

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ
ДНК ИЗ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ОБЪЕКТОВ
СУДЕБНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»**

Студент

Елистратова Елена Валерьевна

Руководитель

Кручинина А.Д.

Рецензент

Дружинина Т.А.

Нормоконтролер

Солдатов С.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 20.05.24 № 12)

Заведующий кафедрой

Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

отлично

(протокол заседания ГЭК от 20.06.24 № 4)

Секретарь ГЭК

Клыченков С.В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. История выделения нуклеиновых кислот	6
1.2. Основные принципы и этапы выделения нуклеиновых кислот	8
1.3. Методы и средства изъятия, упаковки и транспортировки различных объектов биологического происхождения, содержащих ДНК	10
1.4 Методы выделения ДНК, используемые в судебно-биологических исследованиях	15
1.5. Выделение ДНК из объектов, изъятых с мест преступлений, с использованием различных коммерческих наборов.	20
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	39
3.1. Результаты установления количества и качества ДНК.....	39
3.2. Анализ полученных результатов.....	41
3.3. Сравнение различных способов выделения ДНК: преимущества и недостатки.....	50
ВЫВОДЫ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность: Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является важным источником доказательств в системе уголовного правосудия с тех пор, как она впервые была использована в судебных расследованиях [21].

Анализ ДНК часто используется для получения информации из биологического материала, чтобы помочь в расследовании уголовных преступлений против жизни, здоровья и половой неприкосновенности граждан, идентификации жертв стихийных бедствий и поиске лиц, пропавших без вести. По мере того, как растет актуальность и ценность профилирования, развиваются методы молекулярно-генетического исследования в судебной медицине [34].

Судебно-медицинским экспертам часто приходится иметь дело с посмертными образцами и следами биологических выделений человека, собранными в ходе изучения места криминальных событий, которые подвергались воздействию условий окружающей среды, вызывающих их деградацию и затрудняющих их изучение. Биологические объекты, захороненные в различных типах почв, часто обнаруживаются на местах преступлений. Эти сложные образцы содержат незначительные количества ДНК с присутствием различных ингибиторов, которые затрудняют процесс извлечения и амплификации и, как следствие, установление их генетического профиля [53].

Процедуры, используемые при выделении и извлечении ДНК, варьируются в зависимости от типа биологического образца и типа носителя, на котором он хранится. Оптимальная процедура извлечения ДНК должна быть нетоксичной, быстрой и экономичной и должна позволять извлекать ДНК высокой степени очистки из каждого образца. Однако не существует “универсальной” процедуры извлечения ДНК, которая удовлетворяла бы всем этим требованиям. В последние годы были разработаны различные

коммерческие наборы для извлечения образцов ДНК для судебной экспертизы [26].

В экспериментальном исследовании использовали: ткани и выделения человека, изымаемые с осмотров мест происшествий в следовых количествах, а также ткани неопознанных трупов.

Выделение ДНК проводили следующими методами: выделение ДНК на магнитных частицах, выделение с использованием ионообменной смолы Chelex 100.

Целью работы является проведение сравнительной характеристики методов выделения ДНК из криминалистически значимых объектов биологического происхождения в зависимости от количества, качества объектов, а также давности происхождения следа.

Сравнительная характеристика различных методов выделения ДНК из криминалистически значимых объектов судебной биологической экспертизы позволяет оптимизировать выбор метода выделения ДНК из объектов биологического происхождения.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Рассмотреть основные методы экстракции ДНК из криминалистически значимых объектов;
2. Выбрать оптимальные методы изъятия различных объектов биологического происхождения с осмотров мест происшествия, а также особенности их пробоподготовки;
3. Оценить количество выделенной ДНК в следах, предоставляемых на судебно-биологическую экспертизу.
4. Выбрать оптимальные методы выделения ДНК, исходя из качества предоставляемых объектов исследования.

Практическая и теоретическая значимость: результаты исследования различных методов экстракции ДНК из объектов биологического происхождения позволяют определить оптимальные способы исследования

вещественных доказательств. Материалы исследования могут быть применены в практической деятельности экспертов-биологов в повседневной работе при производстве судебно-биологических экспертиз и исследований.

Магистерская работа выполнена 62 страницах, содержит 28 рисунков, 2 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 54 источников.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. История выделения нуклеиновых кислот

В середине 19 века биохимия была развивающейся наукой. Одна из первых лабораторий, была расположена в бывшей кухне средневекового замка Тюбингена (рис. 1) [20,34]. Здесь первые исследователи-биохимики пытались обнаружить молекулы, из которых состоят живые существа, и охарактеризовать их свойства. Сегодня биохимическая лаборатория Тюбингена наиболее известна благодаря работам швейцарского врача Фридриха Мишера (1844-1895) (рис. 1) и его открытием молекулы ДНК.

В 1868 году Ф. Мишер присоединился к исследовательской группе Феликса Хоппе-Сейлера, тогдашнего руководителя лаборатории, для изучения состава клеток.

В качестве исходного материала он выбрал лейкоциты из человеческого гноя, надеясь, что анализ клеток, которые не встроены в ткань, облегчит идентификацию молекулярных строительных блоков, из которых состоят клетки. В течение следующих месяцев Ф. Мишер продолжал делать свои самые важные открытия, кульминацией которых в начале 1869 года стало выделение и характеристика вещества, которое он назвал “Нуклеин” (название, производное от латинского слова "ядро") [28].

Основываясь на своих анализах, Ф. Мишер понял, что нуклеин химически отличается от всех других типов молекул, известных в то время. После своего первоначального открытия и химической характеристики нуклеина Ф. Мишер продолжил доказывать, что нуклеин присутствует в ядрах всех типов клеток, которые он исследовал, и постулировал, что он химически определяет ядро. Важно отметить, что он считал нуклеин “равным [по важности] белкам” [27]. Позже он даже высказывал предположения о роли нуклеина в пролиферации клеток, а также в наследственности и оплодотворении. Учитывая ограниченность знаний и экспериментальных подходов, доступных в то время, Ф. Мишер не смог самостоятельно доказать свои предвидения [27].

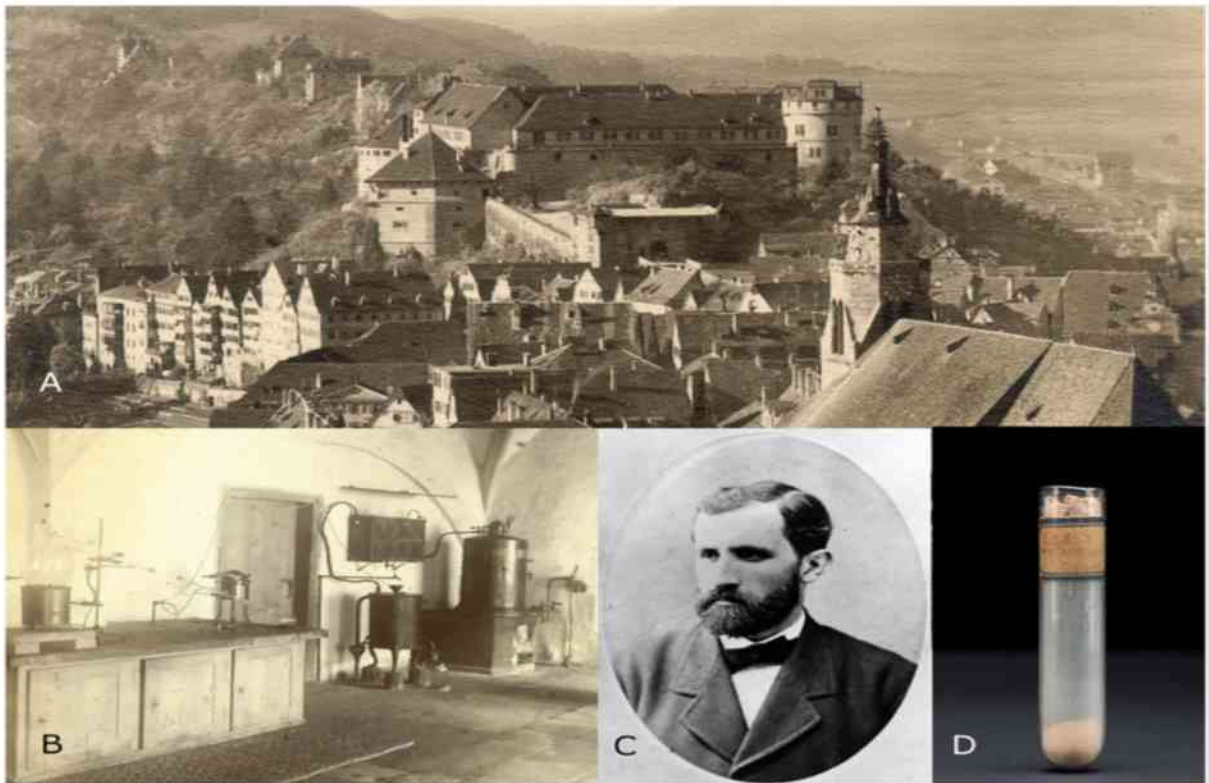


Рисунок 1. (А) Тюбингенский замок. (Б) Биохимическая лаборатория Тюбингенского замка. (В) Фридрих Мишер. (D) Флакон с нуклеином, полученный Мишером из спермы лосося в 1871 году и проанализированный в этом исследовании

Исследования Ф. Мишера были в значительной степени забыты до середины 20-го века, пока не появились первые эксперименты подтверждения его теорий [28].

Сегодня Ф. Мишера помнят только в качестве человека, открывшего ДНК. Учитывая тот факт, что ядро также содержит РНК, которая, вероятно, вела себя очень похоже на ДНК в протоколах, которые Ф. Мишер использовал для выделения своего нуклеина, представляется вероятным, что он также был первым, кто выделил РНК.

Выделенный Ф. Мишером образец “современного” нуклеина содержал значительный процент РНК, что было показано с помощью гель-электрофореза и флуорометрических РНК-специфических анализов продуктов гидролиза [27].

В 1957 году М. Мезельсон и Ф. Сталь разработали иной протокол для извлечения ДНК, в котором для выделения ДНК из бактерий *E. coli* использовалось центрифугирование в градиенте плотности. В 1988 году С.А. Миллер с коллегами применили для экстракции ДНК протеиназу К — фермент, который расщепляет пептидные связи в белках и способствует их отделению от нуклеиновых кислот. А еще позже Д. Сэмбрук и Л. Рассел предложили один из самых популярных методов экстракции ДНК при помощи фенол-хлороформа и изоамилового спирта.

Так к середине XX века были разработаны основные принципы работы с нуклеиновыми кислотами [8].

Во второй половине 80-х годов методы молекулярной генетики начинают внедряться в практику судебно-медицинской экспертизы. Главным вопросом судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств является вопрос о происхождении следов с мест преступлений от конкретного лица [5].

Передовым достижением, позволяющим по-новому подойти к проблеме идентификации биологического следа, стало использование методов ДНК анализа [36,37]. Методы анализа ДНК оказались исключительно интересны для криминалистического исследования, поскольку ДНК обладает индивидуальной специфичностью (совпадает только у однояйцевых близнецов), одинакова в любой клетке, содержащей ядро, и неизменна на протяжении всей жизни человека [52].

1.2. Основные принципы и этапы выделения нуклеиновых кислот

Условно все методы экстракции нуклеиновых кислот можно разделить на химические и физические.

Поскольку экстракция нуклеиновых кислот является первым этапом выделения, высокое качество нуклеиновых кислот в исходных образцах является ключевым фактором успеха последующих этапов анализа [6]. Таким образом, экстракцию нуклеиновой кислоты можно определить как серию

стадий для получения образцов/материалов нуклеиновой кислоты особой чистоты, которые не содержат примесей и подходят для различных последующих стадий исследования. Для извлечения чистой нуклеиновой кислоты необходимо разрушить клеточную оболочку и максимально удалить липиды и белки. В основном это основано на адсорбции веществ на кремнеземных мембранах/гранулах, анионообменной хроматографии, осаждении и использовании магнитных частиц. Эти методы позволяют получить исходные образцы нуклеиновых кислот различной чистоты и концентрации в зависимости от исходного образца (бактерии, вирусы, ткани) [6].

Выбор метода – с учетом оптимального соотношения времени и качества – зависит от цели исследования, типа анализа, типа нуклеиновой кислоты и стоимости. Важно обеспечить соответствующие условия для экстракции нуклеиновой кислоты, чтобы избежать ее деградации из-за окисления активными формами кислорода, образующимися при *дыхании in vivo* [17].

Существует три основных этапа выделения нуклеиновых кислот:

1. Лизис клеток
2. Удаление загрязняющих белков, нуклеиновых кислот и солей, а также дезактивирующих ДНК-азы или РНК-азы.
3. Восстановление ДНК или РНК [23].

Этап 1: лизис клеток

Первым этапом выделения нуклеиновых кислот является разрушение клеточной стенки и / или мембраны для высвобождения генетического материала. Это достигается с использованием лизирующего буфера, роторного гомогенизатора, бисерной мельницы, циклов замораживания-оттаивания или обработки ультразвуком. Лизирующий буфер содержит детергент, помогающий разрушать клеточные мембраны, и фермент, такой как протеиназа К, для расщепления белковых компонентов [11]. Гомогенизатор и бисерная мельница обеспечивают грубое механическое

измельчение ткани и разрушение клеток. При лизисе клеток образуется раствор, в котором клеточное содержимое больше не разделено на отдельные части. Следовательно, ДНК- и РНК-азы угрожают ферментативным разрушением генетического материала. ЭДТА может быть использована для дезактивации ДНК-азы путем хелатирования двухвалентных ионов, необходимых для ферментативной активности, а РНК-азы необратимо разрушаются бета-меркаптоэтанолом. Кроме того, для снижения вероятности загрязнения РНК-азами из окружающей среды важно использовать воду, обработанную DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*), и буферные растворы, носить перчатки и поддерживать чистоту рабочего места [11].

Этапы 2 и 3: Удаление загрязняющих веществ и восстановление ДНК и РНК.

Очистка. После разрушения клеточной и ядерной мембран возникает необходимость удалить примеси — другие вещества, из которых состоят клетки. Добавление концентрированного солевого раствора приводит к выпадению осадка, в котором содержатся белки, липиды и сахара. Нуклеиновые кислоты остаются в растворе, лучшему отделению их от осадка способствует центрифугирование. Удалению белков также помогает добавление протеиназы, которая их расщепляет и позволяет отделять от нуклеиновых кислот.

Элюирование. Осадок можно отделить от раствора при помощи центрифугирования (в градиенте при 12 000 об/мин.) [11].

1.3. Методы и средства изъятия, упаковки и транспортировки различных объектов биологического происхождения, содержащих ДНК

Результативность генотипической экспертизы напрямую зависит от качества и количества ДНК, полученной в результате множества методических действий, которые начинаются на этапе обнаружения объекта (рис.2.), содержащего ДНК на осмотре места происшествия, до получения очищенной ДНК, используемой для анализа. Препараты и реагенты, которые

используются в процессе исследования, факторы внешней среды приводят к потерям и деградации ДНК, а следовательно, к невозможности получения положительного результата экспертизы [7].



Рисунок 2. Криминалистически значимые объекты биологического происхождения, изымаемые с мест преступлений (слюна, сперма, потожировые следы, костный материал, волосы, влагалищные выделения, кровь

После предварительного осмотра и предварительного исследования объектов биологического происхождения на месте происшествия проводят изъятие и упаковку следов и предметов, согласно регламентирующей документации. При этом необходимо соблюдать приемы и методы, которые должны обеспечивать сохранность следов для дальнейшего генетического исследования [7].

Сохранение улик, собранных на местах преступлений

А. Следы биологической природы, такие как волосы, должны быть заморожены, чтобы можно было проанализировать любые корневые

оболочки или другие остатки, такие как кровь, если таковые имеются, на наличие ДНК. Однако, даже если на волосах нет корневого материала или посторонних примесей, волосы все равно могут быть пригодны для анализа митохондриальной ДНК и все равно должны оставаться замороженными [12].

В. Большинство других следовых данных можно хранить при комнатной температуре в контролируемой среде, за исключением случаев, когда существует вероятность физического уничтожения биологических доказательств. Если это так, то эти следы следует хранить в морозильной камере.

С. Если на месте происшествия собраны вещественные доказательства, на внешней поверхности упаковки объекта должно быть указано, следует ли хранить содержимое замороженным или при комнатной температуре. Эта информация также должна быть доведена до сведения остальных отвечающих специалистов-криминалистов [45].

Сбор контрольных образцов на местах преступлений

Сбор контрольных образцов с места происшествия, таких как образцы ковров, обивки мебели и почвы, должен производиться своевременно, еще на месте происшествия. В некоторых случаях может потребоваться дополнительный контроль после того, как изделия были исследованы в лаборатории [3].

Если материал, из которого отбирается контроль, поврежден в некоторых местах либо в результате износа, под влиянием химических агентов, под воздействием окружающей среды (например, под воздействием солнца), следует взять образцы как с поврежденного участка, так и с неповрежденного участка [3].

При сборе контрольных образцов из салона автомобиля необходимо собрать волокна обивки, а также ковра и, при наличии, напольных ковров и чехлов для сидений.

Объекты биологического происхождения, изымаемые для проведения генетического исследования, следует собирать следующим образом:

- изъятие следов с предметом носителем (чаще всего это изъятие предметов одежды, постельных принадлежностей, на которых имеются следы биологического происхождения), необходимо упаковать его в бумажный пакет или конверт;

- следы слюны поступают на исследования на таких предметах как окурки, жевательная резинка, посуда, медицинские маски, одежда, и изымаются с предметом-носителем [7].

- с предметов мебели и других громоздких предметов пятна крови, слюны и потожирового вещества изымают с частью предмета (выпилы, вырезы), мелкие предметы изымаются целиком [7].

- если предмет транспортировать невозможно, его не упаковывают, но защищают следы на поверхности данного объекта, например, листом писчей бумаги проклеенной по периметру лентой «скотч»;

- соскобом изымают наслоения засохшей крови, образующие на твердой основе следы размерами более 2,0x2,0 см. Изъятие проводится в резиновых перчатках скальпелем. Перчатки и скальпель обрабатываются спиртовым раствором. При проведении соскоба необходимо стремиться изымать наслоения без предмета носителя. Полученный соскоб помещают в сверток, изготовленный из чистого листа бумаги, по своим размерам соотносящийся с размером пятна крови, затем в конверт. Образец предмета носителя изымают аналогично и упаковывают в отдельный сверток [7];

- смыв проводится с твердой поверхности предмета носителя следов крови, как сухих (наслоения), так и «влажных». Предмет носитель слегка увлажняется дистиллированной водой, после чего вещество переносится на фрагмент марли. Размер фрагмента марли зависит от размера пятна и не должен превышать его в 2 раза. Недопустимо при выполнении смыва чрезмерно увлажнять поверхность предмета носителя и использовать фрагменты марли большого размера, что приводит к снижению

концентрации вещества изымаемого следа [7]. При изъятии «влажных» следов крови или в случаях, когда кровь образует «лужи», предмет носитель не увлажняют. До помещения в упаковку фрагмент марли с изъятим веществом необходимо просушить вдалеке от обогревательных приборов, не допускается попадание прямых солнечных лучей. Затем упаковать в бумажный пакет или бумажный конверт.

- сворачивание предметов (например, одежды, постельного белья) с непросохшими следами, предварительно не проложив данные следы листами бумаги (по возможности более плотной (например, обои), либо в несколько слоев (в случаях использования, газетных листов или писчей бумаги) приводит к вторичному следообразованию, что многократно увеличивает количество объектов исследования, приводит к смешению следов из различных источников, затрудняет проведение экспертизы и т.д.[7].

Влажные объекты необходимо перед упаковкой просушить (без использования обогревателей и прямых солнечных лучей) и упаковывать в бумажные свертки, картонные коробки, матерчатые мешки. В безвыходных ситуациях допустима упаковка в полиэтиленовые пакеты с отверстиями для вентиляции. Ни при каких обстоятельствах мокрые предметы не должны оставаться в пластиковых или бумажных контейнерах более двух часов.

Фрагменты ногтей, найденные на месте преступления, могут быть идентифицированы с человеком, которому он принадлежал через много месяцев после совершения преступления. Фрагменты ногтей помещаются в бумажный пакет и подписываются. Затем они могут быть доставлены в криминалистическую лабораторию для анализа [45].

Потожировые следы, содержащие клетки эпителия, изымаются вместе с предметом-носителем. Костный материал, фрагменты мягких тканей изымаются целиком [7].

Объекты биологического происхождения, подлежащие дальнейшему ДНК анализу, упаковываются так, чтобы исключить или максимально

уменьшить воздействие факторов окружающей среды (влажность, высокая температура, солнечный свет), разрушающих ДНК [7] (рис.3).



Рисунок 3. Правильная упаковка объекта, изъятых с места происшествия, исключающего влияние на него факторов окружающей среды

Транспортировка и хранение объектов генотипического исследования имеет немаловажное значение, так как неправильные условия могут повлиять на сохранность биологических объектов и сделать их непригодными для дальнейшего исследования [7].

1.4 Методы выделения ДНК, используемые в судебно-биологических исследованиях

Выделение ДНК фенольным методом

Суть методики заключается в смешивании клеточного лизата с фенолом, хлороформом и изоамиловым спиртом в пропорции 25:24:1 и последующем перемешивании и центрифугировании смеси в течение 3-5 минут при 10 000-15 000g до разделения двух фаз [16]. После проведения этих манипуляций получается раствор с двумя фазами: водной и органической, причем все липиды и жиры находятся в органической

(нижней) фазе, белки — на границе фаз, а нуклеиновые кислоты — в водной (верхней) фазе 2. Для повышения чистоты экстракта эти действия повторяют несколько раз (рис. 4). Если раствор будет иметь низкий водородный показатель, то ДНК перейдёт в органическую фазу, а РНК останется в водной фазе, что позволяет выделять РНК отдельно от ДНК.

Фенол является сильным протеолитическим агентом и облегчает лизис клеточных оболочек, тогда как хлороформ является хорошим детергентом, денатурирующим белки, и основным растворителем жиров, способствуя удалению липидного слоя оболочек таких клеток, как микобактерии [25].

Изоамиловый спирт добавляют для предотвращения вспенивания и улучшения разделения органической и водной фаз [38]. После центрифугирования ДНК, содержащаяся в водной фазе, осаждают этанолом или изопропанолом, промывают осадок 70 % этанолом для удаления солей и маленьких органических молекул, подсушивают и ресуспендируют в буфере, создавая требуемую концентрацию [39].

Данный метод используется повсеместно, поскольку он не требует дополнительного сложного оборудования и имеет невысокую стоимость [39].

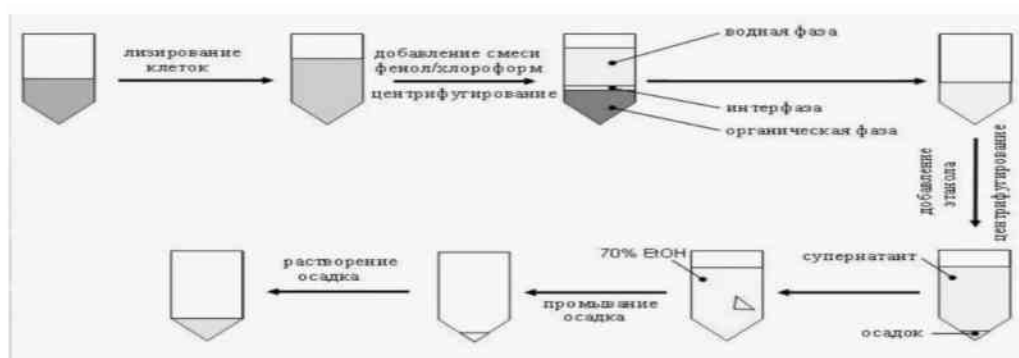


Рисунок 4. Схематичное изображение процесса выделения ДНК из биологических объектов фенольным методом

Выделение ДНК с помощью ионообменной смолы Chelex 100

Chelex 100 - это хелатирующая смола, обладающая высоким сродством к ионам поливалентных металлов. Смола Chelex состоит из сополимеров стирола и дивинилбензола содержащий спаренные иминодиацетат-ионы, которые действуют как хелатирующие группы [51].

Первый протокол экстракции ДНК с использованием Chelex 100 был разработан С. Уолшем и соавторами [51]. Этот метод, нашедший применение в основном в судебной медицине, включает тепловую денатурацию клеток, которые могут быть прикреплены к бумаге или ткани, в растворе, содержащем смолу Chelex 100. Высокие температуры (95° - 100° C) приводят к высвобождению ДНК в раствор, а также облегчают связывание смолы Chelex с ионами магния. Ионы магния служат кофакторами дезоксирибонуклеаз и способствуют их активации. Поскольку ионы магния становятся недоступными для связывания с дезоксирибонуклеазами, деградация ДНК предотвращается. После того, как был разработан этот протокол, смола Chelex 100 стала методом выбора для протоколов, требующих быстрого извлечения ДНК из следовых количеств биологических образцов [46].

В части эффективности метода Chelex мнения расходятся. Ряд авторов сообщают об успешном применении этого метода, но в то же время другие стремятся модернизировать протокол выделения или заменить его на другие методы выделения с использованием твердофазных методов (магнитные и кремниевые частицы, спин-колонки).

Хотя выделение геномной ДНК с использованием смолы Chelex 100 является быстрым и недорогим, ДНК, полученная этим методом, имеет низкую концентрацию в растворе и содержит взвешенные примеси. Присутствие остатков в растворе ДНК может привести к деградации ДНК при длительном хранении и ингибированию полимеразной цепной реакции [46].

Выделение ДНК с использованием магнитных частиц

Совсем недавно для улавливания нуклеиновых кислот стали использовать суперпарамагнитные частицы и магнитное разделение. Этот метод обеспечивает частицам свободную подвижность в растворе, что повышает эффективность адсорбции и захвата нуклеиновых кислот. Суперпарамагнитная природа частиц позволяет манипулировать ими с помощью внешнего магнита и удерживать на месте, пока загрязняющие белки и соли вымываются. Эти системы могут полагаться на концентрацию соли и осаждение этанолом, или они могут использовать более сложную химию для обратимого связывания ДНК или РНК специфическим или неспецифическим образом [1].

В настоящее время для очистки ДНК выпускают множество магнитных частиц из различных материалов, в том числе, пористого стекла (MGP), целлюлозы (MagaZorb®), двуокиси кремния SiO_2 (GenoPrep™DNA), полистирола (Dynabeads® DNA), неорганических магнитных материалов, подобных окиси железа с модифицированной поверхностью (MagneSil, SiMAG) и т.п. [30].

Также, для увеличения сродства к нужной нуклеиновой кислоте используют магнитные частицы с иммобилизованными аффинными лигандами или изготовленные из биополимера [48].

Первые этапы очистки ДНК соответствуют другим методам выделения и включают лизис клеток детергентами, литическими ферментами и/или физическими методами, затем добавляют магнитные частицы, которые связывают свободную ДНК. Затем применяют магнит, который прижимают к внешней стенке пробирки с лизатом. Это позволяет собрать частицы с адсорбированной нуклеиновой кислотой на стенке, а примеси удалить пипеткой вместе с лизатом. Затем повторяют отмывание и элюирование выделенной очищенной ДНК (при выполнении каждой стадии частицы последовательно суспендируются в добавляемом растворе, собираются с

помощью магнита и затем суспензируются в следующем растворе) [19] (рис.5).

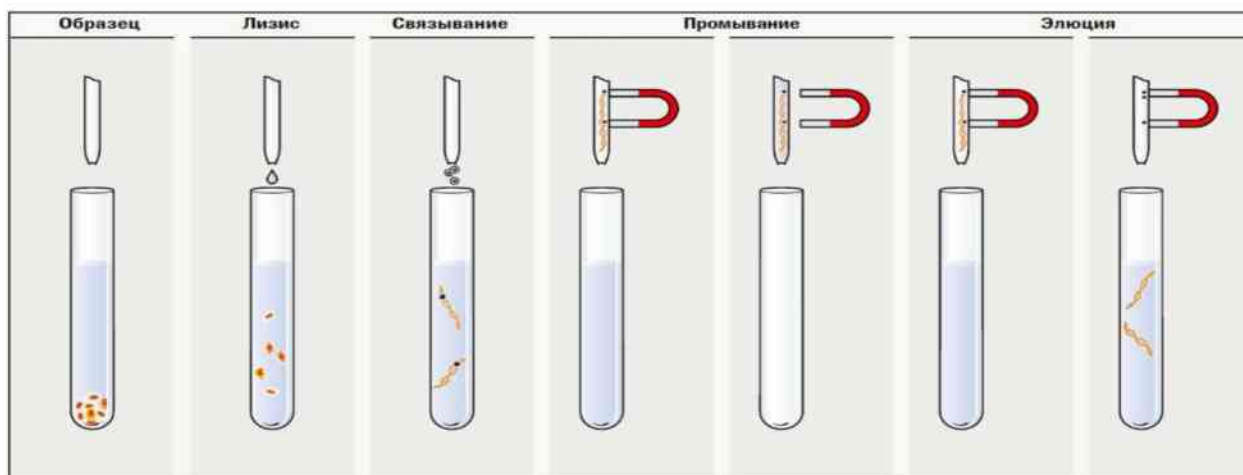


Рисунок.5. Этапы выделения ДНК на магнитных частицах

Выделение ДНК на спин-колонок

Экстракция ДНК с помощью спиновых колонок относится к твердофазной экстракции ДНК, поскольку для отделения нуклеиновой кислоты используется твердая фаза, обычно кремнезем. Оригинальная концепция была разработана Д. Маккормиком и его коллегами в 1989 году. Своевременные новые концепции и оптимизации вывели метод на первое место.

Одним из основных преимуществ вращающихся колонок является отсутствие опасных химических веществ, таких как фенол и хлороформ. Вместо этого несколько безопасных химических растворов и два-три этапа центрифугирования делают весь процесс простым и безопасным. Единый унифицированный протокол применим ко многим биологическим образцам.

Наиболее обсуждаемая часть этой технологии, “спиновая колонка”, содержит твердый силикагель, в котором ДНК связывается. Всего несколько последующих обработок позволят получить чистую ДНК без какого-либо осаждения [11].

Адсорбция обеспечивается в присутствии хаотропных солей (в основном, соли гуанидина), во время или после этапа лизиса, при определенном значении водородного показателя ($pH > 7,0$) [30]. Хаотропные соли дестабилизируют водородные связи и гидрофобные взаимодействия, денатурируют белки (включая нуклеазы) и разрушают ассоциацию НК с водой, облегчая связывание ДНК с мембраной SiO_2 . Затем все примеси удаляют в процессе отмывки раствором, содержащим детергент и спирт (чаще этанол) — спирт не допускает растворение ДНК, способствуя удалению других компонентов образца. На окончательной стадии ДНК элюируют низкосолевым буфером или водой. С учетом характеристик колонок фильтрацию пробы, промывание и элюирование из колонки проводят, используя силу тяжести, давление, центрифугирование или вакуум (рис.6).

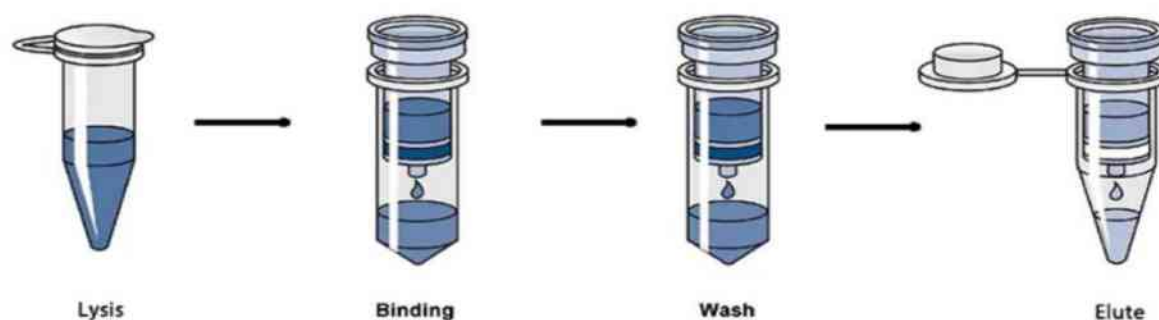


Рисунок 6. Изображение спин-колонки, используемой для выделения и очистки ДНК

1.5. Выделение ДНК из объектов, изъятых с мест преступлений, с использованием различных коммерческих наборов

А) Выделение ДНК из пятен крови

Выделение ДНК из цельной крови с использованием химии преципитации происходит путем осаждения ДНК из лизата с помощью высокой концентрации соли и добавления спирта (либо этанола, либо

изопропилового спирта). Этот метод позволяет легко отделить ДНК от других биомолекул и органических соединений (например, макромолекул, таких как липиды и углеводы), которые могут помешать последующему применению [24]. Этот метод также позволяет отделить ДНК от любых экзогенно добавленных химических соединений, которые могут присутствовать в крови (например, новые химические соединения в программах поиска лекарств) [24].

Двухэтапный лизис:

При двухэтапном подходе к лизису (используемом в наборах Puregene) на первом этапе происходит лизис эритроцитов с использованием детергентов, таких как додецилсульфат натрия (SDS) и Triton™ X-100. Затем на втором этапе обеспечивается лизис лейкоцитов с высвобождением клеточного ядра, геномной ДНК и РНК. Обработка рибонуклеазой (обычно РНКазой) затем удаляет загрязняющие РНК, оставляя ДНК и белковые молекулы в надосадочной жидкости.

Следующим шагом является удаление белка с помощью концентрированных солей, которые осаждают белки из лизированных клеток. По мере увеличения концентрации катионов из-за добавления солей и уменьшения доступности свободной воды растворимость белка снижается, что приводит к "высаливанию" белков. Однако ДНК остается в надосадочной жидкости, которую собирают [3].

Одностадийный лизис:

При одностадийном подходе к лизису (который используется в наборах FlexiGene) красные и белые кровяные тельца лизируются за один этап; для этого используется смесь детергентов, способная лизировать оба типа клеток. На этой стадии лизиса из белых кровяных телец высвобождаются ядра и митохондрии, которые собираются центрифугированием, оставляя РНК в надосадочной жидкости.

Как и в одностадийном подходе (Puregene), следующим шагом является удаление загрязняющих белков. Здесь ядра лейкоцитов и митохондрии

обрабатывают денатурационным буфером, который содержит хаотропную соль и протеазу. При этом одновременно денатурируются и гидролизуются белки в ядре клетки и митохондриях, оставляя гидролизованные белки и геномную ДНК в растворе [24].

В обоих методах ДНК извлекают спиртовым осаждением и регидратируют с использованием буферного раствора Трис или Трис-ЭДТА. Выделенная ДНК стабильна при 4 °С и -20 °С более 10 лет [24].

Подход с одноэтапным лизисом имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным методом двухэтапного лизиса:

- Что наиболее важно для получения ДНК, это исключается возможная потеря образца, которая может возникнуть при двухэтапной процедуре.
- Замена пробирки не требуется (т.е. при ручной процедуре риск перепутывания образцов значительно снижается).
- Это экономит время в лаборатории, поскольку выполняется меньше этапов и отсутствуют ночные инкубации или этапы очистки. Например, при двухэтапном химическом методе осаждения ДНК в раствор может потребоваться до 48 часов.
- Одноэтапный метод лизиса также подходит для бюджета лаборатории. Он менее затратный, поскольку не требует дополнительных ферментов, таких как РНКазы, или какого-либо дополнительного оборудования [4].

Б) Выделение ДНК из следов слюны (буккальный эпителий)

Объекты, содержащие слюну и клетки буккального эпителия, поступают на исследование в виде окурков, на посуде, одежде, а также на зонд-тампонах [7].

Рекомендуемый протокол экстракции для образцов буккального эпителия:

1. Поместите фрагмент предмета носителя с биоматериалом в пробирку, объемом 1,5 мл (например, головку ватной палочки для сбора буккального эпителия).

2. Добавьте 300 мкл реагента COrDIS Sprint (при необходимости объем реагента необходимо увеличить для полного погружения предмета носителя);

3. Инкубируйте образец 15 мин при 70°C. Для повышения эффективности лизиса, для сложных объектов (например, волосы) время инкубации может быть увеличено до 30-60 мин. [13]

В) Выделение ДНК из потожировых следов и клеточного эпителия

При проведении экстракции ДНК из потожировых следов, изначально содержащих малое количество генетического материала, необходимо минимизировать его потери путем уменьшения этапов пробоподготовки, тем самым снижая риск контаминации пробы, и по возможности использовать реагенты, не ингибирующие «прямую» ПЦР без предварительной очистки препарата [32].

Для быстрого получения препарата ДНК «в одной пробирке» с минимальными потерями широко используют 5% водную суспензию ионообменной смолы Chelex 100, являющейся сополимером стирола и дивинилбензола. Содержащиеся в данной смоле иминодиацетатные реакционные центры имеют отрицательный заряд, за счет чего обеспечивается высокая аффинность ионообменной смолы к поливалентным ионам металлов [10]. В процессе кипячения проб Chelex 100 вызывает связывание ионов металлов, что предотвращает деградацию полинуклеотидной цепи под действием высокой температуры в условиях низкой ионной силы или за счет активации нуклеаз [10] (рис.7).

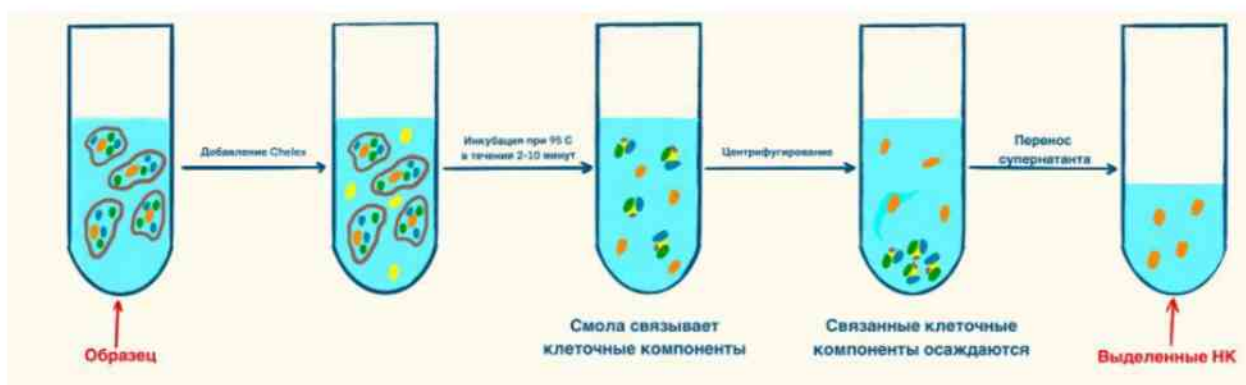


Рисунок 7. Схематичное изображение протокола выделения ДНК с помощью ионообменной смолы *Chelex 100*

Однако применение данного метода экстракции нуклеиновых кислот не позволяет длительно хранить препараты, поскольку ионы металлов обратимо связываются с иминодиацетатными группами и с течением времени, освобождаясь, вызывают повреждения молекул ДНК. Следует также отметить, что при использовании *Chelex 100* сложно получить чистый и концентрированный препарат ДНК, кроме того, частицы ионообменной смолы могут быть перенесены в ПЦР-пробирки и вызвать ингибирование ферментатической амплификации [3].

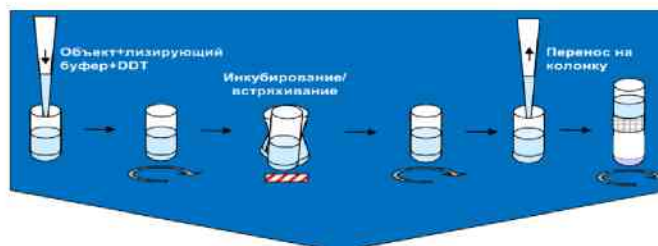
Метод фенол-органической экстракции зарекомендовал себя как универсальный способ получения нуклеиновых кислот из различных объектов с соответствующими модификациями последующей очистки препаратов ДНК [9]. Однако выделение ДНК таким методом сопряжено со значительными ее потерями в процессе пробоподготовки, что связано с многократным переносом раствора, содержащего генетический материал, из одной пробирки в другую. Этот факт существенно снижает ценность фенол-органического метода при работе с потожировыми следами, так как больше подходит к объектам с изначально большим объемом биологического материала. Кроме того, высокая токсичность и сложность утилизации реагентов отрицательно сказались на популярности данного метода [2].

При сравнении зарубежными исследователями методов получения препаратов ДНК из потожировых следов [9] и других образцов (цельная

кровь, пятна крови, сперма, буккальный эпителий, волосы, мазки из влагалища после полового акта) с использованием Chelex 100 и фенол-органической экстракцией по результатам генотипирования показана их состоятельность и одинаковая эффективность в отношении всех объектов. Некоторые исследователи отмечают существенные потери (до 76%) генетического материала в процессе выделения обоими методами [33].

В настоящее время в большинстве лабораторий для получения препаратов ДНК лизис клеток проводят с использованием хаотропных агентов, таких как соли гуанидиния (например, гуанидин тиоционат), с последующей сорбцией ДНК на специальных носителях, к которым относятся мелкие высокоочищенные частицы оксида кремния (силика) [9]. Метод нуклеосорбции с помощью диоксида кремния реализован в большинстве коммерческих наборов реагентов. К ним, например, относятся системы для выделения ДНК «DNA IQ» (Promega, США) [31] и «PrepFiler» (рис.8) (Applied Biosystems, США) [41], при помощи которых можно получить высокоочищенные препараты ДНК как вручную, так и с помощью автоматизированной техники [18]. Однако такие наборы реагентов имеют достаточно высокую стоимость, а методы с их использованием сопряжены с риском контаминации образцов и возможностью потерь ДНК из-за необратимой сорбции на носителе, а также при многоэтапном процессе очистки препаратов. Даже столь небольшие потери ДНК крайне существенны при работе с потожировыми следами, в которых содержится крайне малое количество генетического материала [44]. Также следует учитывать, что следовые количества солей гуанидиния могут ингибировать амплификацию [9].

Лизис



Связывание ДНК



Отмывка ДНК



Элюирование ДНК

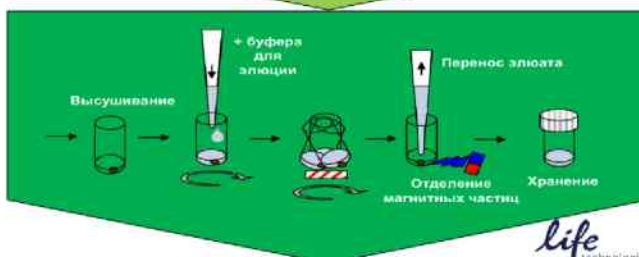


Рисунок 8. Протокол выделения ДНК из объектов при помощи коммерческого набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США)

Большинство методов экстракции приводят к получению ДНК в относительно большом объеме. Для дополнительной очистки и концентрирования препаратов используют такие устройства-концентраторы, как «Microcon» (Millipore, США), «MinElute» (Qiagen, США), «NucleoSpin» (Clontech, США) или «Centricon» (рис.9) (Amicon, США) [9].

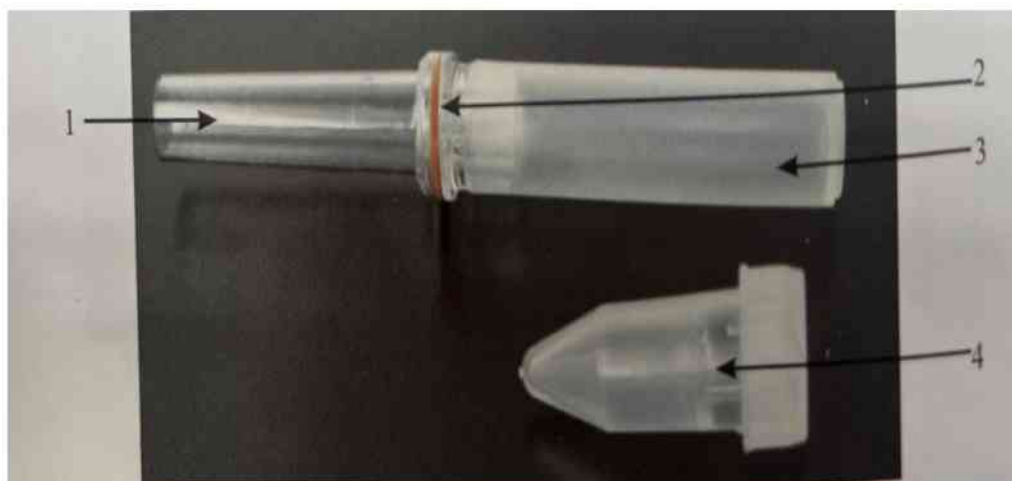


Рисунок 9. Устройство для концентрирования и очистки ДНК Centricon-100: 1-верхний резервуар, где концентрируется ДНК; 2 – мембрана, пропускающая макромолекулы величиной менее 100 000 дальтон; 3 – нижний резервуар, куда попадает фильтрат; 4 – пробирка, прилагаемая к устройству Centricon, куда переносят конечный раствор ДНК

Г) выделение ДНК из пятен спермы, вагинальных мазков

Стандартный метод получения мужской ДНК из вагинального мазка для аутосомного профилирования был впервые описан П. Гиллом и его коллегами в 1985 году [29] и до сих пор используется в модифицированных формах криминальными лабораториями. Этот метод обычно называют дифференциальным лизисом, потому что клетки, не являющиеся сперматозоидами, избирательно лизируются детергентом и протеиназой К, в то время как сперматозоиды не лизируются из-за сильно дисульфидных сшитых белков в головке сперматозоида, которые сопротивляются обработке протеазой. Затем сперматозоиды разбивают центрифугированием на гранулы, удаляют надосадочную жидкость, содержащую ДНК жертвы, и гранулу многократно промывают, чтобы удалить оставшуюся ДНК жертвы, перед лизисом спермы восстановителем для выделения растворимой и относительно чистой мужской ДНК. Этапы промывки утомительны, их трудно автоматизировать, и они приводят к потере спермы, и было предпринято много попыток обойти необходимость промывки гранул

спермы, таких как сбор спермы путем фильтрации, проточная цитометрия и лазерное вскрытие [29], хотя ни один из этих методов не применялся в обычной работе.

Недавно была описана другая альтернатива методу дифференциального лизиса, при котором селективный лизис клеток, не являющихся сперматозоидами, проводят с использованием $0,1\text{ N NaOH}$ в присутствии субстрата для мазка, который центрифугируют во вращающейся корзине для удаления ДНК жертвы. Субстрат промывают и обрабатывают нуклеазой для удаления остаточной ДНК жертвы, а сперматозоиды затем лизируют 1 N NaOH для выделения чистой мужской ДНК. Этот метод требует, чтобы сперматозоиды прочно прикреплялись к субстрату и оставались прикрепленными на этапах центрифугирования и промывки; не было опубликовано данных, показывающих, что это имеет место в случае с посткоитальными вагинальными мазками, только с буккальными мазками, пропитанными спермой [29].

Набор для выделения спермы Erase использует совершенно новый подход к удалению нежелательной остаточной ДНК у жертвы, а именно путем разрушения ДНК с помощью нуклеазы [3].

Набор для выделения спермы Erase эффективно удаляет ДНК эпителиальных клеток из образцов, содержащих смеси сперматозоидов и эпителиальных клеток. Erase позволяет получить мужской аутосомный профиль из образцов, которые, как ожидается, дадут смешанный профиль.

С Erase десять образцов могут быть обработаны вручную менее чем за два часа. Erase также можно автоматизировать с помощью прибора для обработки жидкостей для высокопроизводительного тестирования [29].

Д) выделение ДНК из костных останков

Выделение ДНК из скелетных останков человека может быть проблематичным. В дополнение к деградации ДНК, которая усиливается при высокой температуре и влажности, в образцах часто присутствуют мощные ингибиторы ПЦР. Поэтому важно извлечь максимальное количество

доступных данных, удалив при этом любые ингибиторы ПЦР, которые могут присутствовать [35]. Метод экстракции на основе фенола и хлороформа уже много лет используется для извлечения данных из кости [54]. Однако использование фенол-хлороформного метода сократилось из-за токсичности используемых химических веществ; напротив, методы на основе диоксида кремния приобрели популярность благодаря их относительной простоте использования, их способности удалять ингибиторы ПЦР, а также потенциалу автоматизации некоторых этапов процесса экстракции [35]. Однако все методы извлечения по-прежнему используются в криминалистических лабораториях.

Помимо выбора метода выделения ДНК из костей, важно правильно выбрать материал для исследования. Необходимо соблюдать приоритет отбора материала, который будет нести наибольшее количество ДНК (рис.10):

- 1) Зубы (должны быть здоровыми без кариозных полостей, пломб);
- 2) Бедренная кость;
- 3) Большеберцовая кость;
- 4) Таз (если невозможно изъять кости конечностей и зубы) [47]

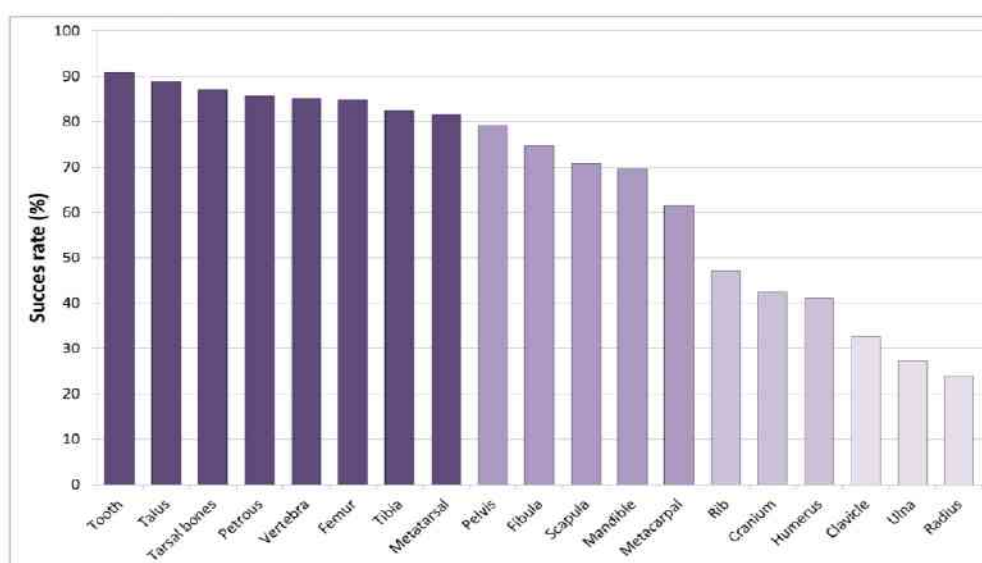


Рисунок 10. Показатели успешности экстракции ДНК из отдельных элементов скелета [47]

Таким образом, для дальнейшего типирования ядерной ДНК, чтобы получить ДНК в достаточном количестве, приоритетно использовать костные ткани зубов, таранную кость стопы, кости предплюсны, пирамида височной кости, позвонок, бедренная кость, большеберцовая кость; наименьшее количество ДНК находится в ключице, локтевая кость, лучевая кость.

Извлечение ДНК из кости можно рассматривать как три отдельных этапа: деминерализация, лизис и очистка [42].

Методы выделения ДНК из костей:

1. QIAamp DNA Investigator Kit (рис.11) (QIAGEN, Германия). Набор для выделения ДНК из широкого диапазона биологических образцов, в том числе из костной ткани на спин-колонках [54]. Выделение основано на процедуре лизиса клеточных стенок с последующим связыванием ДНК с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке при соответствующей ионной силе и pH.



Рисунок 11. QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN, Германия).

2. PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kits (рис.12) (ThermoFisher, США). Метод основан на выделении ДНК магнитными частицами с оптимизированным многокомпонентным составом поверхности



Рисунок 12. PrepFiler and PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kits

3. Cordis Экстракт Декальцин (Рис.13) (ООО «Гордиз», Россия). Набор разработан для выделения ДНК из костной ткани с использованием магнитных частиц высокой емкости.



*Рисунок 13. Набор для выделения ДНК из костной ткани Cordis
Экстракт Декальцин*

4.М-Сорб Кость (рис.14) (ЗАО «Синтол», Россия). Метод предназначен для выделения ДНК из костного порошка на магнитных частицах.



Рисунок 14. Набор для выделения ДНК из костной ткани М-Сорб Кость

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе ДНК лаборатории Экспертно-криминалистического центра УМВД России по Пензенской области.

Для исследования брали объекты, содержащие кровь, слюну, потожировые следы, содержащие клетки эпителия, костные фрагменты, волосы, гистологические препараты в парафиновых блоках (таблица 1).

Таблица 1 - Объекты биологического происхождения различной природы, которые были исследованы в процессе эксперимента (контрольная выборка n=10)

	Наименование объекта	Предмет-носитель и давность образования	Размер
1.	кровь	марля, до 4-х недель	вырезы 0,5х0,5см
2.	кровь	поверхность стекла, до 6 месяцев	смыв 0,5х0,5см
3.	кровь со следами гнилостных изменений	предметы одежды	вырезы 0,5х0,5см
4.	кровь	джинсовая ткань (от светло-голубого до черного цвета)	вырезы 0,5х0,5см
5.	кровь трупная	марля, свыше 10 лет	вырезы 0,5х0,5см
6.	кровь трупная	марля, до 1 мес.	вырезы 0,5х0,5 см
7.	слюна	окурок сигареты, до 1мес.	вырезы 0,5х0,5 см
8.	слюна	бокал, до 2 нед.	смыв с поверхности кромки
9.	потожировые следы	рукоять ножа, до 2 нед.	смывы 3х3см
10.	потожировые следы	рукоять ножа (после обработки дактилоскопическим порошком), до 2 нед.	смывы 3х3см
11.	потожировые следы	предметы одежды, до 6 мес.	вырезы 1,0х1,0см

Продолжение таблицы 1

12.	фрагменты костной ткани (10 объектов)	зуб целиком, до 1 мес.	50 мг костного порошка
13.	фрагменты костной ткани (10 объектов)	зуб целиком, до 2-х лет	50 мг костного порошка
14.	фрагменты костной ткани (10 объектов)	фрагмент ребра	50 мг костного порошка
15.	волосы, содержащие жизнеспособные луковицы (вырванные) (10 объектов)	до 1 мес.	10-12шт
16.	парафиновые блоки (10 объектов)	более 1 года	кусочки размером 0,5х0,5см

Для исследования следов крови на марлевой салфетке и с предметов одежды делали вырезы с помощью ножниц, размер вырезки 0,5х0,5см, после каждого объекта поверхность ножниц тщательно протирали 70 % этаноловым спиртом; с поверхности стекла делали смывы на зонд-тампон с ватным наконечником увлажненным дистиллированной водой [5,15].

Для исследования следов слюны с фильтра окурка сигареты делали вырезы с помощью ножниц, размер вырезки 0,5х0,5см; с поверхности кромки бокала с мест вероятного нахождения слюны стекла делали смывы на зонд-тампон с ватным наконечником увлажненным дистиллированной водой [5,15].

Для исследования потожировых следов, содержащих эпителиальные клетки, с рукояти ножа делали смывы на зонд-тампон с ватным наконечником увлажненным дистиллированной водой; с предметов одежды (носки) делали вырезы с помощью ножниц, размер вырезки 0,5х0,5см [5,15].

Костные фрагменты перед исследованием замачивали на 16 часов в 3 % растворе перекиси водорода, очищали от остатков тканей, промывали дистиллированной водой и высушивали в термостате при 56⁰С. Затем костный материал измельчали с помощью шаровой мельницы Retsch MM400

(производство фирмы Retsch, Германия), для исследования брали навески по 50 мг костного порошка [15].

Волосы перед исследованием промывали в теплой воде с мылом, ополаскивали дистиллированной водой и обезжиривали смесью этанола с эфиром (1:1). Затем помещали на предметное стекло с каплей просветляющей жидкости – (дистиллированная вода), накрывали покровным стеклом. С помощью стереоскопического микроскопа «Микромед» в проходящем свете при увеличении до 40х определяли наличие жизнеспособной луковицы, по 10-12 штук брали для исследования [5,15].

Перед выделением ДНК из парафиновых блоков проводили их депарафинизацию. В пробирки с объектами исследования добавляли по 1 мл ксилола, перемешивали в течение 10 секунд, центрифугировали со скоростью 13 400 об/мин в течение 2 минут. Удаляли надосадочную жидкость. Повторяли указанные этапы три раза. Затем добавляли к препаратам по 1 мл 96%-ного этанола, перемешивали, центрифугировали со скоростью 13 400 об/мин в течение 2 минут. Удаляли надосадочную жидкость. Повторяли указанные этапы 3 раза. Пробирки открывали и инкубировали при 37⁰С в течение 20 минут до полного высушивания. Для исследования брали кусочки тканей размером 0,5х0,5см [5,15].

Для оценки выбора способа выделения нуклеиновых кислот из криминалистически значимых объектов биологического происхождения, проводили выделения ДНК с помощью ионообменной смолы Chelex 100 и выделение на магнитных частицах с помощью коммерческих наборов «GOrDIS экстракт автомат» для экстракции ДНК человека», «GOrDIS экстракт Декальцин автомат», согласно прилагаемой инструкции [15].

Протокол выделения ДНК с помощью ионообменной смолы Chelex 100:

1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, вносили вырезки со следами крови, слюны, пота размером 0,5 см², часть зонд-тампона со смывами слюны, потожирового вещества и клеток эпителия, волосы, фрагменты тканей, костный порошок.

2. Добавляли 200 мкл 5%-ой взвеси Chelex 100, и содержимое пробирки перемешивали.

3. Инкубировали в термостате при температуре 56 °С в течение 30 мин.

4. Затем содержимое пробирки тщательно перемешивали с использованием vortex в течение 5–10 сек. Кратковременно центрифугировали в течение 20 сек. при 13 400 об/мин (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

5. Инкубировали в термостате при температуре 99 °С в течение 8 мин.

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

7. Центрифугировали в течение 2 мин. при 13 400 об/мин (максимальной скорости) для отделения ионообменной смолы и нерастворившихся компонентов, и переносим супернатант, содержащий ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл [5].

Протокол выделения на магнитных частицах с помощью коммерческих наборов «GOrDIS экстракт автомат» для экстракции ДНК человека», «GOrDIS экстракт Декальцин автомат» (рис. 15):

1. Исследуемый биологический материал (вырезки со следами крови, слюны, пота размером 0,5 см², часть зонд-тампона со смывами слюны, потожирового вещества и клеток эпителия, волосы, костный материал) помещали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5мл, добавляли по 485мкл Лизирующего буфера и 15 мкл Протеиназы К; в пробирки с волосами и костным материалом добавляли по 5 мкл *IMDTT*.

2. Затем содержимое пробирки тщательно перемешивали с использованием vortex в течение 5–10 сек. Кратковременно центрифугировали в течение 20 сек. при 13 400 об/мин (максимальной скорости) для осаждения жидкости с крышки и стенок пробирки.

3. Инкубировали в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин.

4. Для выделения ДНК их костного материала после добавления Лизирующего буфера «Декальцин», протеиназы К и *DDT*, пробирку помещали в термостат при температуре 56 °С на 2 часа.

5. Центрифугировали в течение 2 мин. при 13 400 об/мин (максимальной скорости) для разделения твердой и жидкой части лизата. Не задевая твердого нелизированного осадка, переносили жидкую фракцию в чистую пробирку [15].

6. Дальнейшая процедура экстракции выполнялась в соответствии с протоколом автоматической экстракции с помощью прибора Automate Express DNA Extraction System, производства «Applied Biosystems», США [18].



Рисунок 15. Прибор для выделения ДНК для криминалистики AutoMate Express™ AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System

Определение концентрации выделенной ДНК проводили с помощью набора реагентов «Quantifiler Trio DNA Quantification Kit» производства фирмы «Applied Biosystems», США, согласно прилагаемой инструкции [38].

Реакцию амплификации и детекцию проводили с помощью прибора «QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System for Human» (рис.16), фирмы «Applied Biosystems», США. Обработку полученных данных проводили с помощью

программы «HID Real-Time PCR Analysis Software ® Version 1.3». Согласно данным о чувствительности набора реагентов (COrDIS «Эксперт 26», «SF 25 STR Kit», Инструкции пользователя [4,14]) для проведения исследования локусов ядерной ДНК концентрация ДНК должна быть не менее 0,006 нг/мкл.



Рисунок 16. «QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System for Human»

Реакцию амплификации проводили с помощью приборов «ProFlex™ 3x32-Well PCR System» (рис.17) и «ProFlex™ 96-Well PCR PCR System» фирмы «Applied Biosystems», США.



Рисунок 17. ДНК-амплификатор ProFlex™ ProFlex™ PCR System

Разделение и детекцию флуоресцентно меченых амплифицированных фрагментов проводили с использованием прибора капиллярного

электрофореза 3500 Genetic Analyzer (Рис.17), производства фирмы «Applied Biosystems», США в среде полимера POP4.

Определение длин амплифицированных фрагментов и установление номеров аллелей проводили на основе внутреннего стандарта длины и входящего в набор реагентов аллельного леддера с помощью программного комплекса GeneMapper ID – X v 1.5.



Рисунок 18. Генетический анализатор 3500 для идентификации личности 3500 Genetic Analyzer for Human Identification

Для исследования локусов ядерной ДНК применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя наборы реагентов: «COrDIS «ЭКСПЕРТ 26», производства ООО «Гордиз», Россия, «SF 25 STR Kit», производства «SORENSEN FORENSICS» Китай; в соответствии с инструкцией, прилагаемой к наборам [4,14].

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Результаты установления количества и качества ДНК

Результаты установления количества и качества ДНК, выделенной из объектов биологического происхождения, исследуемых в процессе эксперимента представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты установления количества и качества ДНК, выделенной из объектов биологического происхождения, исследуемых в процессе эксперимента (в контрольной выборке n=10)

п/н	Наименование объекта	Концентрация ДНК объектов, выделенных с помощью Chelex 100 (нг/мкл)			Концентрация ДНК объектов, выделенных с помощью магнитных частиц (нг/мкл)		
		Длинные фрагменты ДНК	Короткие фрагменты ДНК	Индекс деградации	Длинные фрагменты ДНК	Короткие фрагменты ДНК	Индекс деградации
1.	кровь (марля, до 1 мес.)	0,480-1,903	0,391-1,389	0,73-0,81	0,524-2,118	0,319-1,567	0,61-0,74
2.	кровь (поверхность стекла, до 6 месяцев)	0,086-1,462	0,028-0,720	0,32-0,49	0,104-1,485	0,030-0,530	0,29-0,36
3.	кровь со следами гнилостных изменений (предметы одежды)	0,094-1,102	0,214-3,090	2,28-3,09	0,116-3,204	0,186-5,900	1,60-1,84
4.	кровь (джинсовая ткань)	1,069-0,515	3,008-1,052	2,81-2,04	1,974-2,084	2,255-2,876	1,14-1,38
5.	кровь трупная (марля, свыше 10 лет)	0,058-1,652	0,197-2,196	1,25-1,33	0,164-2,004	0,204-2,134	1,07-1,24

Продолжение таблицы 2

6.	кровь трупная (марля, до 1 мес.)	0,069- 2,419	0,094- 2,963	0,93- 1,22	0,184- 2,606	0,134- 2,502	0,73- 0,96
7.	слюна (окурок сигареты, до 1 мес.)	0,056- 1,284	0,017- 1,079	0,32- 0,84	0,089- 1,408	0,027- 0,972	0,30- 0,69
8.	слюна (бокал, до 2 нед.)	0,038- 0,424	0,028- 0,399	0,74- 0,94	0,044- 0,629	0,299- 0,509	0,68- 0,81
9.	потожировые следы (рукоять ножа, до 2 нед.)	0,012- 0,094	0,015- 0,121	1,23- 1,29	0,26- 0,126	0,24- 0,129	0,94- 1,02
10.	потожировые следы (рукоять ножа (после обработки дактилоскопическим порошком), до 2 нед.)	0,009- 0,081	0,008- 0,086	0,94- 1,06	0,031- 0,080	0,025- 0,077	0,81- 0,96
11.	потожировые следы (предметы одежды, до 6 мес.)	0,103- 0,523	0,854- 0,633	0,83- 1,21	0,126- 0,889	0,093- 0,925	0,74- 1,04
12.	фрагменты костной ткани (зуб целиком, до 1 мес.)	0	0,001	-	0,012- 0,079	0,015- 0,113	1,31- 1,43
13.	фрагменты костной ткани (зуб целиком, до 2-х лет)	0	0,001	-	0,012- 0,087	0,014- 0,097	1,11- 1,13
14.	фрагменты костной ткани (фрагмент ребра, до 1 года)	0	0,001	-	0,009- 0,056	0,012- 0,081	1,29- 1,45
14.	фрагменты костной ткани (фрагмент ребра, до 1 года)	0	0,001	-	0,009- 0,056	0,012- 0,081	1,29- 1,45
15.	волосы, содержащие жизнеспособные луковицы (вырванные), до 1 мес.	0,007- 0,016	0,006- 0,017	0,84- 1,06	0,011- 0,024	0,007- 0,022	0,62- 0,91
16.	парафиновые блоки (более 1 года)	0,006- 0,018	0,021- 0,075	3-48- 4,16	0,016- 0,046	0,045- 0,138	2,84- 3,01

3.2. Анализ полученных результатов.

После проведения электрофореза исследуемых проб установлено:

1. При анализе следов, содержащих кровь на джинсовой ткани, установлено, что как при выделении с помощью Chelex 100, так и выделении на магнитных частицах с помощью коммерческого набора «GOrDIS экстракт автомат» для экстракции ДНК человека», наблюдается ингибирование. При этом наименьшая ингибция наблюдалась в объектах, выделенных с джинсовой ткани светло-голубого и голубого цвета, наибольшая – на джинсовой ткани темно-синего и черного цветов (Рис.19).

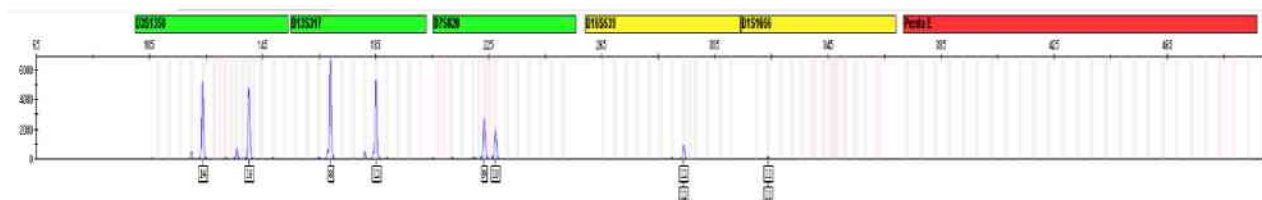


Рисунок 19. Результат исследования локусов ядерной ДНК следов крови на джинсовой ткани темно-синего цвета, демонстрирующий ингибирование полимеразной цепной реакции

Таким образом, при выделении ДНК из следов крови, которая также содержит ингибирующие вещества в своем составе, с джинсовой ткани, целесообразнее использовать метод выделения на магнитных частицах, так как данный метод имеет этапы отмывки, что повысит чистоту выделенной ДНК.

2. При экстракции ДНК с помощью Chelex 100 и коммерческого набора «GOrDIS экстракт автомат» для экстракции ДНК человека» из образцов крови на марле, в том числе и трупной крови, и крови со стекла, с давностью следов до 1 месяца, получили ДНК в достаточном количестве и качестве (рис. 20).

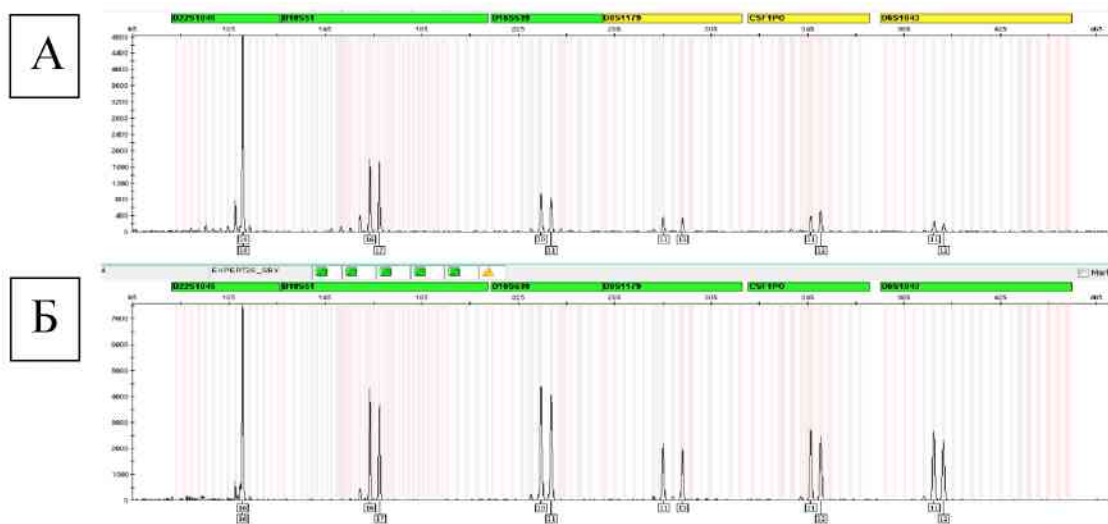


Рисунок 20. На рис.20А представлена электрофореграмма, полученная при исследовании следов крови давностью до 1 мес., выделенных с помощью магнитных частиц. На рис. 20Б электрофореграмма следов крови, выделенных с помощью Chelex100

3. При исследовании крови, подвергшейся гнилостным изменениям, выделенной с помощью Chelex 100, на электрофореграммах наблюдали появление неспецифических аллелей (рис. 21). Для следов загрязненных посторонней микрофлорой (что характерно для неправильно упакованных объектов, изъятых с мест преступлений) рекомендовано при экстракции ДНК использовать наборы на магнитных частицах, чтобы получить чистый генетический профиль и исключить ошибочный вывод.

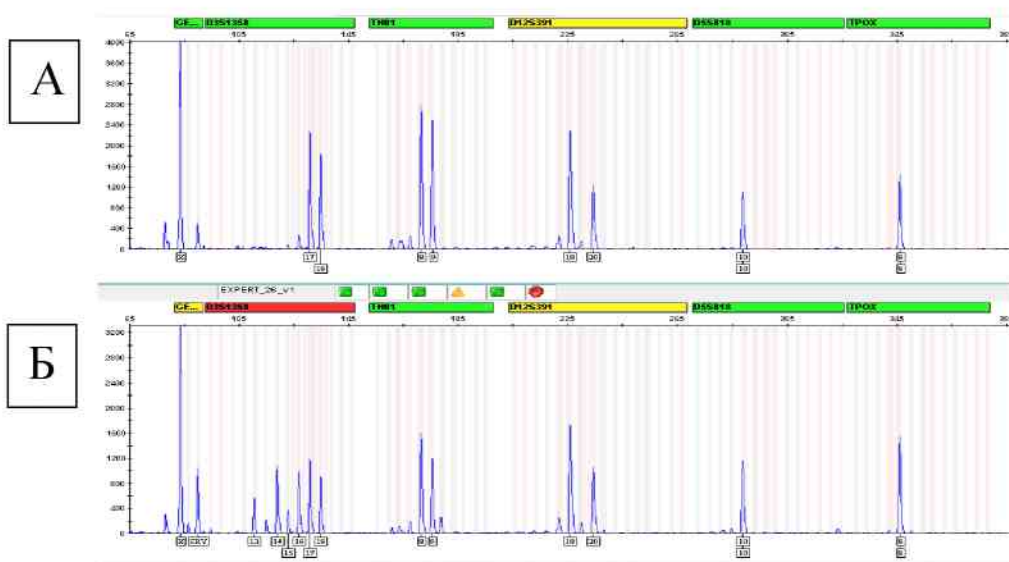


Рисунок 21. На рис. 21А представлено изображение выявленных локусов ДНК из следов крови, подвергшихся микробиологическому загрязнению, экстракция которой проводили с помощью магнитных частиц. Рис.21Б демонстрирует выявление неспецифических аллелей в локусе D3S1358, выявленных в следах крови, подвергшейся микробиологическому загрязнению в процессе гниения, выделение ДНК проводили с помощью ионообменной смолы

4. При выделении ДНК из образцов трупной крови давностью свыше 10 лет, не смотря на высокий индекс деградации ДНК, получили полный комплекс генетических признаков используя выделение на магнитных частицах, в случае же с Chelex 100 часть локусов осталась не установленными. Так, в случае работы с трупной кровью давностью свыше 10 лет, целесообразнее проводить экстракцию на магнитных частицах, так как старые следы трупной крови со временем подвергаются деградации, а Chelex 100 ингибирует реакцию амплификации (Рис.22).

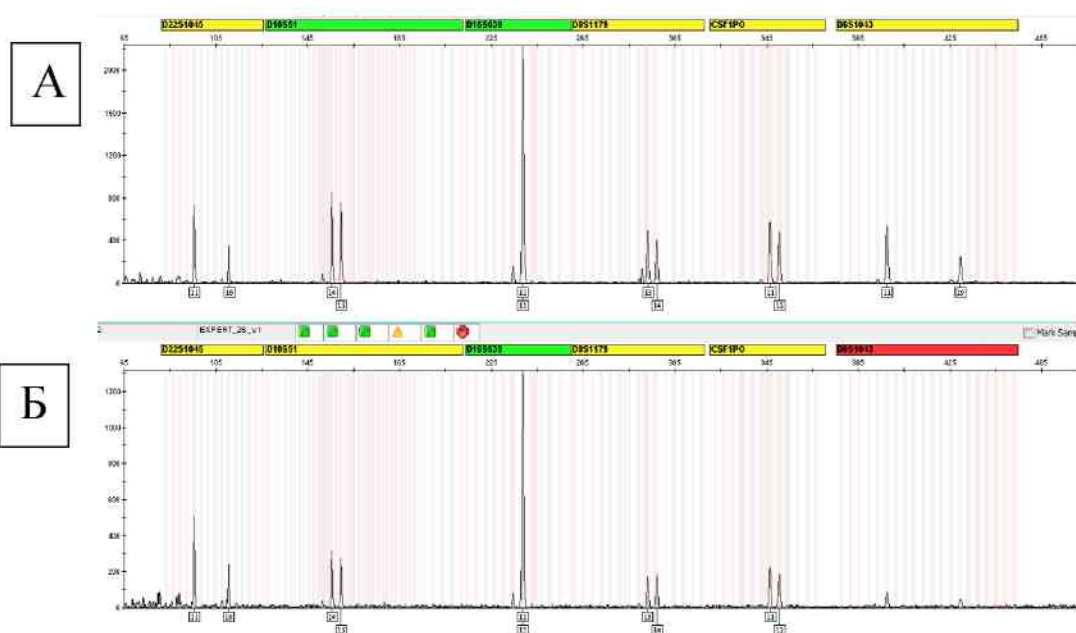


Рисунок 22. На рис. 22А показано, что при выделении ДНК с использованием магнитных частиц из следов трупной крови давностью свыше 10 лет, выявлен полный комплекс генетических признаков. Рис.22Б демонстрирует не состоятельность метода Chelex 100 при исследовании следов крови большой давности, в виду деградации ДНК и не выявления части аллелей

5. Чаще всего на исследование поступают предметы, находившие в кратковременном контакте с преступником, и такие потожировые следы априори не содержат большого количества ДНК (если это не предметы одежды, находившейся в контакте с телом), в отличие от следов слюны, содержащих клетки буккального эпителия, влагалищных выделений, и они невидимы, как например следы крови. В связи с этим, возможно ли присутствие там достаточного количества ДНК, мы можем установить только в процессе исследования.

При анализе результатов исследования следов пота, изъятых с рукояток ножей, при выделении ДНК при помощи магнитных частиц получили полный устойчивый генетический профиль лиц, тогда как при выделении с помощью ионнообменной смолы Chelex 100, уровень сигнала значительно ниже и наблюдается выпадение аллелей, при этом предварительная

обработка дактилоскопическим порошком никак не влияла на качество ДНК. Следовательно, контактные следы пота необходимо выделять, используя коммерческие наборы на магнитных частицах (Рис. 23).

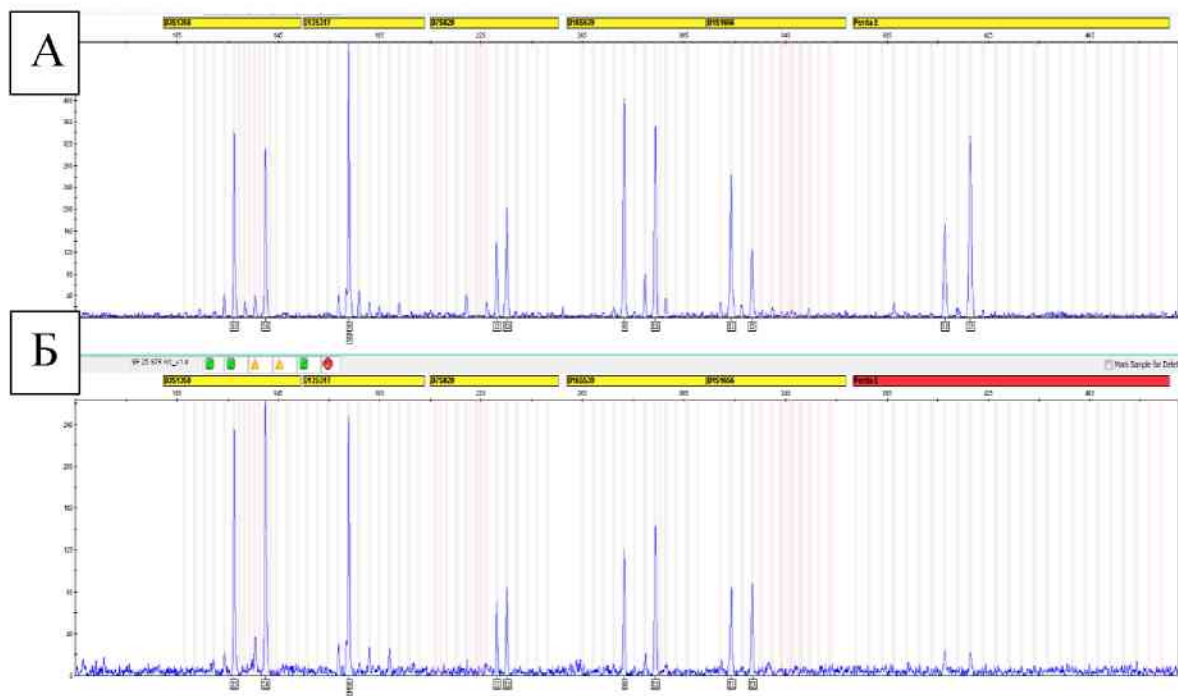


Рисунок 23. На рис. 23А показано, что уровень сигнала выявленных аллелей при исследовании контактных следов пота, выделенных с помощью магнитных частиц, удовлетворительный для установления генотипа лица, тогда как ДНК следов пота, выделенных с помощью ионообменной смолы, не достаточно для идентификации – рис. 23Б

6. При исследовании предметов одежды, находящихся в пользовании, например, ношенные носки, выделенные как магнитными частицами, так и ионнообменной смолой дали сопоставимые результаты (Рис.24). Следовательно, при исследовании таких предметов, возможно использовать оба метода.

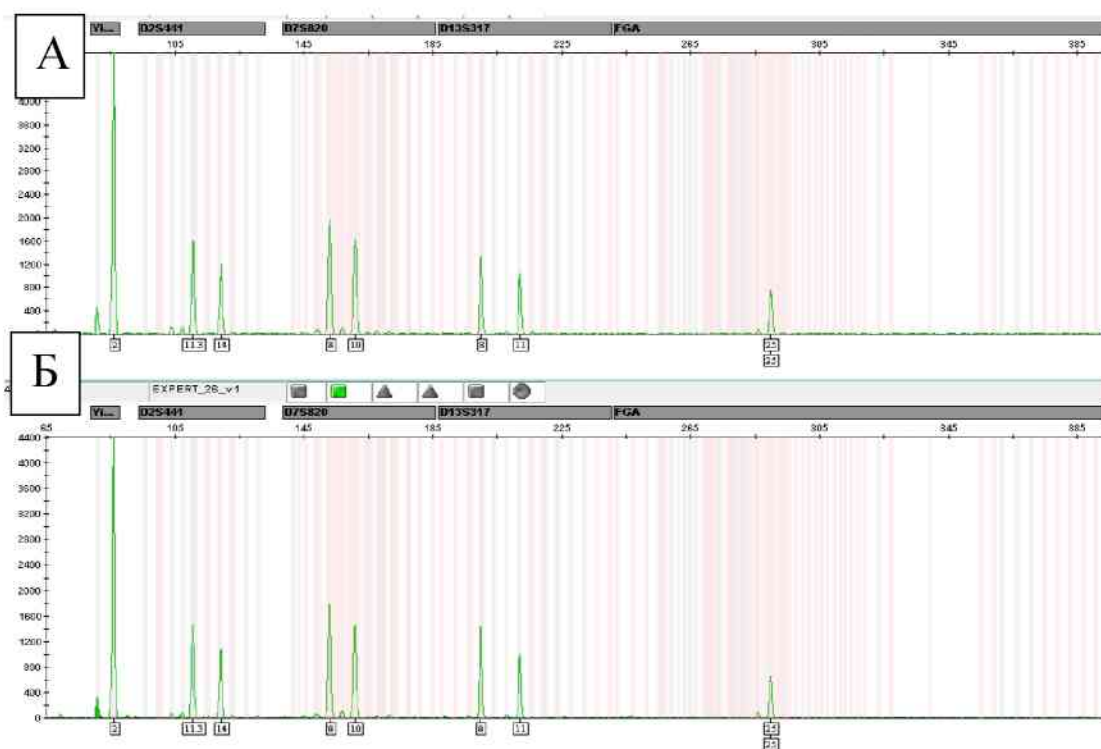


Рисунок 25. Электрофореграммы следов слюны, выделенных с помощью магнитных частиц – рис.25А, следов слюны, выделенных с помощью ионообменной смолы – 25Б. Качество выделенной ДНК обоими способами имеет приблизительно одинаковый уровень сигнала аллелей

8. При исследовании тканей из парафиновых блоков установлено, что выявить генетический профиль объектов, выделенных с помощью ионнообменной смолы Chelex 100, не удалось: наблюдается выпадение аллелей из гетерозиготных профилей (рис.26), что может привести к ошибочным выводам. Выделение тканей из парафиновых блоков рекомендовано проводить наборами на магнитных частицах.

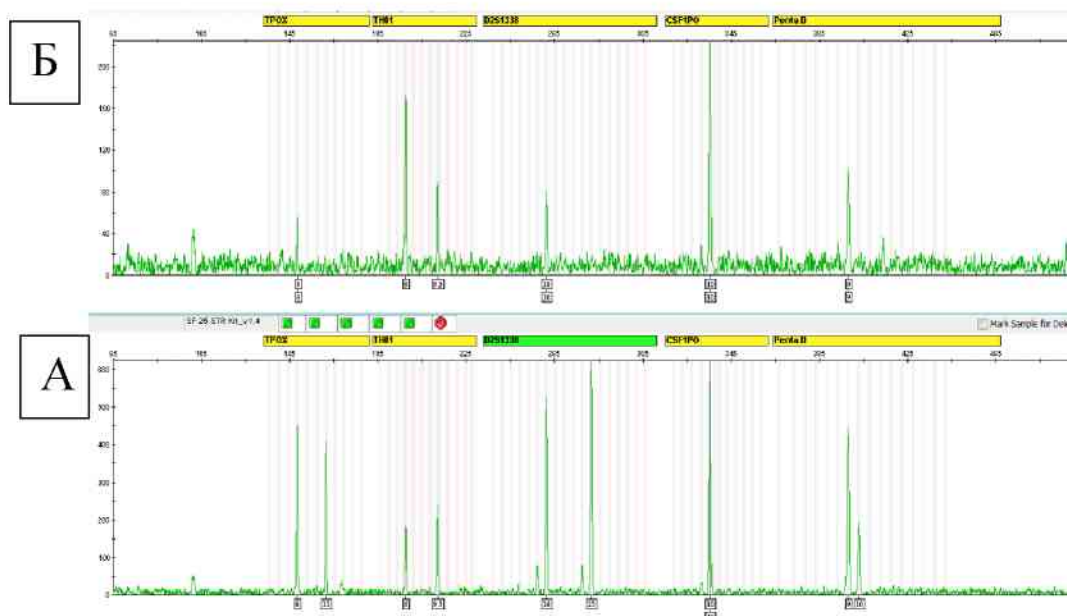


Рисунок 26. На рис.26А показан результат типирования тканей парафиновых блоков с помощью магнитных частиц, уровень сигнала выявленных аллелей низкий, но устойчивый; при экстракции ионнообменной смолой – Рис.26Б – имеются локусы с не выявленными аллелями (ложные гомозиготы)

9. По результатам исследования костного материала, можно сделать вывод, что коммерческие наборы в своем составе содержат буфер, обладающий деминерализирующими свойствами, чего нет в растворе Chelex 100. Следовательно, выделение ДНК из костного материала Chelex 100 не рекомендовано. При выделении ДНК из костной ткани зубов и ребер получали сопоставимые результаты, качество выделенной ДНК удовлетворительное (Рис.27). Здесь следует отметить, что качество выделенной ДНК во многом зависит от качества предоставленного материала. Зубы в наименьшей степени подвергаются процессам гниения, тогда как ребра зачастую поступают на исследование с тканями в значительной степени загнивания. В этом случае, если нет возможности предоставить зубы (например, отсутствует череп), то можно запросить предоставить кости конечностей (бедренные, берцовые).

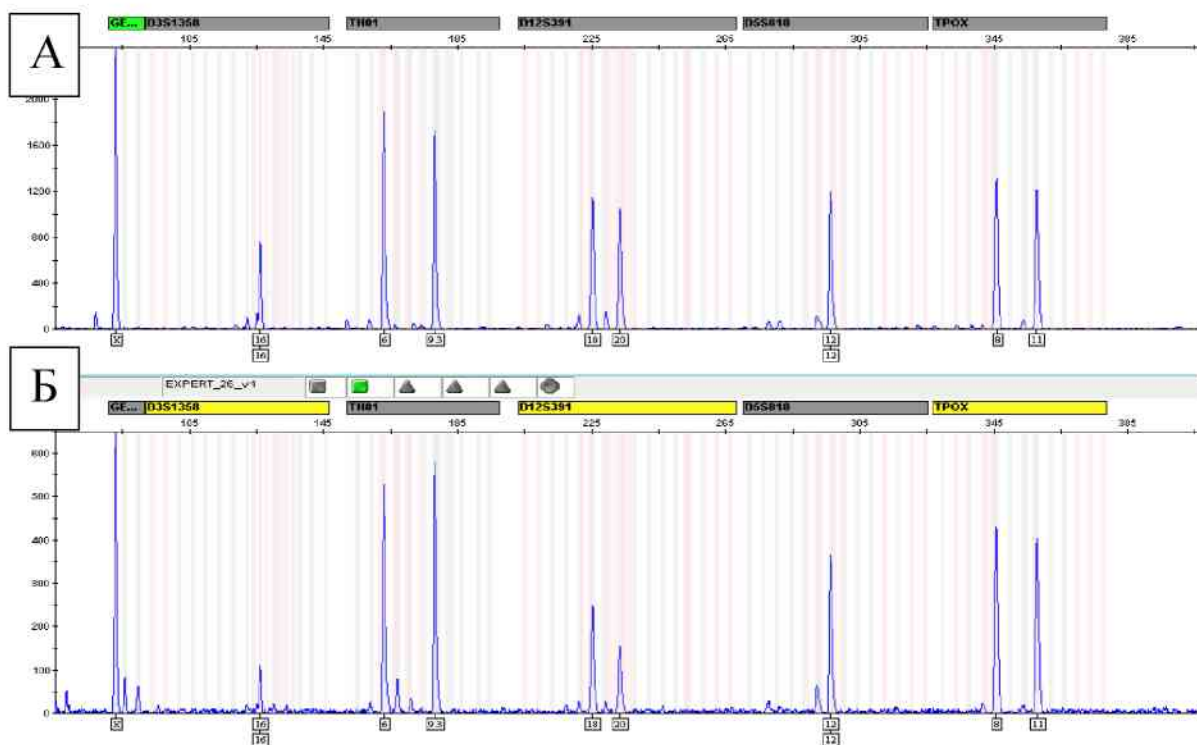


Рисунок.27. На электрофореграммах продемонстрированы выявленные локусы костной ткани зуба – Рис.27А, и ребра – Рис.27Б, количество ДНК, извлеченной из тканей зуба, не значительно, но больше ДНК, извлеченной из ребра

10. Выделение ДНК из волос, содержащих жизнеспособную луковицу набором на магнитных частица и ионообменной смолой показало сопоставимые результаты, хотя сигнал выявленных аллелей на электрофореграмме волос, выделенных Chelex 100, несколько ниже (Рис.28)

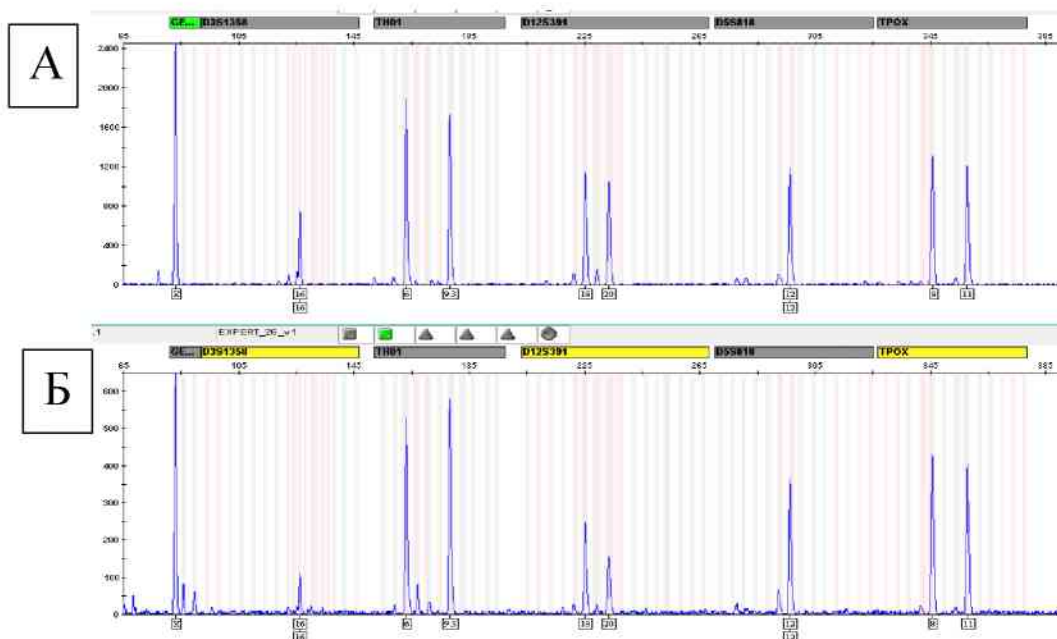


Рисунок. 28. На рис. 28А изображена электрофореграмма выявленных аллелей из волос, выделенных набором на магнитных частицах. На рис.28Б – электрофореграмма выявленных генетических признаков волос, выделенных ионообменной смолой

Таким, образом, выделение волос, содержащих жизнеспособные луковички возможно, как магнитными частицами, так и ионообменной смолой, выбор метода за экспертом.

3.3. Сравнение различных способов выделения ДНК: преимущества и недостатки

Совершенствование и развитие методов криминалистического ДНК-анализа способствует тому, что современная технология исследования ДНК позволяет успешно исследовать: практически все ткани и биожидкости организма человека, содержащие ДНК; микроколичества биоматериала; смешанные следы.

Если метод выделения ДНК осуществлен не верно, это приводит к получению загрязненной ДНК, не пригодной для исследования, либо к ее потере.

При выборе метода выделения ДНК следует учитывать ряд факторов, например, вид объекта, его состояние, условия хранения и давность

образования. На основании обзора отечественных и зарубежных источников можно сделать вывод, что самыми часто используемыми являются три метода: фенольный метод, с помощью ионообменной смолы Chelex 100 и выделение ДНК на магнитных частицах [2]. Эти методы в ходе многолетнего применения зарекомендовали себя как самые надежные методы получения незагрязненных и неповрежденных образцов ДНК.

Преимущества метода выделения ДНК на магнитных частицах:

1. Высокая эффективность – при малом количестве исследуемого вещества с небольшим содержанием НК возможно получить максимальную концентрацию НК;
2. Возможность удалить примеси и ингибиторы ПЦР из выделенной пробы;
3. Возможность автоматизации процесса выделения ДНК;
4. При использовании автоматизированных станций позволяет повысить производительность, т.е. одновременно выделять ДНК из большого количества образцов;
5. Уменьшается возможность ошибки (человеческий фактор) и контаминации при использовании автоматизированных станций;
6. Отсутствие необходимости использования токсичных реактивов, например, по сравнению с фенол-хлороформным методом выделения [7].

Недостатки метода выделения на магнитных частицах:

1. Стоимость коммерческих наборов несколько выше, чем стоимость при использовании ионообменной смолы Chelex 100 или фенольного метод;
2. По длительности процедуры - быстрее чем выделение фенольным методом, но дольше выделения методом Chelex 100;
3. Возможна потеря некоторого количества ДНК за счет многократных отмывок на этапах абсорбции и элюции [7].

Преимущества фенольного метода выделения ДНК:

1. Универсальный метод, пригоден для выделения ДНК из любых объектов: крови, волос, спермы, костей.

2. Наиболее полное удаление белков и различных клеточных компонентов, в результате чего можно получить ДНК высокой степени очистки, пригодную для длительного хранения [7].

Недостатки фенольного метода выделения ДНК:

1. Применение высокотоксичных реактивов;

2. Длительность процедуры;

3. Потеря части ДНК в исследуемом объекте, может теряться.

Вывод: метод доказывает свою эффективность лишь когда объект содержит относительно большое количество ДНК [7].

Преимущества метода выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100:

1. Не требует токсичных реактивов;

2. Короткое время проведения процедуры;

3. Используется большое количество объектов: кровь, сперма, слюна, волосы [3].

Недостатки метода выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100: можно применять только, когда исследуемый объект не содержит больших количеств белков, его клетки легко лизируются и объект не подвергался длительному хранению [7].

Преимущества метода выделения ДНК на спин-колонок: возможность концентрирования нуклеиновых кислот при элюировании небольшими объемами буфера/воды на финальной стадии протокола [49].

Технология на основе спин-колонок достаточно проста для одновременного выделения большого количества образцов, при этом получаем ДНК без примесей и достаточной концентрации [30].

Недостатки метода выделения ДНК на колонках:

1. Колоночная экстракция является наиболее трудоемкой, а автоматизированные альтернативы труднодоступны [30].
2. Высокая вероятность засорения пор мутными или вязкими образцами, содержащими, например, липиды и обломки образцов [16,49].
3. Высокая стоимость наборов для выделения, что не позволяет исследовать большое количество образцов [30].

В настоящее время существует множество специализированных методов, которые могут быть использованы для извлечения чистых биомолекул [48]. Технология должна обеспечивать высокую пропускную способность образцов; выход, чистота, воспроизводимость и масштабируемость биомолекул, а также скорость, точность и надежность анализа должны быть максимальными при минимизации риска перекрестного загрязнения [48].

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что качество выделенной ДНК на прямую зависит от сохранности следов, изъятых с осмотров мест происхождения, способа их упаковки и времени поступления их на генотипическое исследование, а также выбора метода экстракции ДНК. Объекты с мест преступления должны поступать в лабораторию в кратчайшие сроки, а упаковка вещественных доказательств обеспечивать их сохранность и исключать процессы микробиологической порчи. Процесс пробоподготовки необходимо проводить с учетом состояния представленных объектов, их количества и качества, чтобы исключить потерю ДНК, ее загрязнение посторонними следами, не имеющими отношения к обстоятельствам дела. Перед выбором метода экстракции ДНК, изучить объекты, представленные на исследование, определить места, откуда будут браться пробы, будет ли природа объекта-носителя влиять на проведение полимеразной цепной реакции. Также выбор метода выделения ДНК из объектов может зависеть от финансовых возможностей лаборатории и

ограниченности по времени, отведенному на получение результата. Перспектива развития внедрения новых методов и совершенствования имеющихся состоит в удешевлении стоимости коммерческих наборов, уменьшении времени на проведение анализа и количества промежуточных стадий.

Со времени первой экстракции ДНК, проведенной Фридрихом Мишером в 1869 году, ученые добились необычайного прогресса в разработке методов извлечения, которые являются более надежными, простыми и быстрыми в выполнении, более экономичными и дают более высокий выход [22]. Новые методы, которые являются более надежными и эффективными, способствовали расширению знаний о геноме человека и сыграли важную роль в появлении различных областей науки, таких как редактирование генов и персонализированная медицина.

Однако в настоящее время, по-видимому, не существует единой процедуры, применимой ко всем контекстам экстракции ДНК, из-за их ограничений в получении выходов с оптимальной чистотой и удобством использования. Следовательно, для достижения лучших результатов и упрощения обращения с ДНК необходимы решения, позволяющие преодолеть ограничения этих методов. Совершенствование конструкции существующих методов и разработка новых методик станут движущей силой для дальнейшего развития будущей технологии извлечения ДНК [40].

ВЫВОДЫ

1. Рассмотрены основные методы выделения ДНК из объектов биологического происхождения, изъятых с мест совершения преступления, различной природы (следы слюны, содержащие клетки буккального эпителия, следы крови как на марлевых салфетках, так и на предметах одежды, потожировые следы, содержащие клетки эпителия кожи, волосы с жизнеспособной луковицей, костный материал, ткани в парафиновых блоках, различной давности. Выбор метода экстракции ДНК во многом зависит от природы объекта, давности следа, а также финансовых возможностей лаборатории.
2. Выбраны наиболее предпочтительные методы изъятия и хранения объектов, изымаемых с осмотров мест преступления. Предварительное высушивание «влажных» следов является обязательным условием, исключающим их микробиологическую порчу, что является причиной разрушения ДНК биологических объектов судебно-биологического исследования. Так же предпочтительно изымать следы биологического происхождения целиком с предметом-носителем, так как в таком случае эксперт сможет сам выбрать способ пробоподготовки следа (смыв, соскоб, вырез), чтобы обеспечить максимальную экстракцию ДНК.
3. Проведена оценка количества ДНК в следах биологического происхождения, предоставляемых на молекулярно-генетическое исследование в экспертные учреждения. Для исследования брали выборку объектов в каждой категории $n=10$.
4. Оптимизированы методы экстракции ДНК из криминалистически значимых объектов судебно-биологической экспертизы. В результате исследования было установлено, что использующиеся на данный момент способы экстракции ДНК из вещественных доказательств, а именно выделение на магнитных частицах и с помощью ионообменной смолы, результативно для большинства объектов биологического происхождения,

изъятых с мест происшествий. При выделении ДНК из костной ткани, парафиновых блоков, контактных потожировых следов с предметов, следов крови большой (свыше 10 лет) давностью, рекомендовано проводить с помощью коммерческих наборов на основе магнитных частиц или другим способом, позволяющим проводить очищение выделенной ДНК. Экстракция следов крови и следов слюны возможна любым методом выделения ДНК, как с помощью магнитных частиц, так и ионообменной смолой Chelex 100. Выбор метода остается за экспертом, проводящем исследование и материально-технической оснащённостью лаборатории ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. АуKENов Н. Е., Масабаева М. Р., Хасанова У. У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // Наука и здравоохранение. 2014. № 1. С. 51-53.
2. Бадзюк И. Л., Голодков Ю. Э., Ларионова Е. Ю. Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы // Вестник Восточно-Сибирского института МВД России. 2012. № 1 (60). С. 81-89.
3. Методы исследования ДНК человека: выделение ДНК, ее качественная и количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения : учебно-методическое пособие / И. В. Корниенко [и др.]. Ростов-на-Дону : Изд-во Южного федерального ун-та, 2012. 214 с.
4. Набор SF 25 STR Kit : инструкция пользователя. Введ. с 01.02.2012. Москва : Диаэм, 2012. 39 с.
5. Пименов М. Г., Культин А. Ю., Кондрашов С. А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК – анализа : учебное пособие. Москва : ГУ ЭКЦ МВД России, 2001. 145 с.
6. Сираков И. Н. Выделение нуклеиновых кислот и последующее применение // Нуклеиновые кислоты – от базовых аспектов к лабораторным инструментам. 2016. № 5. С. 33-38.
7. Современные методы и средства выявления, изъятия, хранения и пробоподготовки ДНК-содержащих объектов : методические рекомендации / С. А. Кондрашов [и др.]. Москва : ЭКЦ МВД России, 2011. 80 с.
8. Стоянова Э. Выделяем нуклеиновые кислоты: эволюция методов // Биомолекула. 2022. № 10. С. 83-90.
9. Фалеева Т. Г. Молекулярно-генетическая идентификация потожировых следов в отпечатках пальцев на коже человека : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. Санкт-Петербург, 2021. 208 с.

10. Фалеева Т. Г. Потожировые следы человека как объект ДНК-идентификации личности // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2017. Т. 9. № 2. С. 78-84.
11. Холевчук А. Г. Некоторые современные методы исследования биологических следов, используемых для идентификации личности: опыт Японии // Библиотека криминалиста. Научный журнал. 2016. № 2. С. 260-266.
12. Хорошева А. Е. Объекты биологического происхождения в контексте судебного доказывания: тактика исследования и криминалистические ошибки // Библиотека криминалиста. Научный журнал. 2015. № 2. С. 298-309.
13. COrDIS SPRINT : инструкция пользователя. Введ. с 01.01.2018. Москва, 2017. 3 с.
14. COrDIS «Эксперт 26» : инструкция пользователя. Введ. с 01.01.2018. Москва, 2017. 42 с.
15. COrDIS Экстракт автомат : инструкция пользователя. Введ. с 01.01.2018. Москва, 2017. 18 с.
16. Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA – evaluation by real-time and digital PCR / R. C. Holmberg, A. Gindlesperger, T. Stokes [et al.]. // PLoS One. 2013. № 8. P. 23-32.
17. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA / A. L. Fabre, M. Colotte, A. Luis, S. Tuffet, J. Bonnet // Euro J Human Genetics 2014. №. 22. P. 79-85.
18. AutoMate Express Instrument : user guide. Int. on 01.01.2020. San Francisco : Applied Biosystems, 2019. 68 p.
19. Bangs Laboratories, Inc. Magnetic microspheres // Tech-Note 102. [Electronic resource]. URL: <https://www.bangslabs.com/sites/default/files/imce/docs/TechNote%20102%20Web.pdf>.
20. Bohley P. Das Schlosslabor in der Kueche von Hohentuebingen. Tübingen : Wiege der Biochemie, Verlag Der Faire Kaufladen, 2009. 123 p.

21. Butler J. M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing : methodology. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo : Elsevier Academic Press., 2012. 680 p.
22. Byrne J., Dahm R. Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA // *Biomics*. 2019. № 11. P. 249-258.
23. Cattaneo C., Gelsthorpe K., Sokol R. J. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis // *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2000. № 10. P. 102-104.
24. Chacon-Cortes D., Griffiths L. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 2014. № 2. P. 1-9.
25. Comparison of DNA extraction protocols and molecular targets to diagnose tuberculous meningitis / F. S. Palomo, M. G. Celle Rivero, M. G. Quiles [et al.]. // *Tuberculosis Res. Treat.* 2017. № 17. P. 89-96.
26. Comparison of four methods of DNA extraction for use in forensic medicine / V. Bogas, F. Balsa, M. Carvalho, M. J. Agnes, M. F. Pinheiro, F. Cortereal // *Forensic Science International: Genetics Supplement*. 2011. № 3(1). P. 194-195.
27. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research // *Hum. Genet.* 2008. № 122. P. 565-581.
28. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA // *Dev. Biol.* 2005. № 278. P. 274-288.
29. DNA extraction from sexual assault cases: comparison of standard methods with a nuclease-based approach / A. M. Garvin, A. Fischer, J. Schnee-Griese [et al.]. // *Investig Genet.* 2012. № 3. [Electronic resource]. URL: <https://doi.org/10.1186/2041-2223-3-25>.
30. DNA extraction: finding the most suitable method / C. Barbosa, S. Nogueira, M. Gadanho, S. Chaves // *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*. 2016. № 7. P. 135-154.
31. DNA IQ System – Small Sample Casework Protocol : technical bulletin. Int. on 01.01.2005. Madison : Promega Corporation, 2006. 15 p.

32. Farash K., Hanson E. K., Ballantyne J. Enhanced genetic analysis of single human bioparticles recovered by simplified micromanipulation from forensic 'Touch DNA' evidence // J. Vis. Exp. 2015. № 97. P. 592-612.
33. Fregeau C. J., Lett C. M., Fourney R. M. Validation of a DNA IQ-based extraction method for TECAN robotic liquid handling workstations for processing casework // Forensic Sci. Int.: Genet. 2010. № 5. P. 292-304.
34. Historic nucleic acids isolated by Friedrich Miescher contain RNA besides DNA / A. H. Thess, P. Ingmar, J. Benyamin, R. Dahm // Biological Chemistry. 2021. № 402. P. 1179-1185.
35. Iyavoo S., Hadi S., Goodwin W. Evaluation of five DNA extraction systems for recovery of DNA from bone Forensic Science International // Genetics Supplement. 2013. № 4. P. 174-175.
36. Jeffreys A. J., Wilson V., Jheon S. L. Hypervariable minisatellite region in human DNA // Nature. 1985. № 316. P. 67-73.
37. Jeffreys A. J., Wilson V., Jheon S. L. Individual-specific "fingerprints" of human DNA // Nature. 1985. № 316. P. 76-79.
38. Moore D. D., Chory J., Ribaudo R. K. Isolation and purification of large DNA restriction fragments from agarose gels // Current Protocols in Immunology. 1993. № 8. P. 1051-1052.
39. Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics / N. Ali, R. C. P. Rampazzo, A. D. T. Costa, M. A. Krieger // BioMed Research International. 2017. № 10. P. 60-64.
40. Preeta J. Shetty // Evolution of DNA extraction methods. 2020. №. 8(1). P. 12-34.
41. PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit : user guide. Int. on 01.01.2009. Foster City : Applied Biosystems, 2008. 70 p.
42. Quantification of human mitochondrial DNA using synthesized DNA standards / M. F. Kavlick, H. S. Lawrence, R. T. Merritt, C. Fisher, A. Isenberg, J. M. Robertson, B. Budowle // J Forensic Sci. 2011. № 6. P. 57-63.

43. Quantiler™ HP and Trio DNA Quantification Kits : user guide. Int. on 01.01.2018. Foster City : Applied Biosystems, 2017. 116 p.
44. Schulz M. M., Reichert W. Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing // Forensic Sci. Int. 2002. № 127. P. 128-130.
45. Shiro George Collection and Preservation of evidence [Electronic resource]. URL: <https://crime-scene-investigator.net/evidenc3.html>.
46. Singh U. A., Kumari M., Iyengar S. A method for improving the quality of genomic DNA obtained from negligible amounts of tissue and blood samples using Chelex 100 resin // Biol Proceed Online. 2019. № 12. [Electronic resource]. URL: <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0077-6>.
47. Standard operation procedure for sampling bone and tooth specimens from human remains for DNA testing at the ICMP. Int. on 16.02.2015. Sarajevo, 2015. 19 p.
48. Tan S. C., Yiap B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present // J Biomed Biotechnol. 2009. № 10. P. 155-165.
49. Thatcher S. A. DNA/RNA Preparation for molecular detection // Clin. Chem. 2015. № 61 (1). P. 89-99.
50. Van Orschot R. A., Ballantyne K. N., Mitchell R. J. Forensic DNA // A review. 2010. № 14. P. 1-14
51. Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple DNA extraction for PCR typing from forensic material // BioTechniques. 2013. № 54(3). P. 21-44.
52. Werret D. J. DNA-fingerprinting // International criminal police review. 1987. № 408. P. 34-54.
53. Willard J. M., Lee D. A., Holland M. M. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR // J. Forensic Sci. 2010. № 55 (1). P. 25-33.
54. Wilson Optimization of a method for the extraction of DNA from human skeletal remains / M. Sherri, B. S. Deaton, J. Brittan, M. S. Bintz, R. Mark. [Electronic resource]. URL: <https://www.promega.com/>

/media/files/resources/conference-proceedings/ishi-25/poster-abstracts/17-sherri-deaton.pdf.