяких випадках можливо рідку кров або букальний епітелій переносити на FTA® папір з наступним висушуванням. Цей папір було розроблено у 80-х роках Burgoyne та Fowler з Фліндерського університету в Австралії як засіб для захисту зразків нуклеїнових кислот від деградації нуклеазами та іншими факторами. Папір має основу, хелатуючий агент, детергент або аніонний сурфактант та урат. Зразки, які вміщують ДНК, можуть бути перенесені на цей папір для збереження.

Надалі цю пляму, де розташовується зразок, вирізають за її контурами (7 мм) та вміщують у пробірку. У пробірці багаторазово обробляють екстракційним буфером, видаляють супернатант, і у цю пробірку з наявним об'єктом на папері додають реагенти для ПЛР та проводять саму ПЛР. При

цьому, кількість ДНК не визначають. Таку методику застосовують для одноманітних зразків.

Виділення ДНК за технологією BloodPrep. Зараз розроблено досить швидкісну технологію виділення ДНК із свіжої із стандартними антикоагулянтами (цитратом, ЕДТА, гепарином) чи замороженої крові, клітин або букальних зішкрябів. Процес виділення триває всього 1 годину, а виділена ДНК є високомолекулярною та вільною від інгібіторів ПЛР (табл.1).

Таблиця 1

Регламент виділення ДНК за технологією BloodPrep

Рідка кров, до 150 мкл	Клітини, букальні зішкряби
Додають протеїназу К та екстрагуючий буфер BloodPrep	-
Інкубація при 58 град С впродовж 10 хвилин. Отримують лізат, в якому відбулася деградація білків.	-
До лізату додають BloodPrep розчин для виділення ДНК	Безпосередньо до клітин або зішкрябу додають BloodPrep розчин для виділення ДНК , внаслідок чого відбувається лізис клітин
Лізат пропускають через скловолоконну мембрану в ячійці 96-лункової планшети для виділення ДНК під вакуумом. Відбувається зв'язування ДНК із мембраною	
Мембрану із ДНК промивають для видалення забруднень	
Елюція ДНК при кімнатній температурі. Виділяється ДНК з великою молекулярною масою (більше 50 кб) з мінімальним вмістом деградованих ДНК - фрагментів	

Така технологія виділення ДНК дозволяє виділити більше 70% ДНК із аліквоти крові та більше 90% ДНК із ядровмісних клітин крові. Із 150 мкл крові вихід ДНК складає від 2 до 8 мкг (в середньому, при нормальних показниках вмісту лейкоцитів). В діапазоні від 10 до 10х6 клітин вихід ДНК знаходиться у лінійній залежності від кількості клітин. На вихід ДНК впливають умови зберігання рідкої крові.

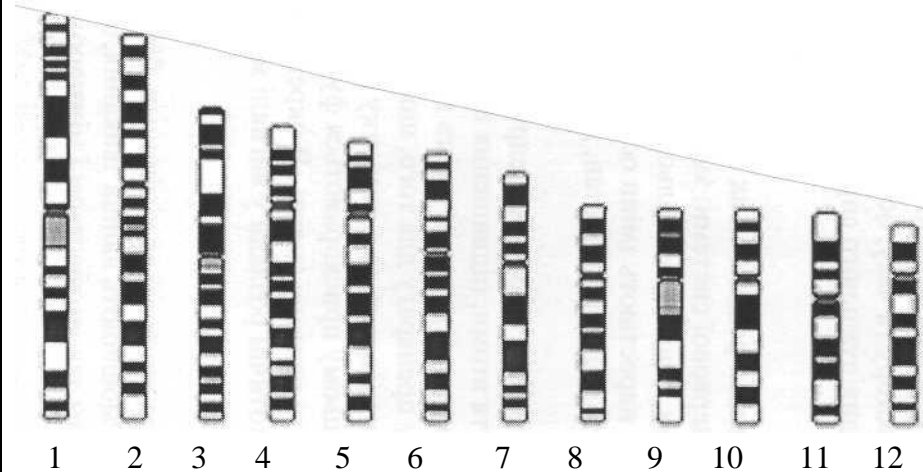
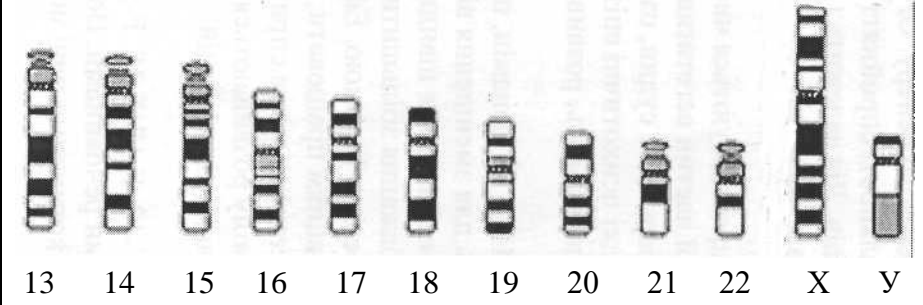
11. ЗБЕРІГАННЯ ВИДІЛЕНОЇ ДНК

Виділену фенольним методом ДНК можна зберігати тривалий час (роки). В таких умовах ДНК не має ознак деградації. При цьому виділена ДНК має бути добре очищеною, а самий розчин з виділеною ДНК необхідно зберігати в умовах морозильної камери (-18 град С).

ДНК, яка виділена з використанням іонообмінної смоли Chelex-100, має меншу стійкість під час зберігання.

12. ДОБІР ЛОКУСНОЇ ПАНЕЛІ ДНК

Локуси ДНК асоційовані із відповідними хромосомами. Аутосомальні локуси пов'язані із аутосомальними хромосомами, а статеві хромосоми мають також свої локуси ДНК, які використовують для судово-медичної ідентифікації (мал. 5).

ХРОМОСОМИ		
Сегментація хромосом на локуси	№	Діагностичний STR локус
	1	D1S1656,
	2	TROX, D2S441, D2S1338
	3	D3S1358
	4	FGA
	5	D5S818, CSF1PO
	6	SE33, D6S1043,
	7	D7S820
	8	D8S1179
	9	
	10	D10S1248
	11	TH01
	12	VWA, D12S391, D13S317
	13	
	14	
	15	
	16	
	17	
	18	
	19	
	20	
	21	
	22	
X		
Y		
Аутосомальні	Статеві	
	16	D16S539
	17	
	18	D18S51
	19	D19S433
	20	
	21	D21S11, Penta D
	22	D22S1045
	X	AMEL
	Y	AMEL

Мал. 6. Структура хромосоми та розташування діагностичних локусів

В багатьох країнах законодавчо закріплені стандарти – локусні панелі ДНК, які використовуються з судово-медичною метою при виконанні молекулярно-генетичних експертиз. Так, у США - це система CODIS – (Combined DNA Indexing System), до якої входить 13 мікросателітних локусів ДНК. В Європі ENFSI (European Network of Forensic Sciences

Institutes) спочатку було рекомендовано використання 7 мікросателітних локусів, потім їх доповнили ще 5 додатковими (European Standard Set of Loci), і в 2009 р. всі вони були затверджені Council of the European Union. Локусна панель Interpol має також ж локуси, як і в European Standard Set of Loci з додаванням локусу Amelogenin, а в Латинській Америці GITAG (Grupo Iberoamericano de Trabajo en Analisis de DNA) рекомендовано 6 мікросателітних локусів ДНК.

За аналізом, проведеним ENFSI, серед 43 європейських країн система CODIS використовується у 22 країнах, свої діагностичні панельні системи використовують 12 країн, а для 9 країн, серед яких і Україна, дані невідомі. Діагностичні панелі для ДНК досліджень наведені у табл. 2.

Таблиця 2

**ПЕРЕЛІК ЛОКУСІВ
В ДІАГНОСТИЧНИХ ДНК СТАНДАРТНИХ ПАНЕЛЯХ**

№	Європейська стандартна панель локусів ДНК (European Standard Set of Loci)	Локусна панель ДНК Interpol	Локусна панель CODIS
	13 локусів	8 локусів	14 локусів
1	D1S1656		
2	D2S441		
3	D3S1358	D3S1358	D3S1358
4			D5S818
5			D7S820
6	D8S1179	D8S1179	D8S1179
7	D10S1248		
8	D12S391		
9			D13S317
10			D16S539
11	D18S51	D18S51	D18S51
12	D21S11	D21S11	D21S11
13	D22S1045		
14	FGA	FGA	FGA

15	TH01	TH01	TH01
16	vWA	vWA	vWA
17			TROX
18			CSF1PO
19	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin

Кожний локусів ДНК, який використовується для ДНК-досліджень, характеризується своїм набором алелів, що і забезпечує вирішення діагностичного питання. Характеристика алелів у стандартах ДНК досліджень наведена у табл. 3.

Таблиця 3

АЛЕЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛОКУСІВ ДНК ІЗ СТАНДАРТНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ ПАНЕЛЕЙ

№	Локус ДНК	Хромосомна локалізація	Послідовність	Відомі алелі
1	D1S1656	1q42	TAGA	8-20.3
2	D2S441	2p14	TCTA/TCAA	8-17
3	D2S1338	2q35	TGCC/TTCC	10-31
4	D3S1358	3p21.31	TCTA/TCTG	6-26
5	D5S818	5q23.2	AGAT	4-29
6	D7S820	7q11.21-22	GATA	5-16
7	D8S1179	8q24.13	TCTA/TCTG	6-20
8	D10S1248	10q26.3	GGAA	7-19
9	D12S391	12q13.2	AGAT/AGAC	13-27.2
10	D13S317	13q31.1	TATC	5-17
11	D16S539	16q24.1	GATA	4-17
12	D18S51	18q21.33	AGAA	5.3-40
13	D21S11	21q21.1	TCTA/TCTG	12-43.2
14	D22S1045	22q12.3	ATT	7-20
15	FGA	4q31.3	TTTC/TTCC	12.2-51.2
16	TH01	11p15.5	TCAT	3-14
17	vWA	12p13.31	TCTA/TCTG	10-25

18	TROX	2p25.3	AATG	4-16
19	CSF1PO	5q33.1-34	AGAT	5-17
20	SE	6q14 beta-actin	AAAG	3 – 49
21	Penta E	15q26.2	AAAGA	5 – 32
22	Penta D	21q22.3	AAAGA	1.1 -19
23	Amelogenin	Xp22.1-22.3 Y p11.2	He є STR локусом	X, Y

Загальна характеристика найпоширеніших панелей ДНК наведена у табл. 4.

Таблиця 4

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА НАЙПОШИРЕНІШИХ ПАНЕЛЕЙ ДНК

№	Локус ДНК	Наявність локуса у діагностичній панелі			Діагностична локусна панель, яка рекомендована ENFSI
		<i>AmpFI STR Identifier</i>	<i>PowerPlex ESX (European Standart Extended) PROMEGA</i>	<i>PowerPlex ESI (European Standart Investigator) PROMEGA</i>	
1	D1S1656		X	X	X
2	D2S441		X	X	X
3	D2S1338	X	X**	X**	
4	D3S1358	X	X	X	X
5	D5S818	X			
6	D7S820	X			
7	D8S1179	X	X	X	X
8	D10S1248		X	X	X
9	D12S391		X	X	X
10	D13S317	X			
11	D16S539	X	X**	X**	

12	D18S51	X	X	X	X
13	D19S433	X	X**	X**	
14	D21S11	X	X	X	X
15	D22S1045		X	X	X
16	FGA	X	X	X	X
17	TH01	X	X	X	X
18	vWA	X	X	X	X
19	TROX	X			
20	CSF1PO	X			
21	SE 33		X*(**)	X*(**)	
22	Amelogenin	X	X	X	X
	Кількість локусів	16	16 (*17)	16 (*17)	13

** нові STR локуси, які рекомендовані ENFSI.

13. ВИМОГИ ДО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В УКРАЇНІ

Експертиза має бути незалежною, кваліфікованою і об'єктивною та орієнтованою на максимальне використання досягнень науки і техніки.

Судово-медичне визначення приналежності біологічного об'єкта, наприклад, крові, сперми, волосся, клітин-нашарувань, а також встановлення батьківства, материнства або заміни дітей з використанням ДНК дослідження за своєю суттю є методом діагностики.

Відповідно до ст.44 „Основ законодавства України про охорону здоров'я” „У медичній практиці лікарі зобов'язані застосовувати методи діагностики ... дозволені Міністерством охорони здоров'я”.

Незважаючи на значну кількість локусів ДНК, які можуть бути використані з судово-медичними цілями, доцільним є використання тих локусів ДНК, які рекомендовані в Європі ENFSI. Ця діагностична панель містить 12 STR локусів ядерної ДНК та один локус для встановлення статевої приналежності (табл. 5).

Таблиця 5

ЛОКУСИ, ЯКІ РЕКОМЕНДОВАНІ

ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ В УКРАЇНІ

№	Локуси ДНК
1	D1S1656
2	D2S441
3	D3S1358
4	D8S1179
5	D10S1248
6	D12S391
7	D18S51
8	D21S11
9	D22S1045
10	FGA
11	TH01
12	vWA
13	Amelogenin

Використання такої локусної панелі ДНК дозволить проводити формування банку ДНК-досліджень в Україні та забезпечить його співставлення із банком європейських даних, побудованому на Європейському стандарті.

Під час проведення ДНК-досліджень судово-медичний експерт, як фахівець, який має вищу медичну освіту, освітньо-кваліфікаційний рівень не нижче спеціаліста, відповідну підготовку із судово-медичної імунології і загальної генетики та кваліфікацію судового експерта з спеціальності "лікар-судово-медичний експерт-імунолог", виконує вимоги закону „Про судову експертизу”, Кримінально-процесуального кодексу та відомчі накази, інструкції, методичні рекомендації та враховує сучасні наукові дані з судово-медичної генетики тощо. Це забезпечить виконання експертних досліджень на принципах законності, незалежності, об'єктивності і повноти дослідження.

14. ЕТАПНІ АЛГОРИТМИ ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІТИЧНОЇ ПРОЦЕДУРИ ПЛР ДЛЯ РІЗНИХ ОБ'ЄКТІВ

Об'єкт	№ п.	Етапи дослідження	Додаткова інформація
Фенольна екстракція			
Рідка кров, плями крові	1	Проведення лізису, інкубація, видалення	Під час проведення інкубації

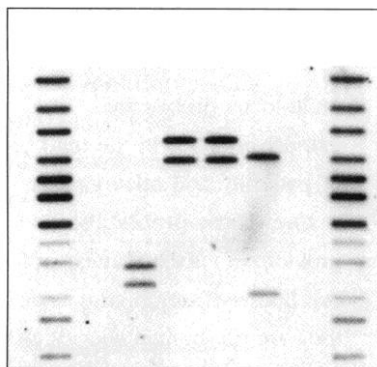
		предмета-носія плями, центрифугація	використовують vortex. Обов'язково проводять контроль ступеня лізису
	2	Очистка виділеної ДНК	
	3	Концентрація ДНК та промивка концентрату ДНК	
	4	Концентрація та очистка з використанням Centricon 100	
	5	Виділену ДНК зберігають при температурі 2-6 град або у морозильнику при -15-20 град С до проведення ПЛР	
Мазки, плями сперми	1	Суспендування у дистильованій воді, інкубація, центрифугування	Проводять мікроскопічний контроль осаду.
	2	Лізис сперматозоїдів або диференційний лізис епітеліальних клітин та лізис сперматозоїдів	Проводять цитологічний контроль ступеня лізису
	3	Очистка розчину ДНК епітеліальної та спермальної фракції	
	4	Об'єднання екстрактів. Концентрація ДНК та промивка концентрату ДНК	
	5	Концентрація та очистка з використанням Centricon 100	
	6	Виділену ДНК зберігають при температурі 2-6 град або у морозильнику при -15-20 град С до проведення ПЛР	
Волосся	1	Мікроскопічний пошук оболонки волосся, де наявні клітини	
	2	Видалення забруднень на волоссі, отримання частини волосся із клітинами та периферійної його ділянки (контроль)	
	3	Лізис та розщеплення волосся	
	4	Очистка виділеної ДНК	
	5	Концентрація з використанням Centricon 100	
	6	Промивка та концентрування розчину ДНК	
	7	Виділену ДНК зберігають при температурі 2-6 град	

		або у морозильнику при -15-20 град С до проведення ПЛР	
М'язова тканина та муміфікована тканина	1	Лізис зразку, інкубація, центрифугація	Використання vortex
		Очистка виділеної ДНК	
		Концентрація ДНК та промивка концентрату ДНК	
		Концентрація та очистка з використанням Centricon 100	
		Виділену ДНК зберігають при температурі 2-6 град або у морозильнику при -15-20 град С до проведення ПЛР	
Екстракція Chelex-100			
Рідка кров та плями крові	1	Інкубація зразка у дейонізованій воді, центрифугація, видалення надосадку. Якщо досліджують пляму крові, то предмет-носії залишають	Використання vortex
	2	Екстракція Chelex-100, інкубація, центрифугування, вилучення супернатанту	Використання vortex
	3	Зберігання отриманого супернатанту, який містить ДНК	
Мазки з ротової порожнини, прямої кишки, піхви, статевого члена	1	Інкубація зразка у дистильованій воді, видалення предмета-носія. Цитологічне дослідження осаду	Використання vortex. Може бути проведена повторна інкубація предмета-носія .
	2	Лізис сперматозоїдів або диференційний лізис епітеліальних клітин та сперматозоїдів	
	3	Змішування розчинів ДНК спермальної та епітеліальної фракції; центрифугація, інкубація, отримання супернатанту	Використання vortex
	4	Супернатант із ДНК зберігають до ПЛР	
Слина	1	Змішування предмету-носія із Chelex-100, протеїназою К, інкубація, центрифугація, отримання супернатанту	Використання vortex
	2	Супернатант із ДНК зберігають до ПЛР	
Волосся	1	Промивання волосся дистильованою водою	
	2	Мікроскопічний пошук клітин на	

		цибулинні волосся, Отримання фрагменту волосся із цибулиною та контролю із периферійного кінця	
	3	Змішування зразка із Chelex-100, протеїназою, ДТТ, інкубація, центрифугація, отримання супернатанту	Використання vortex
	4	Супернатант із ДНК концентрують за допомогою Centricon 100	
	5	Зберігання отриманого розчину ДНК	
Кістки	1	Змішування кісткового порошку із лізуючим буфером, інкубація з перемішуванням, видалення білків, центрифугування	
	2	Отримання супернатанту та осадження ДНК, його промивання, центрифугування	
	3	Отриманий осад ДНК розчиняють. Пробу зберігають.	

15. ПРОВЕДЕННЯ ОЦІНКИ РЕЗУЛЬТАТІВ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Після проведення ампліфікації ДНК проводять гель-електрофорез, в результаті якого алелі розмежовуються відповідно до своєї молекулярної маси. Саме гель-електрофореграма має бути інтерпретована (мал. 6).



Мал. 7. Гель-електрофореграма молекулярно-генетичного дослідження

Першим етапом інтерпретації є вивчення контролів – позитивного та негативного. При цьому, у негативному контролі на електрофореграмі мають бути відсутні ампліфіковані фрагменти. У позитивному контролі має бути наявний профіль ДНК, який має відповідати генотипу контрольної ДНК.

Надалі проводять вивчення відповідності між профілем алельного ледера та досліджувальними профілями ДНК для визначення наявності відповідних локусів ДНК та їх алелів. Така розшифровка електрофореграми проводиться у автоматичному комп'ютерному режимі. Враховують тільки ті фрагменти ампліфікованої ДНК, які розташовані відповідно до розташування фрагменту леддера. Розмір відхилення від фрагменту леддера може бути не більш, ніж на 0,5 п.н. Якщо досліджувальний зразок "перенавантажений" ДНК, то фрагменти можуть бути дещо зміщені відносно фрагментів леддера. В таких випадках рекомендують провести повторну ампліфікацію із меншою кількістю ДНК.

В межах кожного дослідженого локуса може виявлятися або одна смуга, тобто, один алель, що вказує на гомозиготність локуса, або дві смужки – тобто, два алеля, що вказує на гетерозиготність.

Результати ампліфікації можуть бути з'ясовані також з використанням колоночної хроматографії з флуоресцентною міткою, як, наприклад, у ABI Prism 310 Genetic Analyzer. При цьому локуси розпізнаються відповідно до флуоресцентної мітки. В автоматичному режимі розпізнаються і алелі локусів. Результат ідентифікації друкується (мал.8).

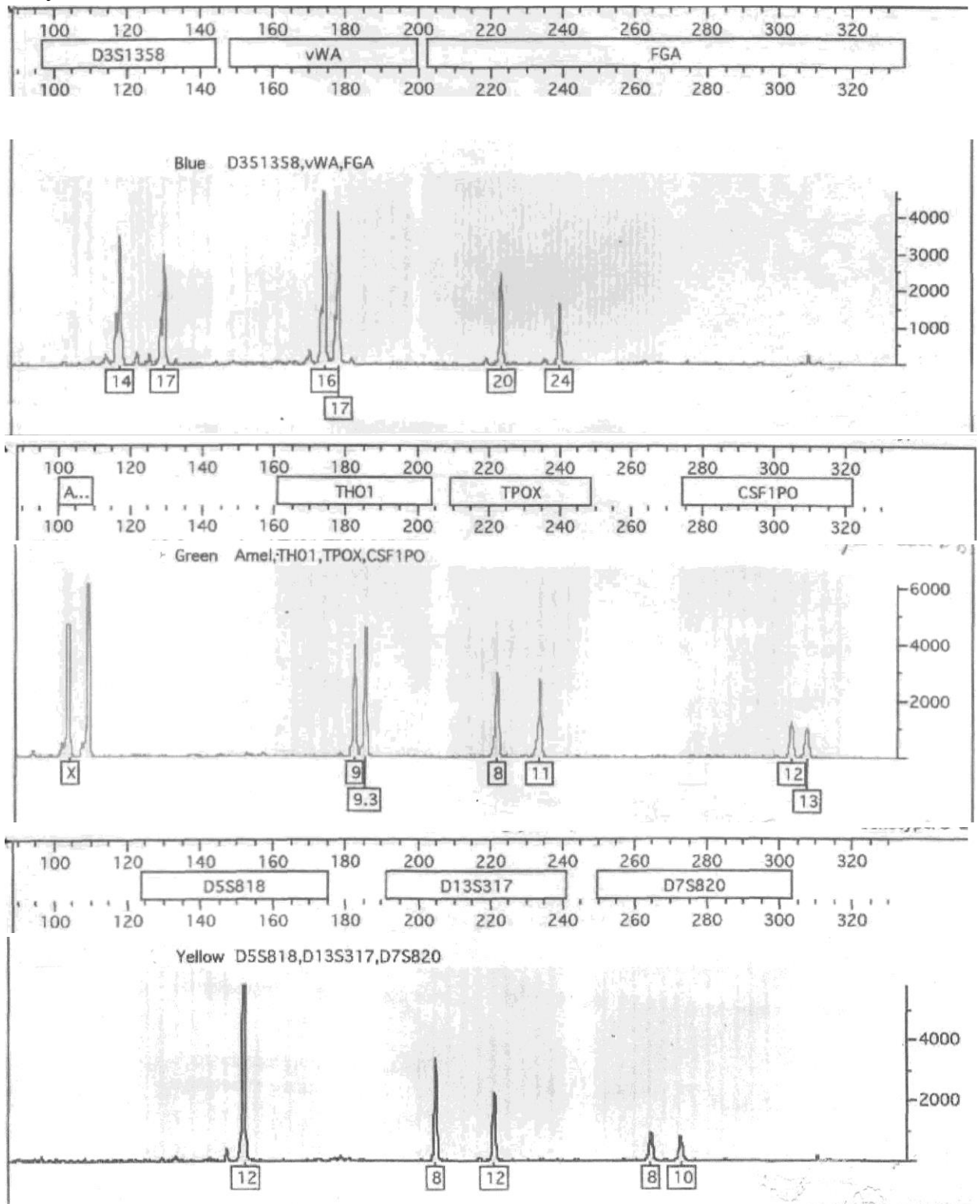
ДНК-дослідження може проводитися для встановлення походження якогось біологічного об'єкта від конкретної особи. При співставленні електрофореграм ДНК якогось зразка із ДНК конкретної особи (осіб) може бути виявлено співпадіння генетичних ознак. Це вказує на те, що досліджені об'єкти можуть мати одне джерело походження. Однак, при цьому, такий висновок завжди обмежують рамками досліджених локусів. Це обумовлено тим, що завжди існує можливість того, що два досліджуємих об'єкти за алелями можуть різнитися в інших локусах, які не досліджувалися. Крім того, не можна виключити й випадковий збіг досліджених ознак. У таких випадках проводять математичний підрахунок та отримують показник, який вказує на ймовірність випадкового збігу виявлених генетичних ознак, тобто, наскільки виявлені генетичні ознаки розповсюджені у популяції. Цей показник визначає, скільки людей на відповідну популяцію мають такі ж самі виявлені при ДНК-дослідженні генетичні ознаки.

Чим менша кількість осіб буде мати досліджений генетичний профіль на більшу кількість населення, тим більши ідентифікаційним буде являтися результат.

Звісно, що за виявленими генетичними ознаками та чи інша кількість людей є однаковою, що не дозволяє провести їх розмежування між собою. Наприклад, в США у кримінальних справах результат ДНК-дослідження має

вказувати на те, що виявлений генетичний профіль є унікальним у популяції, чисельність якої в 10 разів вища за кількість населення Землі.

Таким чином, у випадку співпадіння алельних характеристик в межах досліджених локусів ДНК не можна впевнено сказати про ідентичність обох досліджувальних зразків, які порівнюються за низкою локусів ДНК.



Мал.8. Результат ампліфікації ДНК при використанні колоночної хроматографії з флуоресцентною міткою

На етапі вивчення електрофреграм можливо відмежувати досліджувальний алельний профіль від профіля порівняння, якщо у ньому наявно 2 та більше алелів у різних локусах, які не зустрічаються у алельному профілі порівняння. Якщо у генетичному профілі дослідженого локусу виявлено більше 2-х алелів, то це може свідчити про суміш ДНК декількох осіб.

При дослідженні деградованих зразків ДНК існує можливість т.зв. «помилкової гомозиготності», коли ампліфікується тільки один алель, який є низькомолекулярним. Що ж стосується другого алеля, то він є високомолекулярним і внаслідок деградації зруйнувався.

ДНК-дослідження досить активно проводять для встановлення батьківства. Відповідно до чинного законодавства (ст. 128 Сімейного кодексу України) батьківство може бути встановлене за рішенням суду. При цьому, кожна із сторін може подати клопотання про призначення судово-медичної експертизи із проведенням судово-генетичного дослідження. В таких справах висновок експерта є найсуттєвішим доказом по справі, оскільки він може підтвердити або спростувати біологічне кровне родство між чоловіком та дитиною, оскільки під час експертизи використовується саме біологічний критерій.

Під час генотипоскопічного дослідження з'ясовують можливість походження дитини від конкретного чоловіка. В таких експертизах враховують те, що дитина отримує від кожного із батьків один алель для кожного локусу ДНК. У дитини не може бути алелів, які є відсутніми у її батьків. Однак, існують мутації в поліморфних локусах, внаслідок яких може бути неспівпадіння генотипу дитини та її справжнього батька. Для виключення батьківства необхідно виявити неспівпадіння алелів дитини та ймовірного батька не менш, ніж у трьох локусах ДНК.

В багатьох випадках з'ясовується, що алельний профіль дитини повністю співпадає із алельними характеристиками ймовірного батька. У такому випадку проводять ймовірно-статистичну оцінку отриманого результату.

Зараз у багатьох країнах - Великобританії (British Forensic Science Services, FSS), Німеччині, Данії, Нідерландах, США (Federal Bureau of Investigations Laboratory, FBI), для ймовірнісної оцінки ДНК досліджень стандартом оцінювання є «відношення правдоподібності» (Likelihood Ratios, LR).

Якщо проводять визначення батьківства, то LR враховують для всієї комбінації генотипу дитини, матері та можливого батька на підставі кожного дослідженого локуса. Надалі розраховують комбінований індекс

батьківства (Combined Paternity Index, CPI), для отримання якого окремі LR для кожного локусу мають бути перемножені:

$$CPI = LR(\text{локус 1}) * LR(\text{локус 2}) * \dots * LR(\text{локус n})$$

Цей індекс вказує, наскільки ймовірно, що вказаний чоловік є джерелом батьківських алелей, ніж те, що цей факт є випадковим збігом алелей.

Часто використовують інший показник, який є більш спірний, ніж попередній. Це ймовірність батьківства (Probability of Paternity, PP), Він вираховується у випадку прийняття апіорної ймовірності $pp=0,5$ за формулою $PP = CPI / (1+CPI)$. Однак, використання такої апіорної вірогідності викликає низку заперечень, у зв'язку із чим ймовірність батьківства може бути вирахована при любых значеннях апіорної ймовірності за формулою $PP = (pp \times CPI) / (pp \times CPI) + (1-pp)$.

В Росії при розрахунках результатів молекулярно-генетичного дослідження замість LR використовують локальні статистичні частоти r для алелей кожного дослідженого локусу. Показник r вказує на частоту зустрічальності у популяції випадкового чоловіка, який має таку ж саму алель, як і алель заявленого батька у генотипі дитини. Показник r розраховують за формулою:

$$r = 2p - p^2,$$

де: p - частота алеля батьківського походження генотипі дитини за даними популяційних досліджень.

В подальшому, з'ясовують частоту зустрічальності такого чоловіка у популяції з дослідженим набором батьківських алелей:

$$R = r(\text{локус 1}) \times r(\text{локус 2}) \times \dots \times r(\text{локус n}).$$

Індекс батьківства вираховують за формулою (для $pp=0,5$): $PP = PI/(1+PI)$. Тобто, показник PI є зворотнім до R : $PI=(1/R)$

Однак, використання алгоритму, де визначається відношення **правдоподібності** є більш консервативним.

В Україні склалося так, що при розрахунках результатів генотипоскопічних досліджень використовують локальні статистичні частоти зустрічальності алеля у популяції. У зв'язку із цим, рекомендується при встановленні ймовірності походження біологічного об'єкта від конкретної особи залишити цей принцип та його розраховувати за відповідними формулами.

При встановленні батьківства на підставі локальних статистичних частот зустрічальності алеля у популяції можливо визначення за відповідними формулами 2-х показників: ймовірності випадкового збігу

виявлених генетичних ознак з визначенням кількості однакових осіб на відповідну популяцію населення та комбінованого індексу батьківства.

Діагностичний показник та його поалельний розрахунок має бути наведений у судово-медичній документації - «Акті судово-медичного дослідження», «Висновку спеціаліста» або «Висновку експерта».

Особливості проведення математичного розрахунку при вирішенні питання про приналежність біологічного об'єкта конкретній особі

При проведенні математичного підрахунку використовують частоти алелів (р) для досліджених локусів. **Ці частоти** вказують на частоту зустрічальності алеля у популяції і **мають бути офіційно затверджені та доступними**. Знаючи частоту зустрічальності алеля у популяції, вираховують для кожного локуса показник випадкового збігу – Р. Формули розрахунку показника Р наведені у таблиці 6.

Таблиця 6

Формули розрахунку показника випадкового збігу Р при порівнянні

Характеристика досліджувального локусу	Алельні профілі, які порівнюються			Формула розрахунку
Виявлено два алеля, які співпадають із гетерозиготним профілем локусу порівняння	а б	а б		$2p_a \times p_b$
Виявлено один алель (гомозиготна форма локусу)	а	а		p_a^2
Виявлено більше, ніж 2 алеля	а б с	а б		$(p_a + p_b + p_c)^2$
Виявлено 2 алеля, але наявна підозра, що біологічний слід залишений не однією людиною, а двома	а б	а б		$(p_a + p_b)^2 = p_a^2 + p_b^2 + 2 p_a p_b$
Виявлено алелі, які можуть походити як від злочинця, так і від постраждалої особи, а саме: алелі походять тільки від злочинця, алелі походять від злочинця та жертви,				Розраховують показник Р для кожного випадку і обирають максимальний, за яким і трактують результат

алелі походять тільки від жертви				
Алелі співпадають із алелями злочинця. Однак, один алель відповідає гомозиготному профілю постраждалої особи	a б	a б	a	Обирають показник Р, який розрахований за формулою: $P = p^2 a + 2 p_a p_b$
Виявлені алелі, які співпадають із алелями підозрюваної особи та постраждалої особи	a б	a б	a б	Якщо є підстави вважати, що досліджувальний локус обумовлений ДНК постраждалої особи, то питання про походження об'єкта не може бути вирішене. Якщо виключена можливість походження алелів від жертви, то використовують формулу: $P = 2p_a p_b + p^2 a + p^2 b$
Виявлено один алель, у об'єкті порівняння наявно 2 алеля. Причому, існує можливість деградації досліджувальної ДНК	a	a б		Виключено походження плями від об'єкта порівняння Якщо не виключається, то $P = p_a(2-p_a)$
Виявлено один алель у змішаній плямі. Причому, він співпадає із гетерозиготним профілем підозрюваної особи, а алель постраждалої особи є іншим, ніж всі виявлені.	a	a б	c	Виключено походження плями від об'єктів порівняння. Якщо другий алель не знайдено, то можливе походження від злочинця $P = P = p_a(2-p_a)$ В інших варіантах походження алеля не можна виявити.

Після розрахунку показника випадкового збігу Р для кожного алеля отримують показник ймовірності випадкового збігу для всіх досліджених локусів, тобто, показник кумулятивної ймовірності випадкового збігу алелів. При цьому, проводять перемножування кожного локусного показника між собою:

$$P_{\text{кум}} = P_1 \times P_2 \dots P_n.$$

На підставі отриманих результатів математичного розрахунку складають підсумки (висновки).

Особливості визначення статі

ДНК-аналіз має переваги при встановленні жіночої статі, оскільки дозволяє безпосередньо виявити маркерну ділянку Х-хромосоми, а при

відсутності У-фрагмента зробити висновок про належність об'єкта до жіночої статі.

Особливості інтерпретації змішаних слідів

Змішування біологічних об'єктів може бути у випадках статевих злочинів, змішування крові постраждалої особи з кров'ю злочинця, а також внаслідок контамінації зразків під час проведення самого ДНК-аналізу. У таких випадках відбувається змішування ДНК різного походження, наприклад, чоловічої та жіночої ДНК.

На електрофореграмах ДНК після ПЛР маркерна ділянка Х хромосоми однакова як для чоловічої хромосоми, так і для жіночої. У зв'язку з цим, у випадку змішування біологічних зразків чоловічого та жіночого походження такий змішаний характер слідів буде замаскований, а досліджений генетичний профіль буде інтерпретуватися виключно як чоловічий. Таким чином, якщо не виключається змішаний характер слідів, то проводять цитологічне дослідження для уточнення результату.

Однак, у змішаних слідах двофрагментний профіль ДНК часто характеризується більш інтенсивним Х- специфічним фрагментом, ніж У- специфічним. Це обумовлено тим, що у змішаних слідах більше послідовності Х хромосоми, ніж У хромосоми. Якщо виявляють таку характеристику, то роблять висновок про змішаний характер біологічного зразку.

Якщо виявляється або можливе інгібування ПЛР, то проводять цитологічне дослідження для визначення статі, можливість проведення якого необхідно передбачити на етапі пробопідготовки.

Якщо при дослідженні вагінального вмісту виявлено чоловічий профіль, то це свідчить про те, що був статевий контакт і в слідах наявний чоловічий генетичний матеріал, навіть тоді, коли сперма не була виявлена, або патологічно змінена внаслідок захворювання.

Проведення надмірної кількості циклів ампліфікації, ніж рекомендовані максимум 35 циклів, може обумовити появу екстрафрагментів поблизу Х та У специфічних фрагментів при встановленні статевої приналежності.

Приклад 1. Для генотипоскопічного дослідження у судово-медико-імунологічне відділення бюро судово-медичної експертизи надіслано речові докази за кримінальною справою № 0000, а саме: сорочка сірого кольору, яка належить гр.-ну Р., із слідами, які зовні нагадують кров. При генотипоскопічному дослідженні необхідно визначити, чи є нашарування коричневого кольору на сорочці, яка належить гр.-ну Р., кров'ю, якщо так, то чи походить ця кров від гр.-на Ж та з якою вірогідністю?

Опис речових доказів

У судово-медико-імунологічне відділення слідчий П. доставив картонну коробку розміром 23x25x15 см, яка опечатана печатками. Після її відкриття виявлено чоловічу сорочку сірого кольору, яка належить гр. Р. На її передній планці ліворуч в 25 см від лівого бічного шва та 45 см від її нижнього краю наявна пляма неправильної форми коричневого кольору розміром 5x7 см. Крім того, в окремих пакунках наявні на марлі зразок крові гр. Ж. та зразок крові гр.-на Р. Для дослідження було зроблено вирізки із плями на сорочці та із марлі.

Визначення наявності крові

Наявність крові визначали за методом висхідної хроматографії на пластинах Силуфол, які попередньо активували. На активовані пластинки наносили витяги, виготовлені шляхом екстрагування вирізок із об'єктів у фізіологічному розчині. В якості контролю використовували витяги із завідомо відомої плями крові та предмету-носія. Пластини Силуфол із витягами вміщували у камеру із розчинником: бутиловий спирт, ледяна оцтова кислота, дистильована вода (4:1:2) та проводили їх елюювання. Плями появляли 0,1% розчином основного бензидину у хлороформі та 3% розчином перекису водню. Після проявлення плям в місцях, що розташовувалися відповідно до R_f контролю крові виявляли овальні зони блакитного кольору. У витягах із предметів-носіїв забарвлення не знайдено.

Визначення видової приналежності білку у слідах

Використовували метод кільцепреципітації Чистовича–Улегнута із сироватками, які преципітують білок людини (10-1108), великої рогатої худоби (54-112), курки (48-1008), які попередньо були перевірені відносно титру та специфічності. Реакція була поставлена із витягами із об'єкту-носія. Витяги, які використовували, були прозорі, вміст білку в них становив приблизно 1:1000. При додаванні сироватки, яка преципітує білок людини, на межі їх контакту через 3 хвилини утворювався білий преципітат у вигляді диску. В контрольних витягах та розчині фізіологічного розчину преципітація була відсутньою впродовж 1 години.

Визначення групової приналежності крові

Наявність агглютининів анти-А та анти-В проводили методом покровного скла за Латтесом із стандартними еритроцитами груп А,В,О. Об'єкт фіксували етанолом 30 хв (Тишнова Л.И., Сейбаталова А.С. «К вопросу о выборе фиксатора антигенов системы АВО в пятнах крови// Сб. «Вопросы судебно-медицинской экспертизы и криминалистики.- Горький, 1979). Титр сироваток анти-А та анти-В перевірених відносно специфічності при розведенні 1:128. Абсорбція перебігала в умовах холодильника (+4+8 град С) впродовж 18 годин. Проби відмивали 6 разів

охолодженим фізіологічним розчином та проводили елюцію у фізіологічний розчин хлористого натрію при 50 град С впродовж 25 хв. Облік реакції проводили мікроскопічно за явищем аглютинації еритроцитів.

Результат дослідження

Досліджуваний об'єкт	Реакція абсорбції-елюції			Реакція за Латтесом				Встановлена група крові
	Тест- еритроцити							
	альфа α	бета β	Виявлений аглютиноген	A	B	O	Виявлений аглютинін	
Зразок крові гр.-на Ж.	-	+	B	+	-	-	альфа	B α (III)
контроль	-	-						
Об'єкт-пляма крові на сорочці	-	+	B	+	-		альфа	B α (III)
контроль	-	-						
Зразок крові гр.-на Р.	-	+	B	+	-	-	альфа	B α (III)
контроль	-	-						

Примітка: позначка «+» або «-» вказує відповідно на наявність або відсутність аглютинації стандартних еритроцитів.

Висновок. При судово-медико-імунологічному дослідженні в плямі крові із сорочки гр.-на Р. виявлено кров, яка за груповою характеристикою належить особі із групою крові В (III група), оскільки має аглютиноген В та аглютинін альфа.

За груповою характеристикою зразок крові гр.-на Ж. відноситься до III групи крові, оскільки має аглютиноген В та аглютинін альфа.

Таким чином, зважаючи на наявність однакової групової характеристики крові із плями на одязі гр.-на Р. та зразка крові від гр.-на Ж, не можна виключити можливість походження сліду крові на сорочці гр.-на Р. від гр.-на Ж. За груповою характеристикою кров на сорочці гр.-на Р. може походити від будь-якої особи, яка має аглютиноген В та аглютинін альфа.

Зважаючи на значну розповсюдженість однакових групових характеристик крові серед населення та неможливість визначення приналежності крові за групою, проведено порівняльне генотипоскопічне дослідження ДНК із плями крові на сорочці гр.-на Р. та зразка крові гр. Ж.

Молекулярно-генетичне дослідження

Виділення ДНК із зразків проводили відповідно до методики виділення, яка описана у керівництві до діагностичної панелі. Вирізки із плям заливали 1 мл дейонізованої води та інкубували при кімнатній

температурі із періодичним автоматичним помішуванням. Надалі пробірки із екстрактами центрифугували та видаляли супернатант. До осаду додавали іонообмінну смолу Chelex та інкубували при 56 град С. Надалі вміст пробірок перемішували на Vortex. Отриману суміш інкубували при температурі 100 град .

Пляма крові із сорочки гр.-на Р., контрольний зразок крові гр.-на Ж., та гр.-на Р., які надані на дослідження, підлягають проведенню ДНК-дослідженню, оскільки:

- із досліджувальних зразків виділено 100 нг ДНК, що є достатнім для ПЛР;

- можливість деградації ДНК у зразках крові виключена, так, як зразки із кров'ю зберігалися два місяці у сухому стані, а аналіз електрофореграми показав, що ДНК у досліджувальних об'єктах є високомолекулярними.

- у негативному контролі ампліфікація відсутня. В позитивному контролі наявна максимальна кількість послідовностей-мішеней.

Дослідження алелей локусів ДНК

Аналізу підлягали 13 локусів ДНК, серед яких D1S1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11, D22S1045, FGA, TH01, vWA, Amelogenin.

Дослідження проводили за допомогою набору для ампліфікації відповідно до інструкції, яка надана до діагностичної панелі.

Результат дослідження.

Локуси ДНК	Алелі в ДНК крові гр.-на Р.	Алелі в ДНК із плями крові на сорочці гр.-на Р.	Алелі в ДНК крові гр.-на Ж.
D1S1656	9,12	13,14	13,14
D2S441	9,11	10,11	10,11
D3S1358	15,17	16,16	15,16
D8S1179	30,31	29, 32.2	29,32,2
D10S1248	8,14	9,11	9,11
D12S391	14, 20	15, 17	15,17
D18S51	7,10	9,11	9,15
D21S11	30,31	29, 32,2	29,32.2
D22S1045	8, 14	10,12	10,14
FGA	20,20	20,22	20,22
TH01	6,9	8,9.3	8,9.3
vWA	17,18	15,18	15,18
Amelogenin	XУ	XУ	XУ

При генотипоскопічному дослідженні, яке включало 12 локусів ДНК та локус з визначення статевої приналежності, встановлено наступне:

А) алельна характеристика досліджувальної плями крові, яка виявлена на одязі гр.-на Р., співпадає з алельною характеристикою крові гр.- на Ж. за 10 локусами ДНК, а саме: за локусами D1S1656, D2S441, D8S1179, D10S1248, D12S391, D21S11, FGA, TH01, vWA, Amelogenin.

б) алельна характеристика плями крові, яка виявлена на одязі гр.-на Р, за трьома локусами ДНК не співпадає з алельною характеристикою крові гр.- на Ж., оскільки в ДНК плями крові у локусі D3S1358 наявний алель 16 (гомозиготна форма), а в крові гр.-на Ж. за цим локусом наявні 2 алелі 15,16 (гетерозиготна форма);

В локусі D18S51 ДНК із плями крові наявні алелі 9,11, а у відповідному локусі ДНК крові гр.-на Ж. наявні алелі 9,15.

В локусі D22S1045 ДНК із плями крові наявні алелі 10,12, а у відповідному локусі ДНК крові гр.-на Ж. наявні алелі 10,14.

Таким чином, пляма крові не походить від гр.-на Ж, на що вказує різна алельна характеристика в межах досліджених локусів ДНК.

Приклад 2.

Для генотипоскопічного дослідження у судово-медико-імунологічне відділення бюро судово-медичної експертизи надіслано речові докази за кримінальною справою № 0000, а саме: брюки джинсові синього кольору, які належать гр.-ну П., із слідом зеленкуватого кольору, який зовні нагадує кров. Брюки гр. П. тривалий час до вилучення перебували у вологому приміщенні. При генотипоскопічному дослідженні необхідно визначити, чи являється нашарування на брюках –джинсах зеленкуватого кольору, які належать гр.-ну П., кров'ю, якщо так, то чи походить ця кров від гр.-на С. та з якою вірогідністю?

Визначення наявності крові

Наявність крові визначали за методом висхідної хроматографії на пластинах Силуфол, які попередньо активували. На активовані пластинки наносили витяги, виготовлені шляхом екстрагування вирізків із об'єктів у фізіологічному розчині. В якості контролю використовували витяги із завідомо відомого плями крові та предмету-носія. Пластини Силуфол із витягами вміщували у камеру із розчинником: бутиловий спирт, ледяна оцтова кислота, дистильована вода (4:1:2) та проводили їх елювання. Плями появляли 0,1% розчином основного бензидину у хлороформі та 3% розчином перекису водню. Після проявлення плям в місцях, що

розташовувалися відповідно до Rf контролю крові виявлено зони блакитного кольору. У витягах із предметів-носіїв забарвлення не знайдено.

Визначення видової приналежності білку у слідах

Використовували метод кільцепреципітації Чистовича –Улегнута із сироватками, які преципітують білок людини (10-1108), великої рогатої худоби (54-112), курки (48-1008), які попередньо були перевірені відносно титру та специфічності. Реакція була поставлена із витягами із об'єкту-носія. Витяги, які використовували, були прозорі, вміст білку в них становив приблизно 1:1000. При додаванні сироватки, яка преципітує білок людини, на межі їх контакту через 3 хвилини утворювався білий преципітат у вигляді диску. В контрольних витягах та розчині фізіологічного розчину преципітація була відсутньою впродовж 1 години.

Визначення групової приналежності крові

Наявність аглютининів анти-А та анти-В проводили методом покровного скла за Латтесом із стандартними еритроцитами груп А,В,О. Об'єкт фіксували етанолом 30 хв (Тишнова Л.И., Сейбаталова А.С. «К вопросу о выборе фиксатора антигенов системы АВО в пятнах крови.// Сб. «Вопросы судебно-медицинской экспертизы и криминалистики.- Горький, 1979).. Титр сироваток анти-А та анти-В перевірених відносно специфічності при розведенні 1:128. Абсорбція перебігала в умовах холодильника (+4+8 град) впродовж 18 годин. Проби відмивали 6 разів охолодженим фізіологічним розчином та проводили елюцію у фізіологічний розчин хлористого натрію при 50 град С впродовж 25 хв. Облік реакції проводили мікроскопічно за явищем аглютинації еритроцитів.

Результат дослідження

Досліджуваний об'єкт	Реакція абсорбції-елюції			Реакція за Латтесом				Встановлена група крові
				Тест- еритроцити				
	альфа α	бета β	Виявлений аглютиноген	А	В	О	Виявлений аглютинін	
Зразок крові гр.-на С. контроль	+	-	А	-	+	-	бетта	А (β) II
Об'єкт-пляма крові на брюках П. Контроль	+	-	А	-	+		бетта	А (β) II
Зразок крові гр.-на П. контроль	-	+	В	+	-	-	альфа	В(α) III
	-	-						

Примітка: позначка «+» або «-» вказує відповідно на наявність або відсутність аглютинації стандартних еритроцитів

Висновок. При судово-імунологічному дослідженні в плямі крові із брюк гр.-на П. виявлено кров, яка за груповою характеристикою належить особі із групою крові А (II), оскільки має аглютиноген А та аглютинін бетта.

За груповою характеристикою зразок крові гр.-на П. відноситься до II групи крові, оскільки має аглютиноген А та аглютинін бетта.

Таким чином, зважаючи на наявність однакової групової характеристики крові із плями на брюках гр.-на П. та зразка крові від гр.-на С., не можна виключити можливість походження сліду крові на брюках гр.-на П. від гр.-на С. За груповою характеристикою кров на брюках гр.-на П. може походити від любої особи, яка має аглютиноген А та аглютинін бетта.

Зважаючи на значну розповсюдженість однакових групових характеристик крові серед населення, та неможливість визначення приналежності крові за групою, проведено порівняльне генотипоскопічне дослідження ДНК із плями крові на брюках гр.-на П. та зразка крові гр. С.

Молекулярно-генетичне дослідження

Виділення ДНК із зразків проводили відповідно до методики виділення, яка описана у керівництві до діагностичної панелі. Вирізки із плям заливали 1 мл дейонізованої води та інкубували хв при кімнатній температурі із періодичним автоматичним помішуванням. Надалі пробірки із екстрактами центрифугували та видаляли супернатант. До осаду додавали іонообмінну смолу Chelex та інкубували при 56 град С. Надалі вміст пробірок перемішували на Vortex. Отриману суміш інкубували при температурі 100 град впродовж 8 хвилин.

Пляма крові із брюк гр.-на П. та контрольний зразок крові гр.-на С. та гр.-на П., які надані на дослідження, не підлягають проведенню ДНК-дослідженню, оскільки:

- із досліджувального зразку крові гр.-на П. виділено 15 нг ДНК, що є достатнім для ПЛР;

- ДНК у зразку крові, що наявний на брюках-джинсах, деградована, оскільки брюки тривалий час перебували у вологому приміщенні, а проведений аналіз електрофореграми показав, що ДНК у цьому досліджувальному об'єкті не є високомолекулярною, оскільки має значний шлейф із фрагментів ДНК.

- в позитивному контролі наявні поодинокі послідовності-мішені.

Таким чином, слід крові, який вилучений з брюк-джинсів, не підлягає проведенню ДНК-дослідження.

Приклад 3.

Для генотипоскопічного дослідження у судово-медико-імунологічне відділення бюро судово-медичної експертизи надіслано речові докази за кримінальною справою № 0000, а саме: ніж кухонний, на лезі якого наявний мазок коричневатого кольору, який зовні нагадує кров. Кухонний ніж до вилучення у використанні не перебував, на місці пригоди знаходився у сухих умовах. При дослідженні необхідно визначити, чи являється нашарування на ножі кров'ю, якщо так, то чи походить ця кров від гр.-на С. та з якою вірогідністю?

Визначення наявності крові

Наявність крові визначали за методом висхідної хроматографії на пластинках Силуфол, які попередньо активували. На активовані пластинки наносили витяги, виготовлені шляхом екстрагування вирізків із об'єктів у фізіологічному розчині. В якості контролю використовували витяги із завідомо відомого плями крові та предмету-носія. Пластини Силуфол із витягами вміщували у камеру із розчинником: бутиловий спирт, ледяна оцтова кислота, дистильована вода (4:1:2) та проводили їх елюювання. Плями появляли 0,1% розчином основного бензидину у хлороформі та 3% розчином перекису водню. Після проявлення плям в місцях, що розташовувалися відповідно до Rf контрлю крові виявлено івальні зони блакитного кольору. У витягах із предметів-носіїв забарвлення не знайдено.

Визначення видової приналежності білку у слідах

Використовували метод кільцепреципітації Чистовича –Улегнута із сироватками, які преципітують білок людини (10-1108), великої рогатої худоби (54-112), курки (48-1008), які попередньо були перевірені відносно титру та специфічності. Реакція була поставлена із витягами із об'єкту-носія. Витяги, які використовували, були прозорі, вміст білку в них становив приблизно 1:1000. При додаванні сироватки, яка преципітує білок людини, на межі їх контакту через 3 хвилини утворювався білий преципітат у вигляді диску. В контрольних витягах та розчині фізіологічного розчину преципітація була відсутньою впродовж 1 години.

Визначення групової приналежності крові

Наявність агглютининів анти-А та анти-В проводили методом покровного скла за Латтесом із стандартними еритроцитами груп А,В,О. Об'єкт фіксували етанолом 30 хв (Тишнова Л.И., Сейбаталова А.С. «К вопросу о выборе фиксатора антигенов системы АВО в пятнах крови// Сб. «Вопросы судебно-медицинской экспертизы и криминалистики.- Горький, 1979). Титр сироваток анти-А та анти-В перевірених відносно специфічності при розведенні 1:128. Абсорбція перебігала в умовах

холодильника (+4+8 град) впродовж 18 годин. Проби відмивали 6 разів охолодженим фізіологічним розчином та проводили Елюцію у фізіологічний розчин хлористого натрію при 50 град С впродовж 25 хв. Облік реакції проводили мікроскопічно за явищем аглютинації еритроцитів. Наявність аглютинації безпосередньо вказує на присутність однойменного аглютиногену або аглютиніну.

Результат дослідження

Досліджуваний об'єкт	Реакція абсорбції-елюції			Реакція за Латтесом				Встановлена група крові
	Тест-еритроцити							
	альфа α	бета β	Виявлений аглютиноген	A	B	O	Виявлений аглютинін	
Зразок крові гр.-на С. контроль	-	+	B	+	-	-	альфа	B (α) II
Об'єкт-слід крові на кухонному ножі	-	+	B	+	-		альфа	B (α) II

Примітка: позначка «+» або «-» вказує відповідно на наявність або відсутність аглютинації стандартних еритроцитів.

Висновок. При судово-імунологічному дослідженні в плямі крові із ножа виявлено кров, яка за груповою характеристикою належить особі із групою крові В (III група), оскільки має аглютиноген В та аглютинін альфа.

За груповою характеристикою зразок крові гр.-на С. відноситься до III групи крові, оскільки має аглютиноген В та аглютинін альфа.

Таким чином, зважаючи на наявність однакової групової характеристики крові, вилученої із кухонного ножа, та зразка крові від гр.-на С., не можна виключити можливість походження сліду крові на кухонному ножі від гр.- на С. За груповою характеристикою кров на кухонному ножі може походити від любої особи, яка має аглютиноген В та аглютинін альфа.

Зважаючи на значну розповсюдженість однакових групових характеристик крові серед населення, та неможливість визначення приналежності крові за групою, проведено порівняльне генотипоскопічне дослідження ДНК із сліду крові на кухонному ножі та зразка крові від гр. С.

Молекулярно-генетичне дослідження

Виділення ДНК із зразків проводили відповідно до методики виділення, яка описана у керівництві до діагностичної панелі . Вирізки із плям заливали 1 мл дейонізованої води та інкубували при кімнатній температурі із

періодичним автоматичним помішуванням. Надалі пробирки із екстрактами центрифугували та видаляли супернатант. До осаду додавали іонообмінну смолу Chelex та інкубували при 56 град С. Надалі вміст пробірок перемішували на Vortex. Отриману суміш інкубували при температурі 100 град.

Молекулярно-генетичне дослідження

Із досліджувального зразку виділено 50 нг ДНК, що є достатнім для ПЛР. При аналізі електрофореграми встановлено, що ДНК у досліджувальному об'єкті має незначний шлейф, що вказує на наявність ознак часткової деградації. В позитивному контролі наявна значна кількість послідовностей-мішеней.

Таким чином, слід крові, який вилучений під час огляду місця події на ножі, може бути досліджений шляхом генотипоскопічного дослідження.

Результат генотипоскопічного дослідження

Локуси ДНК	Алелі в ДНК крові гр.-нки В.	Алелі в ДНК із сліду крові на ножі	Алелі в ДНК крові гр.-нки С.
D1S1656	11,12	13,-	13,14
D2S441	12,13	29, 30	29,30
D3S1358	15,18	15,18	15,18
D8S1179	13,18	13, 14	13, 14
D13S317	10,11	10,11	10,11
D16S391	14, 16	-	12,11
D18S51	14,15	14,15	14,15
D21S11	30,31	29, 29	29, 29
D22S1045	7,14	-	10,14
TROX	8,8	8,8	8,8
TH01	6,9	6,8	6,8
vWA	12,18	15,18	15,18
FGA	22,24	25,-	21,25
Amelogenin	XX	XX	XX

В ДНК із сліду крові на ножі в локусах D1S1656, D16S391, D22S1045, FGA алелі не виявлені, що обумовлено частковою деградацією об'єкта дослідження.

Розрахунок показника кумулятивної ймовірності випадкового збігу для 9 локусів ДНК, в яких виявлено всі алелі.

Локуси ДНК	Алелі, які аналізуються	Використана формула	Показник випадкового збігу
------------	-------------------------	---------------------	----------------------------

	№ алеля	Частота зустрічальності		
D2S1338	20, 24	0,1461 0,1175	$p_1(2-p_1)+ p_2(2-p_2) - p_1 p_2$	0,4749
D5S818	11, 12	0,3926 0,3524	$p_1(2-p_1)+ p_2(2-p_2) - p_1 p_2$	1,0733
D3S1358	15, 18	0,2536 0,1648	$p_1(2-p_1)+ p_2(2-p_2) - p_1 p_2$	0,7035
D8S1179	13	0,3252	$p_1(2-p_1)$	0,5446
D13S317	10	0,0444	$p_1(2-p_1)$	0,0868
D18S51	15	0,1361	$p_1(2-p_1)$	0,2537
D21S11	29	0,2049	$p_1(2-p_1)$	0,3678
TH01	8	0,1146	$p_1(2-p_1)$	0,2161
vWA	17	0,2450	$p_1(2-p_1)$	0,4299
Показник кумулятивної ймовірності випадкового збігу				0,000147

Висновок.

1. За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено, що слід крові, який виявлено під час огляду місця події, має ознаки часткової деградації, оскільки в ньому відсутні алельні характеристики для локусів D1S1656, D16S391, D22S1045, та в локусі FGA виявлено один алель, характеристика якого не відповідає властивостям гомозиготного алеля.

2. Алельна характеристика сліду крові, який знайдено на ножі, за 10 локусами співпадає із алельною характеристикою крові гр.-нки Ж, а саме, за локусами: D2S1338, D5S818, D3S1358, D8S1179, D13S317, D18S51, D21S11, TH01, vWA, Amelogenin, оскільки у вказаних локусах наявні однакові алельні характеристики.

За показником кумулятивної ймовірності випадковго збігу 9 локусів алелів становить 0,000147, що вказує на те, що у популяції із 1000000 (1 млн) осіб наявно 147 осіб, які мають однакові алельні характеристики в межах досліджених 10 локусів ДНК.

Приклад 4. Для молекулярно-генетичного дослідження у судово-медико-імунологічне відділення бюро судово-медичної експертизи надіслано речовий доказ за кримінальною справою № 0000, а саме: нитка білорижуватого кольору, яку було перекушено гр. Д. під час скоєння злочину. Нитка до вилучення перебувала у сухому стані та була знайдена у смітниковому пакеті під час огляду місця події. При дослідженні необхідно визначити, чи наявні на нитці сліди, які б вказували, що вона була перекушена гр. Д. та з якою вірогідністю?

Цитологічне дослідження. Із досліджуваної нитки довжиною 15 см вирізали ножицями із дотриманням принципу попередження контамінації ділянку 5 см, яка має рудий колір та перенесли її у центрифужну пробірку. Надалі в пробірку додавали 1 мл дистильованої води та витримували 24 год у холодильнику при +4 град С. Після цього нитку видаляли, а вміст пробірки центрифугували при 1500 об/хв. впродовж 5 хв. Отриманий осад ресуспендували у 2-4 краплях фізіологічного розчину, поділяли на 2 частини, одну частину використовували для цитологічного дослідження, іншу підготовували для наступного генотипоскопічного дослідження. При цьому, другу частину переносили на нитки стерильної марлі та висушували. Надалі цей зразок передавали у судово-імунологічне відділення для генотипоскопічного дослідження.

При проведенні судово-цитологічного дослідження будь-яких клітин у досліджувальних цитологічних препаратах не виявлено.

Попередньо перед генотипоскопічним дослідженням проведено визначення кількості ДНК у об'єкті. Кількість ДНК визначали полімеразно-ланцюговою реакцією в реальному часі відповідно до посібника.

Результат дослідження. В об'єкті виявлено 0,028 нг/мл ДНК. Зважаючи на те, що для проведення ампліфікації вміст ДНК має становити не менш, ніж 0,05 нг/мл, то наданий на експертизу об'єкт дослідженню не підлягає.

Таким чином, враховуючи відсутність ДНК та клітин на нитці за результатами судово-цитологічного дослідження та відсутність необхідної кількості ДНК, подальше проведення генотипоскопічного дослідження не має сенсу.

Формули розрахунку показника випадкового збігу алельних ознак Р при встановленні батьківства у випадку, коли обидва батьки відомі

При проведенні математичного розрахунку випадкового збігу алелів аналізують, які саме алелі із локусу було передано дитині від ймовірного батька. Тобто, знаходять однакові алелі у батька та дитини. Знаючи частоту зустрічальності алеля у популяції, вираховують для кожного локуса показник випадкового збігу – Р. Формули розрахунку показника Р наведені у таблиці 7.

Однак, якщо у дитини виявлено гетерозиготний профіль, і такий саме гетерозиготний профіль виявлено у відомої матері при будь-яких конфігураціях однакових алелів у дитини та ймовірного батька, то для визначення показника випадкового збігу використовують показники зустрічальності алелів у популяції материнського походження, оскільки при

такому сполученні алелів невідомо, які саме алелі перейшли від матері до дитини.

Таблиця 7

Формули для розрахунку показника випадкового збігу

Характеристика локусу ДНК матері	Характеристика локусу ДНК дитини	Характеристика алелів у локусі ДНК ймовірного батька					Формула розрахунку
		Можливі варіанти алелів					
а	а	а	а б				$P = p_a (2 - p_a)$
а	а б	б	а б	б с			$P = p_b (2 - p_b)$
а б	а	а	а б	а с			$P = p_a (2 - p_a)$
б с	а б	а	а б	а с	а д		$P = p_a (2 - p_a)$
а б	а б	а	б	а б	б с	а с	$P = P_a (2 - p_a) + p_b (2 - p_b) - 2 p_a p_b$

Після розрахунку показника випадкового збігу P для кожного алеля отримують показник ймовірності і випадкового збігу для всіх досліджених локусів, - кумулятивну ймовірність випадкового збігу алелів. При цьому, проводять перемножування кожного локусного показника між собою:

$$P_{\text{кум}} = P_1 \times P_2 \dots P_n.$$

Отриманий математичний показник вказує, скільки однакових чоловіків, що мають однакові алельні характеристики в межах дослідженої кількості локусів ДНК, наявно на відповідну популяцію.

Дотепер під час проведення багатьох експертиз по встановленню батьківства у «Висновку експерта» наводять показник ймовірності підтвердження батьківства, який вказаний у відсотках. Наприклад, експерт вказує, що показник ймовірності підтвердження батьківства гр-на Х. до дитини Р. становить, наприклад, 99,996%.

Однак, аналіз випадків встановлення батьківства, проведений деякими світовими лабораторіями, показав, що навіть при використанні 9-15 генетичних STR локусів при показнику 97%-99,8% було 2 чоловіки не батьками відповідної дитини із 249 протестованих чоловіків. Таким чином, використання показника ймовірності підтвердження батьківства, вираженого у відсотках, не є об'єктивним (табл. 8).

**Кількість осіб, які мають однаковий досліджений алейний профіль з
урахуванням показника ймовірності батьківства P
та комбінованого індексу батьківства (CPI)**

Ймовірність батьківства (%)	Комбінований індекс батьківства (CPI)	Середня кількість осіб, які мають однаковий досліджений алейний профіль (кількість чоловіків, які не можна виключити)
95	20	1 особа із 20
97	35	1 особа із 35
98	50	1 особа із 50
99	100	1 особа із 100
99,9	1000	1 особа із 1000
99,99	10000	1 особа із 10000
99,999	100000	1 особа із 100000

При проведенні судово-медичних експертиз із визначення батьківства можна визначати показник комбінованого індексу батьківства (CPI) (табл. 9).

Формули для визначення показника індексу батьківства (PI)

Локус	Виявлені алелі у матері	Виявлені алелі у дитини	Виявлені алелі у ймовірного батька	Формула для визначення індексу батьківства (PI) за локусом
1	a	a	a	1/a
2	a	a	аб	1/2a
3	a	аб	аб	1/2б
4	аб	аб	аб	1/(a+б)
5	аб	a	a	1/a
6	аб	аб	a	1/(a+б)
7	аб	a	аб	1/a
8	a	аб	б	1/б
9	аб	бс	с	1/с
10	a	ас	бс	1/2с
11	аб	бс	ас	1/2с
12	ас	ас	бс	1/ [2(a+с)]
13	ас	бс	бс	1/2б
14	ас	с	бс	1/2с
15		аб	бс	1/4б
16		аб	б	1/2б
17		аб	аб	(a+б/4аб
18		б	бс	1/2б
19		б	б	1/б

Для визначення показника комбінованого індексу батьківства (CPI) проводять множення всіх показників індексів батьківства для кожного дослідженого локуса між собою.

Відповідно до прийнятих стандартів (AABB standards) при визначенні походження при тестуванні результат індексу батьківства PI має бути принаймі 100.

Комбінований індекс батьківства вказує, наскільки ймовірно, що вказаний чоловік є джерелом батьківських алелей, ніж те, що цей факт є випадковим збігом алелей.

Ймовірність походження дитини від якогось чоловіка визначається за формулою:

$$W = \frac{(p) (CPI)}{(p) (CPI) + (1-p)} \times 100 = (\%),$$

де: $p=0,5$

CPI – комбінований індекс батьківства

Під час проведення оцінки результатів тестування в деяких експертизах використовують шкалу K.Hummel. Однак, вона є тільки орієнтуючою, і тому не може бути використана у генотипоскопічних дослідженнях.

Порівняння двох підходів до визначення ймовірності батьківства за кумулятивним показником випадкового збігу генетичних ознак та комбінованим індексом батьківства наведено у табл. 10.

Таблиця 10

Порівняння підходів до оцінювання результатів визначення ймовірності батьківства за показниками випадкового збігу генетичних ознак та комбінованим індексом батьківства

Локуси ДНК	Алелі в ДНК крові гр.-на В.	Алелі в ДНК крові гр.-нки Л.	Алелі в ДНК крові дитини Л.
D2S1338	23,26	17,21	17,26
D3S1358	15,17	16,17	15,16
D5S818	11,11	10,11	10,11
D7S820	8,11	10,11	10,11
D8S1179	12,12	12,13	12,13
D13S317	11,12	11,13	11,13
D16S539	10,12	11,13	12,13
D18S51	13,16	12,14	12,13
D19S433	13,14	13,14	13,14
TPOX	8,11	8,8	8,8

CSF1PO	10,12	11,12	10,12
FGA	20,20	20,22	20,20
TH01	6,9	8, 9.3	6,8
vWA	17,18	15,18	15,17
Amelogenin	XУ	XX	XX
Розрахунки			
Локуси ДНК	Алель та його частота	Показник випадкового збігу, р	Індекс батьківства
D2S1338	26: 0,0272	0,0537	18,3824
D3S1358	15: 0,2536	0,4429	1,9716
D5S818	10: 0,0544 11: 0,3926	0,6942	2,2371
D7S820	10: 0,2722 11: 0,1805	0,7004	1,1045
D8S1179	12: 0,1404 13: 0,3252	0,7144	2,1478
D13S317	11: 0,2980 13: 0,1117	0,6715	1,2204
D16S539	12: 0,3023	0,5132	1,6539
D18S51	13: 0,1218	0,2288	4,1051
D19S433	13: 0,2894 14: 0,3410	0,8633	1,5863
D21S11	30: 0,2521	0,4406	1,9833
TPOX	8: 0,5330	0,7819	0,9381
CSF1PO	10: 0,2421	0,4256	2,0653
FGA	20: 0,1390	0,2587	7,194
TH01	6: 0,2049	0,3678	2,4402
vWA	17: 0,2450	0,4299	2,0408
Розрахункові показники		Кумулятивний показник (Кп) випадкового збігу 0, 0000034	Комбінований індекс батьківства 348019
		Ймовірність батьківства: (1-Кп)x100% 99,99966%	Ймовірність батьківства (для ймовірності 0,5) 99,9997%

Таким чином, за отриманими показниками ймовірність батьківства, яка вирахована за двома підходами, є однаковою. Одже, будь-якої переваги у застосуванні вказаних показників немає. Однак, інтерпретація показника ймовірності батьківства, який вирахований шляхом визначення кумулятивного показника випадкового збігу генетичних ознак є більш

зрозумілою, оскільки характеризує кількість осіб, що мають однаковий досліджений генетичний профіль на відповідну популяцію.

Приклад 1.

Позивач П. звернувся до суду з позовною заявою, в якій просить встановити, чи є він батьком дитини, яка народилася 14.06.2010 р. під час його проживання з гр.-кою Р. За цією справою судом було ухвалено провести судово-медичну експертизу, під час якої дати відповідь на питання: «Чи є гр.-н П. біологічним батьком дитини Л, яка народилася у гр.-ки Р. під час його спільного з нею проживання та яка вірогідність цієї події?».

У судово-імунологічному відділенні бюро судово-медичної експертизи було вилучено зразки крові від гр.-на П., гр.-ки Р. та дитини Л. у пластикові пробірки, в яких був наявний антикоагулянт. До проведення генотипоскопічного дослідження зразки крові зберігали в умовах холодильника при температурі +4 град С.

Виділення ДНК із зразків проводили відповідно до методики виділення, яка описана у керівництві до діагностичної панелі. Надалі пробірки із екстрактами центрифугували та видаляли супернатант. До осаду додавали іонообмінну смолу Chelex та інкубували при 56 град С. Надалі вміст пробірок перемішували на Vortex. Отриману суміш інкубували при температурі 100 град впродовж 8 хвилин.

Молекулярно-генетичне дослідження

Із досліджувального зразку виділено 50 нг ДНК, що є достатнім для ПЛР

Локуси ДНК	Алелі в ДНК крові гр.-на П.	Алелі в ДНК крові гр.-нки Р.	Алелі в ДНК крові дитини Л.
D2S1338	23,26	17,21	17,26
D3S1358	15,17	16,17	15,16
D5S818	11,11	10,11	10,11
D7S820	8,11	10,11	10,11
D8S1179	12,12	12,13	12,13
D13S317	11,12	11,13	11,13
D16S539	11,12	11,13	12,13
D18S51	13,16	12,14	12,13
D19S433	13,14	13,14	13,14
TPOX	8,11	8,8	8,8
CSF1PO	10,12	11,12	10,12
FGA	20,20	20,22	20,20
TH01	6,9	8,9.3	6,8
vWA	17,18	15,18	15,17

Amelogenin	XУ	XX	XX
------------	----	----	----

Розрахунок показників випадкового збігу

Локуси ДНК	Алелі, які аналізують	Частота алеля	Формула розрахунку	Показник випадкового збігу
D2S1338	26		$p_a (2-p_a)$	0,0537
D3S1358	15		$p_a (2-p_a)$	0,4429
D5S818	10,11		$P_a (2-p_a) + p_b(2-p_b) - 2 p_a p_b$	0,6942
D7S820	10,11		$P_a (2-p_a) + p_b(2-p_b) - 2 p_a p_b$	0,7004
D8S1179	12,13		$P_a (2-p_a) + p_b(2-p_b) - 2 p_a p_b$	0,7144
D13S317	11,13		$P_a (2-p_a) + p_b(2-p_b) - 2 p_a p_b$	0,6715
D16S539	12		$p_a (2-p_a)$	0,5132
D18S51	13		$p_a (2-p_a)$	0,2288
D19S433	13,14		$P_a (2-p_a) + p_b(2-p_b) - 2 p_a p_b$	0,8633
TPOX	8		$p_a (2-p_a)$	0,7819
CSF1PO	10		$p_a (2-p_a)$	0,4256
FGA	20		$p_a (2-p_a)$	0,2587
TH01	6		$p_a (2-p_a)$	0,3678
vWA	17		$p_a (2-p_a)$	0,4299
Показник кумулятивної ймовірності випадкового збігу				0,0000034

Висновок

1. При молекулярно-генетичному дослідженні крові дитини Л. виявлено алельні характеристики, які наявні у досліджених 14 локусах ДНК крові гр.-на Р та гр.-нки Л.
2. За результатами математичного підрахунку показник кумулятивної ймовірності випадкового збігу для 14 досліджених локусів ДНК становить 0,0000034. Це означає, що зазначене поєднання генетичних ознак зустрічається у 34 чоловіків на 10 млн осіб.

Приклад 2.

Позивачка С. звернулася до суду з позовною заявою, в якій просить встановити, чи є гр.-н В. батьком дитини Д., яка народилася 24.12.2009 р. під час її спільного проживання з гр.-ном В. За цією справою судом було ухвалено провести судово-медичну експертизу, під час якої дати відповідь на питання: «Чи є гр.-н В. біологічним батьком дитини Д., яка народилася у гр.-

ки С. під час його спільного з нею проживання та яка вірогідність кровного походження дитини від відповідача В.?».

У судово-медико-імунологічному відділенні бюро судово-медичної експертизи було вилучено зразки крові від гр.-на В., гр.-ки С. та дитини Д. у пластикові пробірки, в яких був наявний антикоагулянт. До проведення генотипоскопічного дослідження зразки крові зберігали в умовах холодильника при температурі +4 град С.

Виділення ДНК із зразків проводили відповідно до методики виділення, яка описана у керівництві до діагностичної панелі. Надалі пробірки із екстрактами центрифугували та видаляли супернатант. До осаду додавали іонообмінну смолу Chelex та інкубували при 56 град С. Надалі вміст пробірок переміщували на Vortex. Отриману суміш інкубували при температурі 100 град впродовж 8 хвилин.

Генотипоскопічне дослідження

Із досліджувального зразку виділено 100 нг ДНК, що є достатнім для ПЛР.

Локуси ДНК	Алелі в ДНК крові гр.-на В.	Алелі в ДНК крові гр.-нки С.	Алелі в ДНК крові дитини Д.
D2S1338	23,26	17,21	<u>17,25</u>
D3S1358	15,17	16,17	15,16
D5S818	11,11	10,11	10,11
D7S820	8,11	10,11	10,11
D8S1179	12,12	12,13	12,13
D13S317	11,12	11,13	11,13
D16S539	11,12	11,13	12,13
D18S51	13,16	12,14	<u>12,15</u>
D19S433	13,14	13,14	13,14
TPOX	8,11	8,8	<u>8,10</u>
CSF1PO	10,12	11,12	10,12
FGA	20,20	20,22	20,20
TH01	6,9	8,9.3	6,8
vWA	17,18	15,18	15,17
Amelogenin	XУ	XX	XУ

Висновок. При молекулярно-генетичному дослідженні в ДНК крові дитини Д. гр.-нки С. за локусами D2S1338, D18S51 та TPOX виявлені алелі, які не властиві алельній характеристиці вказаних локусів ДНК гр.-на В. Таким чином, гр.-н В. не являється біологічним батьком дитини Д. гр.-нки С.

16.ОСОБЛИВОСТІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФІЛЮ ДНК БІОЛОГІЧНИХ ЗРАЗКІВ, В ЯКИХ НАЯВНА СЛІДОВА ЇЇ КІЛЬКІСТЬ

Зазвичай, ДНК-аналізу підлягають біологічні об'єкти, які мають прийнятну для дослідження кількість клітинного матеріалу з достатнім вмістом ДНК. Встановлено, що для отримання її профілю необхідно не менш, ніж 250-500 нг ДНК, що з урахуванням її втрат під час процедури виділення відповідає наявності близько 50 ядерних клітин.

Однак, в криміналістичній практиці трапляються випадки, коли на речових доказах присутні біологічні об'єкти, в яких наявний слідовий вміст ДНК або незначна кількість клітинного матеріалу. Поняття «слідова кількість ДНК» відноситься до таких біологічних зразків, які є досить обмеженими у своїх розмірах або невидимі та мають вміст ДНК, який менше за 100 pg. Це стосується, зокрема, слідів крові та слину, поодинокого волосся, слідів від губ людини, відбитків пальців на різних предметах-носіях тощо. Дослідження таких слідів має низку особливостей, які необхідно враховувати.

Пошук біологічного об'єкту, на якому може бути присутня ДНК. Ідеальним методом для виявлення біологічних об'єктів є інструментальна детекція. Наприклад, використання джерела ультрафіолетового чи люмінесцентного випромінювання, що дозволяє виявити біологічні об'єкти, наприклад, пальцеві відбитки, нашарування рідин тіла та інші біологічні речові докази на різних предметах-носіях. Для цього досить активно використовують прилад **Polilight®**, який випромінює високоінтенсивне світло із довжиною хвиль в межах 380-650 нм. Що ж стосується відбитків пальців рук, то вони являють собою потожирові нашарування, і їх найчастіше

під час огляду місця події візуалізують за допомогою дактилоскопічних порошків.

Однак встановлено, що тільки деякі дактилоскопічні порошки, такі як Faurot white, BVK DA, Magnetio black, Special black не впливають на ДНК профіль сліду-відбитку, а інші унеможливають з'ясування профілю ДНК. ДНК найкраще виявляється, якщо зразок вилучено якнайшвидше з предмету-носія після його обробки дактилоскопічними порошками.

Вилучення об'єкту, на якому може бути ДНК, з предмету-носія. Відбір зразків з поверхонь, де може бути наявна ДНК у мінімальній чи слідовій кількості, проводять шляхом отримання мазків. Для цього використовують вологий марлевий тампон, яким декілька разів протирають із натисканням необхідну поверхню. Однак, вологі марлеві тампони не дозволяють вилучити весь клітинний матеріал. Вважають, що таким чином можливо вилучити лише половину, а то й меншу кількість біологічного об'єкту. У зв'язку із цим рекомендується проведення подвійного вилучення, а саме: спочатку ділянку протирають першим вологим тампоном, а потім цю ж саму поверхню протирають сухим тампоном. В подальшому ці два тампони об'єднують для отримання ДНК. Крім обробки поверхні зволуженим водою тампоном використовують також тампони зволожені 0,01% розчином натрію додецилсульфату чи ізопропанолом.

Необхідно враховувати, що із тампону, який виготовлений із бавовни, не вся кількість наявної на ньому ДНК може бути в подальшому вилучена, а також те, що ДНК із вологого тампону вилучається краще, ніж із сухого. Тому рекомендують зразу ж після обробки поверхні-носія ДНК вологим тампоном його заморожувати, а не висушувати, Це дозволяє за умов такого зберігання зразку майже повністю вилучити ДНК.

Крім того, існує можливість вилучення біологічного об'єкту на спеціальну адгезивну плівку.

Технологія підготовки ДНК до ПЛР її проведення. Процедуру виділення ДНК проводять відповідно до вимог діагностичного набору. Після

виділення ДНК із об'єктів проводять її концентрацію з використанням відповідних колонок, що сприяє більш повному отриманню ДНК. Для мінімізації втрат ДНК використовують додаткове введення, наприклад, Poly A RNA або ДНК сперми лосося.

Важливим етапом з'ясування профілю ДНК є її ампліфікація, під час якої при діагностиці мінімальних кількостей ДНК застосовують більшу кількість циклів ПЛР, наприклад 34. Крім того, рекомендується дещо змінити процедуру проведення ПЛР, а саме, після 28 циклів ПЛР додають додаткову кількість TAQ полімерази, а потім проводять ще 6 циклів ПЛР. Такі зміни дозволяють напрацювати необхідну кількість матеріалу для подальшого аналізу. Крім того, зараз вже розроблено регламенти проведення досліджень та розроблено діагностичні набори, за допомогою яких можливо з'ясувати профіль із 17 локусів ДНК, кількість якої становить 60 pg.

Попередження контамінації. Необхідно мати на увазі, що профіль ДНК, отриманий із її слідової кількості, має інтерпретуватися з точки зору можливої контамінації. Зразок може вміщувати фонову кількість ДНК, внесену ДНК, пов'язану із скоєнням кримінального злочину та ДНК, яким контаміновано зразок після скоєння кримінального злочину.

Враховуючи наведене, рекомендується застосовувати низку заходів з попередження контамінації. Так, зокрема, біологічні об'єкти, де наявна ДНК, та які можуть бути використані для наступного з'ясування профілю ДНК, необхідно під час огляду місця події якнайшвидше відмежувати від зовнішнього середовища шляхом використання спеціального протективного засобу. Для цього нами рекомендовано використовувати спеціальну поліетиленову плівку, яка безпосередньо не контактує з об'єктом дослідження та дозволяє уникнути контамінації зразку сторонньою ДНК і дещо відстрочити процедуру вилучення зразка з об'єкта-носія.

Крім того:

- на місце пригоди має мати доступ лише необхідно мінімальна кількість осіб. Доступ будь-яких інших осіб має бути різко обмежений;

- у разі обстеження речових доказів, на яких можуть бути біологічні сліди, обов'язково необхідно використовувати перчатки та маски. Такої вимоги мають дотримуватися особливо ті особи, які досить близько знаходяться до місця розташування біологічних слідів.
- під час вивчення на місці події речових доказів має бути регулярна заміна печаток, особливо при обстеженні тих об'єктів, де можуть бути біологічні сліди із ДНК;
- необхідно виключити можливість контакту будь-яких осіб із ділянкою, де може знаходитись ДНК;
- під час проведення аналізу ДНК, яка вилучена із об'єктів, знайдених на місці події, обов'язково мають бути досліджені ДНК профілі всіх осіб, які приймали участь в огляді місця події.

Інтерпретація результатів ПЛР. Інтерпретація результатів профілю ДНК, отриманого із об'єкту із її слідовою кількістю, потребує іншого підходу, ніж інтерпретація профілю ДНК із звичайної її кількості. Як доведено, в результаті ампліфікації поодиноких клітин проявляється стохастичний ефект, внаслідок якого відбувається як переважна ампліфікація, так і зникнення окремих алелів. Встановлено, що при звичайній ампліфікації 250 пг ДНК, що відповідає приблизно 35 ядерним соматичним клітинам, не завжди можливо отримати якісний профіль ДНК. Це обумовлено тим, що інтерпретувати пікі алелів ДНК можливо тільки тоді, коли їх інтенсивність складає не менше 150 RFU (Relative Fluoresc. Unit). При ампліфікації 125 пг ДНК та її меншої кількості висота піків наближається до фонового рівня – шумів приладу і становить близько 50 RFU. У зв'язку з цим рекомендується поріг для виявлення ДНК і становить саме 250 пг.

Дослідження зразків, в яких менш, ніж 100 пг ДНК, має назву Low Copy Number (LCN). За рекомендаціями провідних країн з дослідження ДНК інтерпретація ПЛР у таких випадках має ґрунтуватися на результатах проведення 2-х ампліфікацій (для США - має бути проведено паралельно три

ампліфікації) одного й того ж зразку. Причому, в кожній ампліфікації мають бути виявлені однакові алелі, а для США – однакові алелі в 2-х із 3 проведених паралельних ампліфікаціях.

Таким чином, врахування та дотримання вказаних особливостей забезпечує доказовість з'ясування профілю ДНК у біологічних об'єктах, в яких наявна слідова її кількість.

17. ФОРМУВАННЯ АРХІВУ

В Рекомендаціях ENFSI (п. 28) зазначається, що "З судової точки зору клітинний матеріал стандартних зразків необхідно зберігати разом з відповідним зразком ДНК впродовж одного й того ж часу". Кримінально-процесуальний кодекс України (ст.69) регламентує, що експерт зобов'язаний забезпечити збереження об'єкта експертизи. У зв'язку із вказаним постає питання формування архіву ДНК-досліджень.

ДНК-архів необхідний, перш за все, для проведення повторної експертизи надісланих для аналізу біологічних зразків. Особливої актуальності набуває архівування біологічного матеріалу у випадках кримінальних злочинів.

Архів може бути сформований різними шляхами:

- використанням мінімально необхідної кількості зразку для ДНК-аналізу, у зв'язку із чим на етапі пробопідготовки із надісланого об'єкта вилучають необхідну кількість об'єкта для дослідження, а решту залишають в якості архівного матеріалу. Архівний матеріал зберігають у запечатаному вигляді у пластикових чи папорових пакетах чи коробках в умовах морозильної камери при -18 град С. Після отримання результатів та складання Висновку експерта цей матеріал передають слідчому відповідно до існуючої процедури.
- зберіганням частини виділеної ДНК із проби у ефективній для ПЛР кількості, яку розраховують математично з урахуванням виду зразку, потенційного вмісту в ньому ДНК, його надісланої кількості, стану об'єкту. Переважним розчином для виділення ДНК із зразка є фенольна екстракція, а самі екстракти зберігають у морозильній камері при -18 град С.
- архівуванням гель-електрофоретичних блоків шляхом тримання у розчині 3% оцтової кислоти або шляхом висушування до повного видалення вологи без скорочення геля. Наприклад, поліакриламідні та агарозні гелі занурюють на декілька хв. у 30% (маса/об'єм) мурашину кислоту, а потім наклеюють

синтетичним клеєм на гладку поверхню дошки из твердої деревини, де гель висихає при кімнатній температурі за 2-3 доби.

Висушені гелі знову набухають у воді або 7% розчині оцтової кислоти за 3-4 години при +70 град С.

Поліакриламідні гелі можливо висушити між целофановими плівками попередньо їх зафіксувавши у відповідній рамці із пройомами по краю контуру. Для цього одну частину рамки для сушки гелю розташовують на столику та розміщують на ній прямокутник мокрої целофанової плівки, а на неї кладуть гелювий блок, розміри якого дещо менші за розмір рамки. Зверху на гелювий блок кладуть такий же прямокутник целофанової плівки. Бульбашки повітря між гелем та плівкою зміщують на край гелю. Надалі на рамку кладуть іншу рамку, а в пройоми по краю контуру рамки вдвигають зажими. Гелювий блок у рамці у горизонтальному положенні розміщують під потоком повітря від фену для просушування на декілька хвилин. Надалі просушують таким же чином зворотній бік рамки з гелювим блоком. Після того, як гелювий блок злегка висох та зафіксувався між плівками, рамку розміщують у вертикальному положенні до висихання. Такі сухі гелі придатні для денситометрії, фотографування або зберігання у якості архіву. - архівуванням комп'ютерного аналізу результатів ДНК-дослідження у електронній формі.

Таким чином, як зразки, які досліджувалися, так і отримані із них ДНК-профілі, мають зберігатися.

17. ЛІТЕРАТУРА

1. Єрмолаєва А.О. Особливості збирання, зберігання та направлення біологічних слідів людини на молекулярно-біологічну експертизу. /А.О.Єрмолаєва, В.І. Лагус// Методичні рекомендації /ДНДЕКЦ МВС України. – К., 2006.
2. Кожухова Н.Е., Кривда Г.Ф., Кривда Р.Г., Сиволап Ю.М., Суліма Ю.Ю., Чеботар С.В. Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах: Науково-практичне видання / За ред. Ю.М. Сиволапа та Г.Ф.Кривди. – Одеса. Одеський державний медичний університет, 2001.
3. Кривда Г.Ф. ПЛР–аналіз молекулярно-генетичного поліморфізму людини в судовій медицині / Г.Ф. Кривда //Автореф. дис. докт.мед. наук. - К., 2003.- 32 с.
4. Кривда Р.Г. Ідентифікація особи в судовій медицині на основі ПЛР-аналізу геномної ДНК кісткової тканини/Р.Г. Кривда // Автреф. ... канд.меднаук.- К., 2009 . – 20 с.
5. Старовойтова Р.О. Судово-медична цитологія / Р.О. Старовойтова, В.Д. Мішалов, Г.Ф. Кривда // Одеса:Астропринт, 2007.- С.72.
6. Иванов П.Л. Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установлении родства. / П.Л. Иванов // Судебно-медицинская экспертиза. – 1999 - №5, с.35-41.
7. Иванов П.Л. Судебно-медицинская экспертиза, 2003. - № 1. – С.32-33.
8. Культин А.Ю. Криминалистическое исследование локусов ДНК костных останков человека в целях идентификации личности /А.Ю. Культин, И.И. Стороженко, М.Г. Пименов, С.А. Кондрашов // Методические рекомендации.- М., 2004.- 40 С.

9. Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа/М.Г. Пименов, А.Ю. Культин, С.А. Кондрашов // ГУ ЭКЦ МВД России, 2001.- 144 С.
10. Перепечина И.О. Вероятностные расчеты в ДНК-дактилоскопии. Методические рекомендации / И.О. Перепечина, С.А. Гришечкин // М., 1996 . – 16 С.
11. Томилин В. В. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств /В. В. Томилин, Л.О. Барсегянц, А. С. Гладких. - М., 1989.
12. Balding D., J., Buckleton J. Interpreting low template DNA profiles // *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2009 – V.4.- P.1-10.
13. Barash M., Reshef A., Brauner P. The use of adhesive tape for recovery of DNA from crime scene items // *J. Forensic Sci.*, 2010 – V. 55- 1058-1064.
14. Butler J.M. Genetics and Genomix of Core Short Tandem Repeat Loci used in Human Identity Testing / J.M. Butler // *J. Forensic Med.*- 2006.- V.51.- №2 – P.253-265.
15. DNA Paternity Test show Probability of Paternity of 99% in non-fathers.
16. DNA-database management review and recommendations. // ENFSI DNA Working Group. 2012.
17. Foster L., Thomson J., Kutanov S. Direct comparison of post-28 –cycle PCR purification and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle “low-copy-number (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples // *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2008 – V.2.- P.318-328.
18. Gill P., Whitaker J., Flaxman C., Brown N., Buckleton J. // An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA // *Forensic Sci Internat.*,2000 – V.112. – P. 17-40.
19. Greer C.E., Peterson S.L., Kiviat N.B., Manos M.M. *Am. J.Clin. Pathol.*, 1991.- P.95-117.
20. Pang BCM, Cheung BKK. Double swab technique for collecting touched evidence // *Legal Med*, 2007 – V.9 – P.181-184.
21. Van Oorschot R,A,H, Schulz R.A., Holding N.L., Cummins M., Phelan D., Mitchell R.J. Improving collection methods can improve the ability to obtain typing from trace amounts of DNA from touched objects // *The XIX Congress of Genetics*, 2003 – Proceedings.
22. Van Oorschot R. A,H, Ballantyne K.N., Mitchell R.John. Forensic Trace DNA: a review. // *Invest.Genetics*, 2010.- 1: 10.1186/2041-2223-1-14.
23. Raymond J.J. A criminalistic Approach to biological evidence: trace DNA and volume crime offences // *Sydney*, 2010, 266 P.
24. Roland A.H. van Oorschot, Kaye N., Ballantine, R., John Mitchel. Forensic trace DNA: a review // *Investigative Genetics*, 2010. – 1:14 doi:1186/2041-2223-1-14.