

Биологический вестник

Научно-теоретический журнал

т. 5, № 1-2, 2001

Основан в 1965 г.

Выходит 2 раза в год

С о д е р ж а н и е

Обзоры

Геномная дактилоскопия: ДНК-технологии в криминалистике <i>А.В. Шмонин, В.П. Комаристая</i>	3
Методы в оцінці норми фізичного розвитку дітей: теоретичні аспекти <i>Анна Радохонська</i>	17

Физиология и биохимия животных

Бинарный комплекс Grg-белок-РНК полимеразы: картирование участка в Grg-белке, локализованного вблизи активного центра фермента <i>О.А. Лапченко, А.И. Божков, С.И. Борухов</i>	22
Вплив гіпертермії на проліферацію та апоптоз клітин лінії L1210 лейкемії миші, чутливих та резистентних до дії цисплатини <i>М.Я. Якимович, І.А. Якимович, Р.С. Стойка</i>	32
Роль амінотрансферазних реакцій у підтриманні функцій енергозабезпечення мітохондріями печінки шурів з різною резистентністю до гіпоксії при введенні L-аргініну та N ^ω -нітро- L-аргініну <i>О.В. Іккерт</i>	38
Регуляторні взаємовпливи в організмі людини при різних статичних навантаженнях <i>О.В. Мусяченко, Д.І. Санагурський</i>	42
Роль холіно-І адренорецепторів у регуляції стану системи антиоксидантного захисту і процесів ліпопероксидації при адаптації шурів до періодичної нормобаричної і гострої гіпоксії <i>Н.М. Кургалюк, Т.В. Серебровська, М.О. Гальків, С.К. Гордій</i>	46
Патологоанатомічна характеристика щитовидної залози у телят з уродженням зобом <i>В.Л. Романюк</i>	51
Влияние лидокаина на устойчивость эритроцитов в условиях гипотермического насыщения проникающими криопротекторами <i>В.К. Дворцевой, В.В. Киришча, А.Л. Марковский</i>	55
Тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование в печени кур при избыточном поступлении витаминов А и Е в организм <i>И.А. Костюк</i>	59
Коррекция антиокислительной системы препаратом липосом как способ лечения инфекционных заболеваний <i>Н.В. Пшеченко, В.А. Бондаренко, Т.А. Маричина, А.В. Мартынов, А.В. Паранич</i>	64
Влияние полиэтиленгликолей на рецепцию биогенных аминов <i>Л.Д. Попова</i>	68
Експериментальний аналіз взаємодії процесів циклу бодрствование-сон і емоціонального реагування в ранньому онтогенезі <i>Н. П. Смоленко, О. Г. Берченко</i>	72
Влияние алкил-β, D-глюкопиранозидов на температурозависимый гипертонический гемолиз эритроцитов, модифицированных фенилгидразином <i>О.П. Сычикова, Н.М. Шпакова, В.А. Бондаренко</i>	81

Обзоры

УДК 575

Геномная дактилоскопия: ДНК-технологии в криминалистике

А.В. Шмонин, В.П. Комаристая

НИИ биологии, Харьковский национальный университет им.В.Н.Каразина,
пл. Свободы 4, Харьков 61077, Украина

Резюме: Обзор посвящен проблемам генетической идентификации человека, в частности - подбору маркерных генов, принципам сбора и хранения биологических доказательств, методам выделения и количественной оценки ДНК человека. Особое внимание уделяется подходам, основанным на полимеразной цепной реакции. Рассматриваются вопросы интерпретации и статистической оценки результатов ДНК-тестирования при установлении отцовства и идентификации личности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, человек, криминалистика.

Геномная дактилоскопия – комплекс молекулярно-биологических методов, используемых в криминалистике для идентификации личности и установления родства по ДНК. Эти методы позволяют решать следующие задачи: установление наличия или отсутствия связи подозреваемого с местом и орудием преступления; опознание останков жертв катастроф и поиск пропавших без вести; доказательство или опровержение обвинений в изнасиловании и раскрытие групповых и серийных половых преступлений; установление спорного отцовства, материнства или иного генетического родства [1].

Основной принцип геномной дактилоскопии – сопоставление результатов молекулярно-генетического теста, к примеру, подозреваемого и биологической улики, оставленной на месте преступления. Получаемый в результате ДНК-теста профиль индивидуален для каждого человека так же, как рисунок отпечатков пальцев (исключение составляют лишь монозиготные близнецы, у которых ДНК-профили идентичны) [2, 3], поэтому статистически достоверное совпадение профилей ДНК обозначает, что преступник идентифицирован. Преимущества геномной дактилоскопии перед традиционными методами идентификации – в ее универсальности: ДНК одинакова во всех тканях организма, что позволяет использовать для идентификации любой биологический материал [4]. Другой уникальной особенностью ДНК как улики является тот факт, что у кровных родственников профили ДНК обладают определенной степенью сходства. Это делает возможным не только установление генетического родства, но и идентификацию неопознанных останков или улик по профилям ДНК родственников пропавшего без вести или подозреваемого [1].

Результаты ДНК-теста, так же как и данные дактилоскопии, рассматривают в суде как независимое и объективное свидетельство [5]. В США действует более 100 криминалистических лабораторий, которые

проводят сотни тысяч ДНК-тестов в год. Программы по созданию криминалистических ДНК-лабораторий реализуются в настоящее время в большинстве стран Европы и Азии [3]. С использованием ДНК в качестве улики за последние пятнадцать лет в мире было раскрыто более 50000 уголовных преступлений [1].

В данном обзоре рассматриваются теоретические основы применения современных ДНК-технологий в криминалистике, а также вопросы методологии и статистической обработки результатов геномной дактилоскопии.

Что представляет собой профиль ДНК

Профиль ДНК содержит информацию о том, какие аллели (варианты одного гена) занимают тот или иной локус (место на определенной хромосоме) у данного индивидуума.

Большинство локусов в геноме человека мономорфны, то есть несут единственный аллельный вариант у всего человечества и не информативны как маркеры для идентификации личности или установления родства. Это кодирующие гены, продукты мутаций которых элиминируются естественным отбором. Некоторые кодирующие локусы несут редкие аллельные варианты (результат редких нелетальных мутаций), по которым можно идентифицировать их носителей, но частота этих генов в популяции не превышает 1-2% [1]. Наиболее информативны полиморфные маркеры – локусы, по которым в популяции существует минимум два аллеля, и ни один из них не является редким, то есть, частота каждого из них в популяции – более 2%. Полиморфные признаки были впервые выявлены серологическими методами и использовались криминалистами задолго до выяснения их генетической природы. В 1900 году Landsteiner открыл полиморфизм по группам крови АВ0 [6]. Вскоре после открытия началось использование теста на группу АВ0 в установлении отцовства [7].

Как при установлении отцовства, так и при идентификации личности, логика криминалистического теста состоит в исключении из числа предполагаемых отцов или подозреваемых максимально возможного числа непричастных индивидуумов [1]. Рассмотрим пример теста на группу АВ0. Если группа крови ребенка – III (В), матери – II (А), то мужчин с группами крови I (0) и II (А) (88% взрослого мужского населения Земли) следует исключить из числа предполагаемых отцов как не несущих аллеля В. Любой мужчина с группой крови III (В) или IV (AB) должен быть включен в группу предполагаемых отцов, которая составит 12% населения. Если провести тест еще по одному полиморфному признаку – системе резус-фактора, открытой Levine и Stetson, Landsteiner и Wiener в 1939-1940 годах [6], и у резус-отрицательной матери (Rh⁻) окажется резус-положительный ребенок (Rh⁺), то всех резус-отрицательных мужчин (15%) следует исключить из группы предполагаемых отцов. Это сократит ее до 10,2%, так как наследование групп крови разных систем – независимые события и вероятность одновременного наследования III группы и Rh⁺ равна произведению вероятностей этих событий ($0,12 \cdot 0,85 = 0,102$). Использование сывороток, устанавливающих 7 групп крови у матери, ребенка и предполагаемого отца, позволяет опровергнуть неверно указанное отцовство в среднем почти в 60% случаев (табл. 1) [8]. Однако, серологических маркеров недостаточно для идентификации истинного отца.

Преимущество ДНК-теста – в сочетании более высокого полиморфизма в индивидуальных локусах с большим числом локусов, которые могут быть проанализированы. Можно подобрать столько и таких полиморфных ДНК-маркеров, что вероятность ошибочного заключения об идентичности (отцовстве) будет ничтожно мала [7]. В 1992 году locus гистосовместимости HLA-DQA1(DQα) стал первым кодирующим маркерным геном, который был использован в криминалистике [9]. Вероятность исключения непричастных индивидуумов на основании анализа одного данного маркера составляла 84% [1]. В 1994 году ана-

лизировали уже 6 генетических маркеров: DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC; вероятность исключения непричастных индивидуумов по ним составляла порядка 90% [1].

Поскольку некодирующие участки ДНК не находятся под давлением отбора, степень их полиморфизма значительно выше, чем у структурных генов. Эти гипервариабельные районы разбросаны по всему геному и содержат набор коротких, обычно GC-богатых тандемно повторяющихся единиц. Аллельные различия в каждом локусе состоят в различном числе повторов (VNTR – variable number of tandem repeats) и возникли, как предполагают, в результате неравного кроссинговера [10]. VNTR длиной 300 – 1000 п.н., представляющие собой в среднем около 100 повторов мотива длиной 15-70 п.н., получили название минисателлиты или LTR (long tandem repeats) [11].

VNTR длиной 100-300 п.н., в среднем 5-50 повторов мотива длиной 2-9 п.н., называются микросателлитами или STR (short tandem repeats) [1]. STR обладают меньшей степенью полиморфизма, и, следовательно, информативности, чем LTR. Однако, анализ LTR не получил широкого распространения, так как длинные последовательности ДНК больше подвержены деградации, которая обычно наблюдается в биологических образцах-уликах. В 1999 году ведущие криминалистические лаборатории отказались от использования PM/DQA1 и LTR в пользу STR [3]. Используемые в настоящее время STR-маркеры были тщательно выбраны из более 2 тысяч известных. Маркеры должны характеризоваться невысокой частотой мутирования и высокой степенью полиморфизма [2]. Первоначально маркерные локусы должны были не иметь или иметь мало микровариантов (аллелей, различающихся менее чем на целую повторяющуюся единицу мотива), поскольку их было невозможно различить электрофоретическим разделением по длине. В настоящее время использование капиллярного электрофореза позволяет разделять микроварианты. В отличие от 7 серологических маркеров – групп крови, 15 аутосомных STR-маркеров (табл. 2) позволяют опровергнуть неверно указанное отцовство в 99,99996% случаев [12].

Особое значение в качестве маркера имеет ген амелогенина (AMEL) (табл. 2). Лocus этого гена есть и в X- и Y-хромосоме, его аллели не рекомбинируют и различаются по длине. Аллельный вариант в X-хромосоме претерпел делецию в 6 пар нуклеотидов в некодирующей области. AMEL используется как маркер пола при идентификации [1].

Высоко полиморфные короткие тандемные повторы были выявлены и в Y-хромосоме (Y-STR). В криминалистике сейчас используют 8 основных Y-STR маркеров: DYS19, DYS385, DYS389 I и II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 [13] и иногда еще один дополнительный динуклеотидный маркер YCAII [14], но, вероятно, их число будет увеличиваться [15]. В отличие от аутосомных маркеров они не рекомбиниру-

Таблица 1. Вероятность исключения неверно указанного отцовства при определении группы крови по данным для популяции Великобритании [8].

Система группы крови	Вероятность исключения на основе данной системы	Вероятность исключения на основе данной системы и всех предыдущих
AB0	0,1760	0,1760
MNSs	0,2390	0,3729
Резус	0,2520	0,5309
Келл	0,0379	0,5487
Лютеран	0,0333	0,5637
Даффи	0,0487	0,5849
Кидд	0,0286	0,5968

Шмюшн, Комаристая

Таблица 2. STR используемые в системах определения марки PowerPlex® [12].

Локус	Хромосомная локализация	Генный продукт	Повторяющийся фрагмент	Размер аллелей (пар оснований)	Количество повторяющихся фрагментов в аллелях	Не определяемые микро-варианты
AMEL ¹	Xp22.1-22.3 и Y	Амелогенин	H	212(X), 218(Y)	H	Нет
D ¹⁶ S ⁵³⁹ ³	16q24-qter	H	AGAT	264-304	5, 8-15	нет
D7S820	7q11.21-22	H	AGAT	215-247	6-14	нет
D13S317	13q22-q31	H	AGAT	165-197	7-15	нет
D5S818*	5q23.3-32	H	AGAT	119-151	7-16	нет
CSF1PO	5q33.3-34	Протоонкоген C-FMS	AGAT	291-327	6-15	нет
TPOX	2p25.1-pter	Тироил-пероксидаза	AATG	224-252	6-13	нет
TH01*	11p15.5	Тирозин-гидроксилаза	AATG	179-203	4-9, 9.3, 10-11, 13.3	9.3
VWA*	12p12-pter	Фактор Виллебранда	AGAT	127-167	10-22	нет
Penta E*	15q	H	AAAGA	379-474	5-24	20.3
D18S51*	18q21.3		AGAA	290-366	8-10, 10.2, 11-13, 13.2, 14-27	нет
D21S11*	21q11-21q21		TCTA	203-259	24, 24.2, 25, 25.2, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38	нет
D3S1358*	3p	H	TCTA	115-147	12-20	нет
FGA*	4q28	Фибриноген α	TTTC	326-444	17-30, 31.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2	18.2, 19.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2
D8S1179*	8	H	TCTA	203-247	7-18	нет
Penta D**	21q	H	AAAGA	376-449	2, 2.2, 5, 7-17	нет

Согласно Международной Системе Номенклатуры Генов (ISGN – International System for Gene Nomenclature) и Комиссии по ДНК Международного Общества Криминалистической Гематогенетики:

1 – кодирующие локусы имеют уникальное обозначение в 2-7 заглавных букв.

2 – D – ДНК;

3 – номер хромосомы;

4 – S – данный регион встречается один раз на геном ("single copy");

5 – номер данного маркера на хромосоме (устанавливается по очередности открытия);

* – аллели используемые в системе PowerPlex® 2.1 и PowerPlex® 16

** – аллели используемые только в системе PowerPlex® 16

H – не определено

ют и представляют собой устойчивое сочетание – гаплотип, наследуемый мужчинами по отцовской линии. ДНК-профили, построенные на основании Y-STR, позволяют устанавливать отцовство в случае, когда предполагаемый отец недоступен для анализа, но можно проанализировать его кровного родственника по мужской линии. Вероятность исключения индивидуума в случае Y-STR не может быть рассчитана исходя из частоты отдельных аллелей, и точная идентификация возможна только при наличии достаточной обширной базы данных по популяционным частотам целых гаплотипов. В базе данных по Европейс-

кой популяции 69% гаплотипов встречаются всего один раз, то есть в 69% случаев по 9-ти перечисленным Y-STR-маркерам возможна точная идентификация или установление родства [14]. Y-STR незаменимы при расследовании половых преступлений, когда ДНК мужчины (или нескольких мужчин) и женщины смешаны (для исследования берут вагинальный соскоб), особенно если ДНК мужчины содержится в следовых количествах [15]. Y-STR выступают маркерами пола при выпадении локуса AMEL из ДНК-профиля (например, в результате мутации), что довольно часто встречается во многих этнических группах [15, 16].

Гипервариабельные последовательности имеются не только в ядерной, но и в митохондриальной ДНК (мтхДНК). Это два некодирующих участка HV1 и HV2, составляющие контрольный регион, или так называемую D-петлю, длиной около 610 п.н. МтхДНК человека не рекомбинирует и наследуется от матери через цитоплазму яйцеклетки как гаплотип, следовательно, по последовательностям HV1 и HV2 возможно установление материнства и родства по материнской линии. Как и в случае Y-хромосомы необходимо знать частоту типов HV1 и HV2 в соответствующей популяции. Хотя существует несколько типов последовательностей HV1 и HV2, которые обычны и потому мало информативны, очень многие типы настолько редки, что встречаются всего один раз в больших базах данных [17, 18]. Так, в Европейской базе данных 70% типов последовательностей участков HV1 и HV2 уникальны, то есть в 70% случаев возможна однозначная идентификация [14]. Типы мтхДНК разных индивидов отличаются в среднем 8,9 заменами нуклеотидов в 8 так называемых «быстрых сайтах», участках ДНК, характеризующихся повышенной скоростью мутирования [19].

Поскольку 500-2000 копий мтхДНК, существующие в клетке, реплицируются независимо, то мутации в мтхДНК иногда приводят к гетероплазмии – наличию в одной клетке клонов мтхДНК, различающихся последовательностями. По данным Melton & Nelson [19] частота возникновения гетероплазмии не превышает 5,7%. Как и в случае редких аллелей, носители гетероплазмии могут быть идентифицированы по ее типу. Так, останки царя Николая II были идентифицированы по тому же типу гетероплазмии, что и у останков его брата Георгия, умершего от туберкулеза в 1899 году [20].

В настоящее время не прекращается поиск новых информативных высоко полиморфных маркеров, в частности – сайтов (участков ДНК) внутри кодирующей области мтхДНК, содержащих нейтральные однонуклеотидные замены (SNP – single nucleotide polymorphism) [18].

Методологические подходы к построению ДНК-профилей

Поскольку аллели гипервариабельных локусов различаются числом tandemных повторов, а следовательно, длиной, они могут быть разделены электрофоретически и идентифицированы по длине. Первым подходом в анализе tandemных повторов (VNTR) был метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов RFLP (restriction fragment length polymorphism), введенный в криминалистическую практику в 1988 году [3]. ДНК гидролизировали рестриктазой *EcoR I*, которая расщепляет молекулу ДНК в определенных, узнаваемых этим ферментом, сайтах рестрикции. Сайты рестрикции *EcoR I* расположены на ДНК достаточно часто, но рестриктаза не нарушает целостность VNTR. Полученные фрагменты разделя-

ли в 1% агарозном геле, переносили на нейлоновый фильтр и гибридизовали по Southern [21, 22] с радиоактивными зондами, комплементарными повторяющимся единицам VNTR [10]. Полученные на авторадиограммах отпечатки сайтов связывания радиоактивных зондов с рестрикционными фрагментами разной длины специфичны для данного индивидуума, и полосы, их составляющие, наследуются как менделирующие признаки, что позволяет проводить идентификацию и устанавливать отцовство по обычной схеме. Несмотря на высокую степень информативности, анализ минисателлитов методом RFLP имеет ряд недостатков: требует значительного количества ДНК в образце (5-250 нг), трудоемок и довольно длителен (5-7 дней) вследствие чего, к 2000 году большинство криминалистических лабораторий от него отказались [3].

Более перспективный подход – анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов AFLP (amplified fragment length polymorphism), основанный на полимеразной цепной реакции (PCR – polymerase chain reaction). В результате процедур, которые детально будут описаны ниже, осуществляют избирательное размножение индивидуальных последовательностей ДНК: кодирующих генов, LTR, STR, Y-STR, HV1 и HV2. Большинство процедур автоматизировано [23], результаты могут быть получены уже через 24 часа, для анализа требуется всего 1 нг ДНК [1]. Продукты амплификации идентифицируются методом гибридизации по Southern [21, 22] или по положению на электрофореграмме (LTR и STR). Первой системой анализа, основанной на AFLP и гибридизации с флуоресцентными зондами, была система HLA-DQA1. В данном локусе – 6 аллелей, следовательно, в системе – 6 зондов [24]. Гипервариабельные регионы мтхДНК секвенируют по методу Sanger [25]. В перспективе – внедрение метода обнаружения однонуклеотидных замен в мтхДНК с помощью так называемого TaqMan-подхода. Образец ДНК инкубируют с несколькими флуоресцентными зондами, комплементарными разным аллельным вариантам, не связавшиеся зонды отмывают. Затем исследуемый участок амплифицируют. Синтезируя дочернюю цепь, полимераза будет удалять комплементарный, связавшийся с исследуемой последовательностью, зонд и освободить флуоресцентную метку в раствор. По типу метки в растворе можно судить о том, какова последовательность нуклеотидов в интересующем сайте [18].

Материал для ДНК-тестирования

Первоначально анализу ДНК можно было подвергнуть только биологический материал, содержащий клетки с ядрами. Это ограничение было преодолено с внедрением в 1996 году методов анализа мтхДНК, которая присутствует и в тканях с безъядерными клетками, например в стержне волоса [1]. Количество необходимого биологического материала определяется содержанием в нем ДНК (табл. 3).

Таблица 3. Содержание ДНК в биологических образцах, выступающих вещественными доказательствами [5].

Образец	Содержание ДНК
Жидкая кровь	20000 – 40000 нг/мл
Пятна крови	250 – 500 нг/см ²
Семенная жидкость	150000 – 300000 нг/мл
Поскопальный вагинальный мазок	10 – 3000 нг
Волос (с корнем)	
вырванный	1 – 750 нг/корень
выпавший	1 – 10 нг/корень
Слюна	1000 – 10000 нг/мл
Соскоб буккального эпителия	100 – 1500 нг
Моча	1 – 20 нг/мл
Кость, зубы	3 – 10 нг/мг
Ткани	50 – 500 нг/мг

Чувствительность современных методов позволяет анализировать не менее 1 нг ДНК [24]. Даже одного выпавшего волоса, отпечатка пальцев, следа слюны на почтовой марке, конверте или окурке может оказаться достаточно для идентификации личности. Достаточно для анализа количество ДНК может быть выделено также из пота, желудочного сока, кала, хотя получить полный ДНК-профиль из этих материалов трудно из-за высокой степени деградации ДНК в них [5]. Хотя ДНК и подвержена деградации (бактериальной или под действием солнечного света), она достаточно устойчива, чтобы можно было проанализировать улики, оставленные несколько лет назад. ДНК костной ткани отличается наибольшей сохранностью, поэтому этот материал используют для идентификации останков, пролежавших в земле несколько десятков лет [26]. Если материала мало или он сильно деградирован, рекомендуется прибегать к анализу мтхДНК. Принципиальное преимущество мтхДНК в том, что она присутствует в количестве 500-2000 копий на клетку в отличие от двух копий ядерной ДНК. Такое количество повторов увеличивает вероятность того, что несколько копий сохранятся в деградированном образце [19].

При осмотре места преступления, отборе и хранении образцов до лабораторных исследований следует учитывать, что современные методы анализа ДНК, особенно мтхДНК, чрезвычайно чувствительны. Даже малые количества ДНК непричастных людей, случайно привнесенные на место преступления с отпечатками пальцев или брызгами слюны, (так называемый вторичный перенос) могут повлиять на результаты анализа и ввести следствие в заблуждение. Биологические улики должны быть изолированы от контакта с другими источниками ДНК. Отобранные образцы следует поместить в стерильные бумажные пакеты и хранить в прохладном сухом месте [5].

При соответствующих условиях хранения ДНК довольно устойчива, что позволяет создавать банки

биологических образцов. Кровь или образцы буккального эпителия помещают на ватный тампон или карточку ватмановской бумаги, высушивают при комнатной температуре и хранят в сухом прохладном помещении. Так, в Вирджинии (США) создан банк образцов крови осужденных за изнасилование [27]. Задача банка – повысить раскрываемость половых преступлений, так как по ним наблюдается высокий процент рецидивов [28]. В Испании, в рамках программы «Феникс», создан добровольный банк образцов ДНК родственников пропавших без вести. К этому банку обращаются при идентификации неопознанных останков [29].

Методы выделения ДНК из биологических образцов

Для выделения ДНК необходимо отделить молекулы ДНК от других высокомолекулярных компонентов, содержащихся в биологическом образце, – белков, гликопротеидов, полисахаридов. Это задача может быть решена методом экстракции смесью фенола и хлороформа. Преимущества этого метода в том, что фенол-хлороформная смесь с водой образует двухфазную систему. Фенол, являясь сильным детергентом, отмывает ДНК от большей части белков, полисахаридов и липидов, при этом белки переходят в нижнюю фенол-хлороформную фазу, а нуклеиновые кислоты остаются в водной фазе [30]. Второй метод – очистка биологического образца от белков протеолизом с использованием протеиназы К (Chelex метод) [12]. После отделения ДНК от высокомолекулярных компонентов нужно отделить их от низкомолекулярных компонентов. Для этого используют различные методы осаждения ДНК из раствора – высаливание, осаждение этанолом, фильтрацию через стекловолокно либо мембранные фильтры, экстракцию силикагелем [31, 32]. В последнее время был предложен еще ряд методов: экстракция с использованием поливинилпирролидона и ацетилтриметилбромидом аммония [33], QIAamp spin column метод [34].

Количественная оценка ДНК человека

Для успешного проведения полимеразной цепной реакции необходимо знать количество анализируемой ДНК. Один из способов – иммобилизация молекулы ДНК с последующей гибридизацией с радиоактивно или флуоресцентно мечеными зондами. Общее количество ДНК в образце определяют, разделяя тотальную ДНК в агарозном геле с окраской этидиум бромидом, а собственно человеческую ДНК – методом слот-блот гибридизации со специфическим для приматов маркером D17Z1, используя Quantiblot [11].

Способ, позволяющий определять количество ДНК человека в присутствии загрязняющих образцов ДНК (бактерий и грибов), был недавно предложен фирмой Promega. Система AluQuant[™] Human DNA Quantitation позволяет регистрировать от 0.1 нг до 50 нг в образце, при этом эквивалентные количества

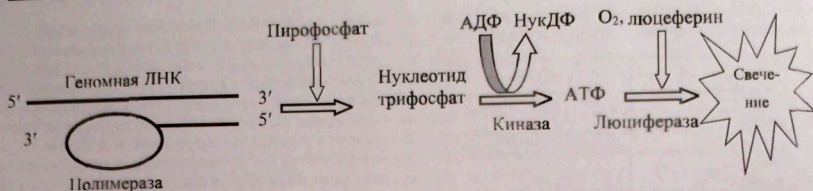


Рис. 1. Схема химических реакций в системе количественного определения ДНК с использованием люциферазы (AluQuant™ Human DNA Quantitation System) [35].

ДНК дрожжей, бактерий, насекомых, птиц, теплокровных (кроме приматов) не влияют на результаты определения. Специфичность определения основана на гибридизации ДНК с зондом, комплементарным повторяющейся последовательности Alu, которая встречается только в геноме человека и высших приматов. Образование дуплекса запускает две последовательные ферментативные реакции, в результате которых образуется фосфоресцирующее за счет энергии АТФ продукты, степень свечения которых пропорциональна количеству ДНК человека (рис. 1) [35].

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод, позволяющий быстро (в течение нескольких часов) размножить определенную последовательность ДНК. Для этого ограничивающие (фланкирующие) данную последовательность участки гибридизуют с короткими фрагментами – олигонуклеотидными праймерами, длиной примерно 20 оснований (рис. 2). ДНК-полимераза в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов синтезирует участок, ограниченный праймерами, которые выступают в качестве затравок. Синтез комплементарной цепи идет в направлении 5'-3' (нуклеотиды достраиваются к 3' концу праймера). Эффективно амплифицируется участок длиной не более 2000 п.о. Последовательность операций следующая. Для того чтобы получить матричную цепь, ДНК денатурируют, повышая температуру, это приводит к образованию в растворе одноцепочечных ДНК, которые и служат матрицей. Затем температуру снижают, и каждый праймер гибридизуется с комплементарным участком на одиночной цепи ДНК, ограничивая, таким образом, один из концов требуемого участка – этот процесс называется отжигом праймеров. После присоединения праймеров температуру повышают до оптимальной для работы полимеразы и ДНК-полимераза синтезирует дочернюю цепь.

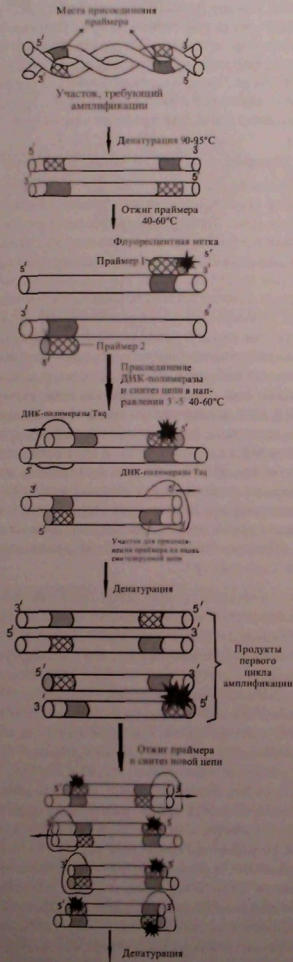
До недавнего времени использовали термостабильный фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*, после каждого цикла денатурации ДНК полимеразы теряла свою активность и ее приходилось добавлять в раствор. Использование термостабильной ДНК-полимеразы Taq из термофильной бактерии *Thermus*

aquaticus, способной эффективно синтезировать дочернюю цепочку при высокой температуре (70-75°C), позволило не только проводить множество циклов без замены фермента, но и повысить специфичность и количественный выход продуктов амплификации. В настоящее время предложено использовать полимеразу AmpliTaqGold, которая остается неактивной при комнатной температуре. Активируется и работает полимеразы при температуре 95°C [12].

После этапа синтеза температуру вновь повышают, и происходит расхождение матричной и вновь синтезированной цепи ДНК. Далее следует еще один цикл – отжиг праймера и синтез ДНК, но при этом другой праймер спаривается с вновь синтезированной ДНК и ограничивает другой конец амплифицируемого участка. После этого устанавливается оптимальная температура для синтеза ДНК. Цикл: денатурация, гибридизация, синтез – повторяется примерно 60 раз с удвоением в каждом цикле дуплексного фрагмента, т.е. за n циклов образуется 2^n копий сегмента, ограниченного праймерами. Подбрав условия отжига праймера (температуру, ионную силу), длину праймера и нуклеотидный состав, можно достичь высокой степени специфичности и в одном препарате ДНК амплифицировать несколько независимых фрагментов. Современное оборудование позволяет полностью автоматизировать весь процесс и проводить одновременно амплификацию до 16 различных фрагментов. Продукты ПЦР разделяют электрофоретически и идентифицируют по длине и спектру флуоресценции предварительно флуоресцентно меченых праймеров. Метка позволяет разделять различные по нуклеотидному составу, но одинаковые по электрофоретической подвижности продукты ПЦР [12].

В ходе проведения ПЦР возможно получение артефактов, называемых «сигналы-запинки» (stutter bands), вследствие ошибок в процессе амплификации. Эти продукты на один тандемный повтор короче, чем истинные аллели, и возникают из-за соскальзывания Taq-полимеразы с матрицы в процессе амплификации. Количество подобных ошибок зависит от длины повторяющейся единицы. Так, ошибки достаточно часты при использовании STR с моно- и динуклеотидными повторами, меньше при использовании три-, тетра- и пентануклеотидных повторов, и практически не встречаются в LTR [36]. С неспецифической ам-

Рис. 2. Схема ПЦР. Полностью показан первый и второй цикл амплификации, продукты десятого цикла амплификации. Температурные условия даны для ДНК-полимеразы Taq. Заметьте, что длинные фрагменты накапливаются в арифметической прогрессии, а короткие, ограниченные праймерами, в геометрической прогрессии и очень скоро начинают преобладать среди продуктов амплификации.



плификацией связано и то, что обнаружение мужской ДНК затруднено, если ее количество в смешанном образце меньше 5% суммы мужской и женской ДНК. Причина – маскирующий эффект женских аллелей, особенно – продуктов их неполной репликации («сигналов-запинок»), близких по длине мужским аллелям. Такие неспецифические продукты дают локусы DYS391 и DYS393, праймеры для которых по этой причине часто исключаются из реакционной смеси PCR [15]. Специфичность PCR можно повысить, уменьшив длину ампликона и используя энхансеры, что позволяет получать достоверные результаты для образцов, содержащих всего 0.5% мужской ДНК [37].

Деградация ДНК и недостаток материала могут привести к «выпадению» отдельных локусов из генетического профиля. Особенно этому эффекту подвержены высокомолекулярные локусы [27]. Образцы, загрязненные ингибиторами ДНК-полимеразы, отличаются от деградированных образцов тем, что «выпадение» локусов из профиля происходит вне зависимости от их молекулярной массы [36]. В случае образцов деградированной ДНК рекомендуют проводить анализ мтхДНК или использовать PCR маркеры меньшей длины [38]. В случае образцов, загрязненных ингибиторами ДНК-полимеразы, проводят специфические процедуры очистки ДНК от примесей [26].

Электрофорез продуктов ПЦР и фрагментов рестрикции

Электрофорез позволяет разделить фрагменты ДНК, имеющие собственный отрицательный заряд, в зависимости от их длины. Для этого ДНК денатурируют и помещают в постоянное электрическое поле. Ско-

рость движения прямо пропорциональна длине фрагмента, следовательно, и количеству нуклеотидов, и в ходе движения в электрическом поле происходит разделение участков ДНК по длине. Для удобства регистрации фрагментов ДНК, в праймер включают флуоресцентную метку, при этом фрагменты равной длины, относящиеся к разным локусам окрашивают разными флуоресцентными метками [12].

Рекомендуется перед электрофорезом в денатурирующих условиях провести электрофорез части продуктов амплификации в агарозном геле. Основная цель этой процедуры – убедиться в успешном проведении ПЦР. Электрофорез в агарозе проводят в Трис-ацетатном-ЕДТА буфере (ТАЕ буфер) [39]. Если амплификация прошла успешно, в геле будут видны полосы, соответствующие фрагментам разной длины.

Для детального анализа аллелей электрофорез проводят в 4, 5, 6 % акриламидном геле (в зависимости от длины фрагментов) в Трис-боратном-ЕДТА буфере с добавлением мочевины (6 М), что позволяет разделять фрагменты, отличающиеся по длине на одно основание. Высокая концентрация мочевины обеспечивает распрямление нитей ДНК, но не полную денатурацию – комплементарные двунитевые участки ДНК сохраняются, поэтому перед нанесением на геле образцы денатурируют нагреванием 95°C 2 мин, и температуру геля поддерживают равной 50°C. Образцы вносят в «карманы» геля и отдельно наносят смесь образцов сравнения известного размера – от 40 до 600 оснований (Fluorescent Ladder – флуоресцентная лестница) (рис. 3 В). Образцы сравнения необходимы для проверки качества гелей, а также как стандарты длины для маркеров. Образцы сравнения флуоресцентно мечены карбоксн-Х-родамином, максимум флуоресценции 650 нм. Для определения аллелей их положение в геле сравнивают с разгонкой, содержащей все возможные аллельные варианты (Allelic Ladder – лестница аллелей) (рис. 3 С). Получают набор аллелей разной длины, которые и составляют ДНК профиль. Для оценки качества проведения ПЦР и электрофоретического разделения используют ДНК определенных клеточных линий с аллелями известных размеров (позитивный контроль), а для проверки чистоты реактивов – негативный контроль без внесения ДНК.

В системе PowerPlex® 16, одновременно анализирующей 16 локусов (табл. 2), применяется так называемый капиллярный электрофорез. Гель заполняет тонкий капилляр, по которому под действием разности потенциалов движутся продукты ПЦР. Праймеры мечены флуоресцентно: для локусов Penta E, D18S51, D21S11, TH01 и D3S1358 – флуоресцентном, для FGA, TPOX, D8S1179, vWA и AMEL – карбокситетраметилродамином, для Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 – 6-карбоксн-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцентном. Внутренний стандарт размера фрагментов (Internal Lane Standard) включает в себя смесь фрагментов длиной от 60 до 600 оснований, меченых карбоксн-Х-родамином. Этот стандарт разго-

няется совместно с образцами и определяется в независимом четвертом цветовом канале устройства детекции. Этот метод называется методом четырех красок.

Лестница аллелей для 16 маркеров содержит большинство существующих вариантов аллелей, окрашенных соответствующими метками. Этот образец сравнения разгоняется совместно с ПLS 3-4 раза на 96 образцов. Продукты ПЦР смешиваются с ПLS непосредственно перед нанесением на гель. Внесение образцов в капилляр, заполнение капилляра гелем, параметры проведения электрофореза, анализ образцов – автоматизированы. Образцы сравниваются со стандартами известной длины ПLS и лестницей аллелей. Данные распечатываются в виде электрофореграммы (рис. 3 А).

Интерпретация результатов ДНК-теста

Системы детекции визуализируют ДНК-профиль как набор сигналов (полос или пиков) на электрофореграмме (рис. 3). При интерпретации результатов принимаются во внимание интенсивность сигнала, его форма (для пиков), положение и соотношение с интенсивностью других сигналов. Интенсивность сигналов маркерных аллелей должна находиться в пределах верхнего и нижнего порога определения, которые устанавливаются каждой лабораторией в ходе предварительных работ по калибровке оборудования, стандартизации всех лабораторных процедур и контролю качества [40]. Этот ответственный этап может длиться 1-2 года [9]. Пик должен иметь четкую треугольную форму, его положение должно соответствовать пределам длин аллелей в данном локусе. В ходе работ по контролю качества ДНК-тестов устанавливаются допустимые пределы интенсивности «сигналов-запинок», специфичные для каждого локуса [40]. Используемые в настоящее время маркерные локусы были отобраны таким образом, чтобы свести образование этих артефактов к минимуму [2].

Интерпретация данных ДНК-теста заключается в определении того, какие аллели занимают каждый локус в каждом ДНК-профиле. Присутствие двух пиков или полос в одном локусе у одного индивидуума свидетельствует о гетерозиготности по этому локусу. Из-за полуквантитативной активности Taq-полимеразы интенсивность двух сигналов в гетерозиготном локусе может быть различна. На этапе контроля качества устанавливается соотношение интенсивностей сигналов аллелей в гетерозиготном состоянии. Оно не должно составлять менее 0,6:1,0 [40]. Наличие всего одного пика или полосы в локусе может свидетельствовать о гомозиготности, а может быть связано с мутацией в сайте связывания праймера в одной из гомологичных хромосом, в результате чего не происходит амплификации одного из гомологичных аллелей. Этот эффект называется нуль-аллелем. На практике чаще этим эффектом пренебрегают, и локус, несущий один аллель рассматривают как гомозиготный [1].



Рис. 3. Система идентификации PowerPlex® 16 [12]. В качестве примера показана электрофореграмма пяти аллелей (А), флуоресцентная лестница (В) и лестница аллелей (С). По оси ординат интенсивность сигналов, по оси абсцисс длина аллеля в условных единицах.

Если locus содержит два аллеля, соотношение сигналов которых меньше 0,6:1,0, или три или более аллелей, образец представляет собой смесь биологического материала нескольких индивидуумов. Если ДНК-профиль одного из индивидуумов известен (например, жертвы изнасилования), из ДНК профиля образца (вагинального мазка) можно вычленить профиль преступника [40]. Если образец смешанный и содержит более, чем два индивидуальных ДНК-профиля такой образец рекомендуется рассматривать как комплексное доказательство, без выделения генотипов [41].

Статистический анализ ДНК-профилей

Существует два подхода к определению значимости совпадений аллелей в ДНК-профилях. Первый основан на законе Менделя о независимом наследовании аллелей и построении решетки Пеннета (табл. 4) [1]. Рассмотрим пример установления отцовства (табл. 5).

Если ребенок имеет в локусе D3S1358 генотип 15,18, мать – 15,16 то аллель 18 должен быть унаследован от отца. Такой аллель называют обязательным. Согласно решетке Пеннета (табл. 4 А) предполагаемый отец (16,18) передаст обязательный аллель своему потомству в 1/2 случаев. Вероятность передачи аллеля предполагаемым отцом своему потомству обозначают X. В данном примере $X = 0,5$. Если бы предполагаемый отец был гомозиготен по аллелю 18, то X был бы равен 1. Чтобы оценить вероятность того, что данный мужчина, а не любой другой представитель популяции – отец данного ребенка, нужно разделить вероятность передачи аллеля своему потомству данным предполагаемым отцом (X) на вероятность

получения аллеля 18 ребенком от гомо- и гетерозиготных носителей в популяции, которая равна частоте аллеля 18 в популяции. Полученная величина называется индекс отцовства (PI – paternity index) и показывает во сколько раз вероятнее, что отцом данного ребенка является данный предполагаемый отец, а не другой мужчина из популяции:

$$PI = X/p = 0,5/0,14 = 3,571 \quad (1)$$

Если в другом локусе, D5S818, генотипы матери и ребенка совпадают (10,12), то любой из аллелей (10 или 12) мог быть унаследован от отца, т.е. в данном локусе два обязательных аллеля. Предполагаемый отец (11, 12) передаст обязательный аллель 12 половине своего потомства (табл. 4 Б). Индекс отцовства в данном случае будет равен X разделить на сумму частот обоих обязательных аллелей в популяции. Поскольку наследование либо одного, либо другого обязательного аллеля от какого-либо из их носителей

Таблица 4. Пример передачи разных аллелей локусов D3S1358(а) и D5S818(б) от матери и отца (решетка Пеннета).

А.	♂	♀	15	16
	16		15,16	16
	18		15,18	16,18

Б.	♂	♀	10	12
	11		10,11	11,12
	12		10,12	12

в популяции – альтернативные, взаимоисключающие события, вероятность осуществления либо одного, либо другого из них равна сумме вероятностей этих событий, то есть сумме частот этих аллелей в популяции.

$$PI = X / (p_{10} + p_{12}) = 0,5 / (0,0487 + 0,3875) = 1,146 \quad (2)$$

Если бы предполагаемый отец оказался носителем обоих обязательных аллелей, то в выражение (2) следовало бы подставить $X=1$, а индекс отцовства был бы равен:

$$1 / (0,0487 + 0,3875) = 2,252$$

Поскольку локусы D3S1358 и D5S818 принадлежат к разным хромосомам и рекомбинируют независимо, можно рассчитать комбинированный индекс отцовства (CPI), основанный на информации, полученной в результате анализа этих двух локусов [1]:

$$CPI = PI_{D3S1358} \cdot PI_{D5S818} = 4,092 \quad (3)$$

Группа предполагаемых отцов включает предполагаемого отца, данные ДНК-теста которого мы использовали в расчетах, и всех остальных представителей популяции, несущих обязательные аллели D3S1358 18 и D5S818 10, 12, обнаруженные у ребенка. Исходя из этого представления, можно рассчитать вероятность отцовства (PP – probability of paternity) для данного предполагаемого отца. Она будет равна комбинированной вероятности передачи этих аллелей предполагаемым отцом своему потомству (CX), деленной на сумму вероятности передачи этих аллелей данным предполагаемым отцом плюс вероятность их передачи любым другим носителем в популяции [7]:

$$PP = CX / [CX + p_{18}(p_{10} + p_{12})] = (0,5 \cdot 0,5) / [(0,5 \cdot 0,5) + 0,14(0,0487 + 0,3875)] = 0,8036 \quad (4)$$

Для удобства расчетов данная формула может быть преобразована делением числителя и знаменателя на CX, и, принимая во внимание (3):

$$PP = 1 / [1 + p_{18}(p_{10} + p_{12}) / CX] = 1 / [1 + 1 / CPI] = 1 / [1 + 1 / 4,092] = 0,8036 \quad (5)$$

Вероятность отцовства обычно выражают в процентах, и в данном случае она будет равна 80,36%. Совпадение обязательных аллелей в 9 полиморфных локусах генотипа ребенка и предполагаемого отца позволяет оценивать вероятность того, что он является истинным отцом, как 99,9995% (табл. 5).

При расследованиях случаев спорного отцовства для достоверного отрицания необходимо и достаточно исключить по двум локусам [42]. Следует помнить, что для многих локусов STR довольно высока частота мутирования. И, если предполагаемый отец не несет обязательного аллеля в одном из 9 маркерных локусов, то в формулы для расчетов приведенных выше показателей вместо X следует подставить значение частоты мутирования для несовпадающего локуса [7].

Другой подход к расчету вероятности отцовства основан на законе Харди-Вайнберга о постоянстве частот аллелей и генотипов в популяции [1, 7]. Он подобен по логике расчету, который использовался для серологических маркеров и приводился в начале статьи. Согласно закону Харди-Вайнберга при частоте двух аллелей A и a одного локуса p и q соответственно, ча-

Таблица 5. Пример установления отцовства [1].

Локус	Мать	Ребенок	Обязательный аллель	Аллели отца	p	RMNE	X	PI
D3S1358	15,16	15,18	18	16,18	0,1400	0,2604	0,50	3,571
VWA	16,19	13,16	13	13,16	0,0100	0,0199	0,50	50,000
FGA	20,21	21,22	22	21,22	0,1575	0,2902	0,50	3,175
TH01	9	8,9	8	7,8	0,1150	0,2168	0,50	4,348
TPOX	6,7	6,11	11	11	0,2675	0,4634	1,00	3,738
CSF1PO	11,13	10,11	10	10,12	0,2750	0,4744	0,50	1,818
D5S818	10,12	10,12	10	11,12	0,0487			
			12		0,3875	0,6821	0,50	1,146
D13S317	11	8,11	8	8,12	0,1550	0,2860	0,50	3,226
D7S820	8,10	8,12	12	9,12	0,1400	0,2604	0,50	3,571
AMEL	X,X	X,Y		X,Y				
Комбинированный индекс						3,64 • 10 ⁻⁶		221234
Вероятность исключения						99,99964%		
Вероятность отцовства						99,9996%		99,9995%

стоты трех классов генотипов AA, Aa и aa будут равны соответственно:

$$p^2 + 2pq + q^2 = (p+q)^2 = 1 \quad (6)$$

Для полиморфных локусов, несущих любое число аллелей частота одного из которых p , а всех остальных, соответственно $1-p$, в общем случае можно записать:

$$p^2 + 2p(1-p) + (1-p)^2 = 1 \quad (7)$$

Метод основывается на расчете той доли популяции, которая несет обязательные аллели и по этой причине не может быть исключена из группы предполагаемых отцов. Рассчитываемый показатель называется RMNE («random man not excluded» – «случайный мужчина не исключен») и для одного локуса представляет собой сумму частот гомозиготных носителей (p^2) и гетерозиготных носителей $2p(1-p)$ в популяции, где p – частота обязательного аллеля, а если в локусе два обязательных аллеля, то как и при расчете (2), в формулу подставляется сумма частот двух обязательных аллелей. Для удобства расчетов данная формула обычно преобразуется как:

$$RMNE = p^2 + 2p(1-p) = 1 - (1-p)^2 \quad (8)$$

Комбинированная величина CRMNE рассчитывается, как произведение величин RMNE для каждого локуса. По данным таблицы 5 для локусов D3S1358 и D5S818 соответственно:

$$RMNE = 1 - (1 - 0,14)^2 = 0,2604$$

$$RMNE = 1 - [1 - (0,0487 + 0,3875)]^2 = 0,6821$$

$$CRMNE = 0,2604 \cdot 0,6821 = 0,1776 \quad (9)$$

Последняя величина показывает, что по данным теста для локусов D3S1358 и D5S818 0,1776 (17,76%) популяции нельзя исключать из группы предполагаемых отцов. Часть популяции, которая, напротив, может быть исключена из группы предполагаемых отцов, будет равна:

$$PE = 1 - CRMNE = 1 - 0,1776 = 0,8224 \quad (10)$$

Эта величина называется вероятностью исключения (PE – probability (or power) of exclusion), и в процентном выражении в данном случае равна 82,24%. Величина, обратная CRMNE, показывает сколько человек должно быть протестировано, чтобы обнаружилось случайное совпадение обязательных аллелей в ДНК-профиле. Она же показывает во сколько раз вероятнее истинное отцовство предполагаемого отца, чем любого другого мужчины из популяции, то есть аналогична комбинированному индексу отцовства CPI (3). Для локусов D3S1358 и D5S818:

$$1/CRMNE = 5,63$$

По аналогии с (4) можно также рассчитать вероятность отцовства (WPP), которая в данном случае называется Вейнеровской (по фамилии автора, впервые предложившего эту формулу):

$$WPP = (1/1 + CRMNE) \cdot 100\% = 0,8491 \cdot 100\% = 84,91\% \quad (11)$$

Значения вероятности отцовства, рассчитанные двумя рассмотренными способами, различаются. Это связано с тем, что расчет через индекс отцовства допускает, что для гомозиготного по данному аллелю носителя вероятность истинности отцовства выше, чем для гетерозиготного. Расчет, основанный на RMNE, считается более адекватным, поскольку допускает одинаковую для гомо- и гетерозиготных носителей аллеля вероятность истинного отцовства данного ребенка.

Увеличение числа проанализированных локусов до 9 (табл. 5) снижает CRMNE до $3,64 \cdot 10^{-6}$ и увеличивает PE и WPP до 99,9996%.

Оба описанных подхода (PI и RMNE) также применимы, если необходимо установить отцовство в отсутствие данных о матери ребенка или надо установить, кто мать данного ребенка в случае, если оба родителя неизвестны. Метод, основанный на расчете RMNE, является более консервативным, и поэтому более приемлем в случае отсутствия информации о матери [1]. В таких случаях оба аллеля каждого локуса генотипа ребенка рассматриваются как обязательные, и по формуле, аналогичной формуле для RMNE, рассчитывается популяционная частота носителей обоих обязательных аллелей RFNE («random female not excluded» – «случайная женщина не исключена»):

$$RFNE = (p+q)^2 + 2(p+q)(1-p-q) = p^2 + q^2 + 2pq + 2p(1-p-q) + 2q(1-p-q) \quad (12)$$

Здесь p и q – частоты обязательных аллелей одного полиморфного локуса [1].

Если необходимо установить, является ли супружеская пара родителями данного ребенка, для каждого локуса рассчитывают RMNE и RFNE и, перемножив эти величины, получают RPNE («random parents not excluded» – «случайные родители не исключены»):

$$RPNE = (p^2 + 2p(1-p))(q^2 + 2q(1-q)) \quad (13)$$

В данной формуле учтена не только вероятность передачи обязательных аллелей ребенку предполагаемыми родителями, но и вероятность встречи такой пары доноров аллелей [1].

Аналогично приведенным выше расчетам проводится идентификация улики, смесей или останков. В случае, когда для тестирования доступны родственники (дети или родители) подозреваемого или родственники пропавшего без вести, задача сводится к стандартным процедурам установления отцовства. Если сам подозреваемый доступен для тестирования, идентификация проводится путем расчета популяционной частоты потенциальных доноров данного фенотипа. Для гомозиготного локуса частота потенциальных доноров будет равна p^2 , для гетерозиготного – $2pq$. Перемножив частоты для каждого локуса, получают комбинированную частоту потенциальных доноров фенотипа и рассчитывают величину, ей обратную – количество людей, которые должны быть протестированы, чтобы произошло слу-

чайное совпадение ДНК-профилей – так называемый уровень индивидуализации.

Ни отцовство, ни идентичность нельзя установить с вероятностью 100%. По определению ФБР, если уровень индивидуализации превосходит 360 миллиардов (один к $3,6 \cdot 10^{14}$), можно считать, что достигнуто состояние полной идентичности ДНК-профилей [1]. Уровень индивидуализации, достигаемый с помощью системы PowerPlex® 16 составляет 1 в $1,41 \cdot 10^{18}$ [12]. На практике, если речь идет о локальной популяции, может быть принята и меньшая пороговая величина уровня индивидуализации, но она должна во много раз превышать численность данной популяции [1]. В России отцовство принято считать «практически доказанным», если его вероятность составляет не менее 99,98% [43].

Базы данных по ДНК-профилям

Приведенные выше статистические расчеты значимости результатов ДНК-тестов были бы невозможны без информации о структуре разных популяций человека и о частотах полиморфных аллелей в них. В частности, расчет RMNE можно считать верным, только если в популяции нет факторов, вызывающих значительных отклонений от закона Харди-Вайнберга (генетического дрейфа, близкородственных браков, миграций, мутаций в маркерных генах и естественного отбора по ним). Вторым необходимым условием для применения метода RMNE является так называемое равновесие сцепления – независимое распределение аллелей разных локусов в популяции. Для локусов, относящихся к разным хромосомам, это кажется естественным. Однако, если популяция возникла недавно, к примеру, в результате смешения двух популяций, в которых имелся разный набор полиморфных маркеров и частота аллелей была различна, то равновесие сцепления установится только через несколько поколений панмиксии (случайного скрещивания). Число поколений, необходимое для того, чтобы установилось равновесие, будет зависеть от величины первоначального отклонения от него. Известно, что величина отклонения от равновесия сцепления с каждой генерацией уменьшается вдвое [7].

Почти все популяции человека являются до определенной степени смешанными, а браки – асортативными, то есть подбор пар происходит не случайно, а часто обусловлен сходными признаками например такими, как раса или национальность. Это необходимо учитывать. Например, если известно, к какой субпопуляции принадлежит отец ребенка (например, афроамериканской), при статистических расчетах следует пользоваться базой данных по частотам аллелей для данной субпопуляции. Если популяция является смешанной и ее субструктура известна, но не известно, к какой субпопуляции принадлежит отец ребенка, можно рассчитать синтетическую частоту каждого аллеля

– взвешенное на основании численности субпопуляций среднее значение частоты аллеля в смешанной популяции. Если субструктура смешанной популяции не известна, рассчитывают среднюю арифметическую частоту каждого аллеля исходя из частот данного аллеля в субпопуляциях. В некоторых странах, например США, даже для популяций, в которых не наблюдается выраженной субструктуры, при идентификации личности вводится поправка на субструктуру. Частота гомозиготных носителей аллеля рассчитывается как $p^2 + p(1-p)(0,01)$ [1].

В настоящее время считается допустимым не привлекать соответствующую тестируемому индивидууму базу данных по частотам аллелей, поскольку частоты аллелей в локусах STR довольно близки для различных, хорошо исследованных, популяций, а данных о возможных погрешностях еще нет [1]. Однако популяционно-генетические исследования и создание баз данных по частотам аутосомных маркеров в значительной степени повышают разрешающую способность ДНК-тестов, а в случае маркеров Y-хромосомы и мтДНК вероятность случайного совпадения ДНК-профилей равна частоте гаплотипа в соответствующей базе данных. Информацию о частоте аллелей в некоторых, хорошо изученных популяциях можно найти в руководствах фирм-разработчиков китов [12]. Базы данных по частоте гаплотипов Y-STR [14] и последовательностей HV1 и HV2 мтДНК некоторых европейских популяций доступны в Internet.

Проблема конфиденциальности ДНК-профилей

После раскрытия в 1998 году с помощью ДНК-анализа цепочки серийных убийств в Париже, мнение общественности Франции стало склоняться к созданию национальной базы данных, содержащей уже не анонимные частоты маркеров, а полные индивидуальные ДНК-профили осужденных за тяжкие преступления [44]. Подобные базы, также как и банки образцов ДНК, способствовали бы быстрому раскрытию серийных преступлений и рецидивов. В Великобритании Р. Gammoo, президент Ассоциации Старших Офицеров Полиции, призвал к созданию базы индивидуальных ДНК-профилей всего населения страны. Он аргументировал свою идею перспективой значительной экономии средств и времени на расследование преступлений и тем, что такая база позволит идентифицировать преступников еще до того, как преступления станут серийными. Однако, правительство Великобритании посчитало создание такой базы нарушением личной свободы граждан [45]. В мире продолжается дискуссия о допустимости создания баз данных индивидуальных ДНК-профилей, и пока создаются только базы по осужденным за тяжкие преступления. Примером может служить база CODIS, созданная в США [27].

Будущее геной дактилоскопии

Данный обзор посвящен идентификации человека, однако, ДНК-анализ других видов (растений, животных, насекомых) также начинает применяться в криминалистике. Анализ семян или растительных остатков на одежде или других вещах, принадлежащих подозреваемому, позволяет доказать или опровергнуть его присутствие на месте преступления. Анализ полиморфных маркеров коммерческих сортов растений используется в делах по защите прав их создателей-селек-

ционеров. ДНК-тесты конфискованных образцов марихуаны позволяют связать продавцов, поставщиков и тех, кто вырастил сырье, и таким образом проследить конкретную цепочку преступников и доказать их вину [46]. Чрезвычайная чувствительность методов, позволяющих анализировать микроскопические биологические улики, которые трудно обнаружить и трудно скрыть; высокая сложность молекулы ДНК, которую невозможно подделать, все это делает ДНК уникальным по объективности вещественным доказательством.

ЛИТЕРАТУРА

- Primorac Dragan, Schanfield M.S., Primorac Damir. (2000) Croat. Med. J. 41(1), 32-46.
- Shumm J. W. (1996) Promega Notes Magazine, 58, 12.
- Butler J.M. (2001) *Forensic DNA Typing: Biology & Technology Behind STR Markers*. - London: Academic Press, 1-10.
- Саминченко С.С. (1998) Судебная медицина: Учебник для юридических вузов. - OCR Палех, с. 207-210.
- Lee H.C., Ladd C. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 225-228.
- Фогель Ф., Мотульски А. (1989) Генетика человека: В 3-х т. Т.1: Пер. с англ., Мир, Москва, с. 209-210.
- Tracey M. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 233-238.
- Эфронсон В.П. (1968) *Введение в медицинскую генетику*. Второе изд., перераб. и доп., Медицина, Москва, с. 164.
- Crouse C.A. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 247-251.
- Уэллс Р.А. (1990) В кн. Анализ генома. Методы (под ред. К. Дейвиса), Мир, Москва, с. 191-213.
- National Research Council. DNA technology in forensic science. (1992) Washington (DC), National Academy Press.
- Promega Corporation. (2001) *GenePrint® Power Plex™ 16* Technical Bulletin. Madison (WI): Promega Corporation.
- Kayser M., Caglia A., Corach D. et al. (1997) *Int J Legal Med*, 110, 125-133.
- Available at <http://ystr.charite.de>. Accessed: September 26, 2001.
- Prinz M., Sansone M. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 288-291.
- Henke J., Henke L., Chatthopadhyay P. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 392-397.
- Miller K.W.P., Budowle B. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 313-327.
- Parsons T.J., Coble M.D. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 304-309.
- Melton T., Nelson K. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 298-303.
- Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K. et al. (1996) *Nat Genet*, 12, 417-420.
- Southern E.M. (1975) *J.Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. et al. (1985) *Nature*, 316, 76-79.
- Steinlechner M., Parson W. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 252-255.
- Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986) *Nature*, 324, №6093, 163-65.
- Senger F., Coulson A.R. (1978) *FEBS Lett*, 1978, 87, 107-112.
- Alonso A., Andeijnovic S., Martin P. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, p.260-266.
- Ban J.D. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 256-259.
- Ban J.D. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 281-284.
- Lorente J.A., Entrala C., Alvarez J.C. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 267-270.
- Rerkamnuaychoke B., Chantratita W., Jomsawat U et al. (1999), *P.Forensic Sci Int.*, 105(3), 171-183.
- Hoff-Olsen P., Mevag B., Staalstrom E. et al. (1999) *Forensic Sci Int*, 105(3), 171-183.
- Fridez F., Coquoz R.J. (1996) *Forensic Sci Int*, 78(2), 103-110.
- Chiou F.S., Pai C.Y., Hsu Y.P. et al. (2001) *J Forensic Sci*, 46(5), 1174-1179.
- Greenspoon S.A., Scarpetta M.A., Drayton M.L., Turek S.A. (1998) *J Forensic Sci*, 43(5), 1024-1030.
- Mandrekar. M. N., Erickson A M., Kopp K. et al. (2000) Promega Corporation, Madison, Wis, USA.
- Parson W., Niederstatter H., Kochl S. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 285-287.
- Tomsey C.S., Kurtz M., Flowers B. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 276-280.
- Schlotterer C., Tautz D. (1992) *Nucl. Acids Res.*, 20, 211.
- Остерман Л.А. (1981) Методы исследования белков и нуклеиновых кислот, Наука, Москва.
- Tomsey C.S., Kurtz M., Kist F. et al. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 239-243.
- Ladd C., Lee H.C., Yang N., Bieber F.R. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 244-246.
- Иванов П.Л. (1999) Методические Указания (утверждены Минздравом России 19.01.99), Судебно-медицинская экспертиза, 4, 35-41.
- Hummel K., Ihm P., Schmidt V. *Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit blutgruppenbefunden*. Stuttgart, 1971
- French demand DNA database to fight crime. (1998) *Nature*, 392, 430.
- UK police chief calls for national DNA database. (1998) *Nature*, 393, 106.
- Coyle H.M., Ladd C., Palmbach T., Lee H.C. (2001) Croat. Med. J., 42, №3, 340-345.

Genome fingerprinting: DNA-technologies in forensic science

A.V. Shmonin, V.P. Komaristaya

*Biology Research Institute, V.N.Karasin Kharkiv National University,
Svobody Sq. 4, Kharkiv 61077, Ukraine*

Abstract: The survey is devoted to the problems of genetic identity establishment in human, particularly to choosing marker genes, principles of collecting and storing biological evidences, methods of extraction and quantitation of human DNA. Special attention is paid to the approaches based on polymerase chain reaction. The problems of interpretation and statistical evaluation of DNA-testing results of paternity test and person identification are discussed.

KEY WORDS: DNA, human, forensic science.