

**Міністерство охорони здоров'я України**

**Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи**

**ВИКОРИСТАННЯ ДНК-АНАЛІЗУ У СУДОВО-МЕДИЧНИХ  
ЕКСПЕРТИЗАХ РЕЧОВИХ ДОКАЗІВ ТА ЕКСПЕРТИЗАХ  
СПІРНОГО БАТЬКІВСТВА (МАТЕРИНСТВА, ПІДМІНИ ДІТЕЙ)**

(Методичні рекомендації)

**Київ 2012**

**Міністерство охорони здоров'я України**

**«УЗГОДЖЕНО»**

Директор Департаменту  
лікувально-профілактичної  
допомоги МОЗ України



М.К.Хобзей  
2012р.

**Використання ДНК-аналізу у судово-медичних експертизах  
речових доказів та експертизах спірного батьківства  
(материнства, підміни дітей).**

(Методичні рекомендації)

**Київ 2012**

Установи-розробники:

**Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика  
Державна установа Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ  
України**

**Одеський національний медичний Університет, кафедра судової  
медицини та медичного законодавства  
Дніпропетровське обласне бюро судово-медичної експертизи**

Укладачі:

**Бурчинський Василь Георгійович** к.мед.н., доцент (456-60-98)  
**Хохолєва Тамара Володимирівна** к.мед.н., доцент (440-97-98)  
**Дем'янчук Алла Петрівна** (456-60-98)  
**Кривда Григорій Федорович** д.мед.н., професор, (048)723-42-71  
**Кривда Руслан Григорович**, к.мед.н. (048) 723-80-17  
**Івашина Ольга Харисівна** (0562) 46-34-45

**Рецензенти:**

**Сухий Валентин Дмитрович** - директор Центру судових експертиз МО  
України, к.мед.н.  
**Старовойтова Ріоріта Олексіївна** - завідувач відділення судово-медичної  
цитології ДУ Головне бюро судово-медичної експертизи МОЗ України,  
к.біолог.н. (456-60-98)

## З М І С Т

	<b>Вступ</b>	4
<b>I.</b>	<b>Розділ. Загальні положення щодо використання ДНК-аналізу в судово-медичних експертизах та дослідженнях</b>	6
1.	Особливості порядку проведення судово-медичних експертиз з використанням ДНК-аналізу	6
2.	Вимоги до відбору та збереженню зразків біоматеріалу та слідів на речових доказах	7
3.	Особливості дослідження слідів різного біоматеріалу на речових доказах	8
<b>II.</b>	<b>РОЗДІЛ. Проведення ДНК-аналізу біологічних зразків та слідів на речових доказах</b>	11
1.	Виділення ДНК	11
2.	Вимірювання концентрації виділеної ДНК за допомогою флюорометра	17
3.	Ампліфікація отриманих препаратів ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)	18
4.	Аналіз продуктів ПЛР методом електрофорезу	21
5.	Визначення генотипічних характеристик досліджуваних об'єктів та їх порівняльний аналіз	22
6.	Багатокомпонентний аналіз продуктів ПЛР на генетичному аналізаторі 3130 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США)	23
7.	Проведення розрахунків	24
<b>III.</b>	<b>РОЗДІЛ. Проведення експертизи (дослідження) спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності</b>	25
1.	Основні положення проведення експертиз (досліджень) спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності	25
2.	Виключення батьківства	26
3.	Розрахунок відсотка ймовірності батьківства	26
4.	Використання частот розповсюдження алелей у розрахунках в експертизах спірного батьківства	27
5.	Панель алельних маркерів локусів, що використовуються в експертизах (дослідженнях)	28
6.	Встановлення батьківства до народження дитини	29
	<b>Резюме</b>	30
	<b>Література</b>	31

## ВСТУП

Одним із найважливішим завдань судово-медичної експертизи у відділеннях судово-медичної імунології - є ідентифікація наданого на дослідження біоматеріалу, з метою вирішення питання чи належить виявлений матеріал конкретній особі, що є надзвичайно важливим у розслідуванні цілого ряду злочинів.

Як в Україні так і у всьому бувшому Радянському Союзі майже до початку 90-х років двадцятого століття основним ідентифікаційним фактором було визначення антигенних властивостей за ізосерологічною системою АВО, за якою все населення поділяється на чотири групи. Зрозуміло, що інформативність такого дослідження невелика. Дослідження деяких інших генетично детермінованих систем крові (резус, MN, P, гаптоглобін тощо) в силу ряду причин зазнають труднощів при їх визначенні в слідах на речових доказах.

Кардинально положення змінилося з початку 80-х років того ж століття, коли завдяки досягненням у галузі молекулярної генетики, стало можливим досліджувати ДНК з метою ідентифікації. На молекулі ДНК записана вся спадкова інформація про людину. Були вивчені і розшифровані генетичні коди цілого ряду ділянок ДНК, які відтворюють генетичну різноманітність людей. До того ж з'ясувалося, що дослідження ДНК можливе і у біологічному матеріалі, який зазнав змін ( тобто матеріал у вигляді плям на різних предметах, як то: висушена кров, сперма, слина тощо). Вперше про можливість дослідження такого матеріалу повідомили англійські вчені в 1985р., а в 1986р. вони ж провели першу судово-медичну експертизу. З цього часу цей напрямок в судовій медицині почав стрімко розвиватися і отримав назву «ДНК-аналіз», «генотипоскопія», «судово-медичний ДНК-аналіз». «ДНК-дактилоскопія» або «геномний фінгенпринтинг» - «геномна дактилоскопія», (що в перекладі з грецької означає «daktylos» - палець, «skoreo» - дивлюсь і у судовій медицині з'явилося завдяки англійському вченому Алексу Джефферісу в 1985року, як відбиток папілярного візерунку пальця є унікальним для кожної людини, так і унікальним є набір фрагментів ДНК кожної людини, які визначаються за візерунком набору складних смуг на гелі в результаті гібридизації геномної ДНК, звідси і така назва – геномна дактилоскопія).

Проблема ідентифікації особи за слідами біологічного походження практично була вирішена з введенням такої унікальної методики молекулярної генетики як полімеразна ланцюгова реакція, що дозволило досліджувати не тільки початковий біоматеріал, який був направлений на дослідження, а і

збільшити його кількість багаторазово, що, по-суті, дає можливість аналізувати матеріал однієї клітини. Тобто, ДНК-аналіз стає все більш важливим засобом у боротьбі із злочинністю. Він дозволяє не тільки сприяти інформації щодо осіб, які проходять у справі, але і вже на ранніх стадіях розслідування дає можливість сприяти розшуку злочинця ( завдяки базі даних ДНК).

Методична література з приводу дослідження ДНК, що до цього часу була видана в Україні, в повній мірі не відповідає на всі питання, які виникли при ДНК-дослідженні біоматеріалу на сучасному етапі. Так методичні рекомендації «Вивчення зразків крові методом геномної дактилоскопії», Київ, 1995р. пропонують методику застосування полілокусних зондів, які містять радіоактивний ізотоп фосфору, що на даному етапі вже не використовується. Виникла необхідність систематизувати весь напрацьований матеріал за результатами досліджень різного виду біоматеріалу (крові, слини, сперми, пото-жирових відбитків, органів, тканин, кісток, змішаних слідів), звернути увагу на особливості вилучення, зберігання і дослідження такого біоматеріалу, а головне навести сучасні методики виділення ДНК із різного біоматеріалу, ампліфікації, електрофорезу, інтерпретації генетичних даних, проведення розрахунків.

Окреме питання стосується проведення експертиз і досліджень з приводу встановлення батьківства, материнства, підміни дітей, родинності.

Отже, пропонуємо методичні рекомендації, що дадуть змогу знайти відповіді на питання, які є підсумками напрацювань судово-медичних експертів України з ДНК-досліджень у експертизах ідентифікації особи як у кримінальних справах, так і у цивільних (спірного батьківства, родинності тощо).

Методичні рекомендації з цих питань до видання в Україні запропоновані вперше і розраховані для лікарів-судово-медичних експертів-імунологів та судових експертів-імунологів, що виконують судово-медичні експертизи та дослідження з використанням ДНК-аналізу.

## **РОЗДІЛ I. Загальні положення щодо використання ДНК-аналізу в судово-медичних експертизах та дослідженнях**

### **1. Особливості порядку проведення судово-медичних експертиз з використанням ДНК-аналізу**

Судово-медичні експертизи і дослідження із використанням ДНК-аналізу проводяться відповідно до «Правил проведення судово-медичних експертиз (досліджень) у відділеннях судово-медичної імунології бюро судово-медичної експертизи», затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 17.01.1995р. №6 і виконуються лікарями-судово-медичними експертами-імунологами та судово-медичними експертами-імунологами.

Облаштування приміщення лабораторії та організація її роботи, де будуть проводитися ДНК-дослідження, повинні відповідати вимогам державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами», затверджених Наказом Міністерства охорони здоров'я України 24.01.2008р. №26, зареєстрованих в Міністерстві юстиції України 7.02.2008р. за №88/14779.

Дослідження біоматеріалу з метою ідентифікації особи проводяться у наступних випадках:

- встановлення належності біоматеріалу (крові, слини, сперми, волосся, органів, тканин та окремих частин тіла) конкретній особі або виключення такої належності;
- встановлення статевої належності біологічних слідів і об'єктів;
- діагностичного типування з метою наступної ідентифікації з об'єктами злочинів або нещасних випадків;
- настання вагітності після зґвалтування з метою встановлення, що вагітність настала від підозрюваного і що він є генетичним батьком дитини або виключити це;
- дітовбивств ( в т.ч. новонароджених), викраденні дітей, підміни їх у пологовому будинку для встановлення, чи являються особи, що проходять у справі батьками дитини;
- встановлення чи являються останки або частини трупа останками однієї людини і чиїми саме за дослідженням зразків близьких родичів;
- виявлення зв'язку між різними злочинами – встановити, що сліди біоматеріалу, які виявлені при різних злочинах, залишені однією і тією ж особою;
- порівняння генетичного профілю біологічного об'єкту з генетичними даними, які зберігаються в комп'ютерній базі даних і, при співпадінні, зорієнтувати слідство на пошук певної особи;
- відсутності підозрюваного – зберегти біологічний об'єкт для наступної ідентифікації, коли підозрюваний з'явиться;

- встановлення правдивих батьків дитини у справах про спірне походження дітей (оспорювання батьківства, материнства або підміни дітей);
- встановлення зиготності близнюків;
- встановлення родинності.

У названих випадках дослідженню підлягають:

- кров, слина, сперма, волосся, кістки, зуби, нігті, піднігтьовий вміст, інші тканини, органи, або окремі частини тіла. Це можуть бути зразки біоматеріалу як від живих осіб або трупів, так і сліди на речових доказах;
- матеріали кримінальних та цивільних справ, вивчення яких вимагає спеціальних знань у галузі молекулярної біології і генетики.

## **2. Вимоги до відбору та збереження зразків біоматеріалу та слідів на речових доказах**

Біоматеріал із трупа відбирається експертом, який проводить розтин, порядок вилучення та надсилання цього матеріалу у відділення викладений у додатку №1 до «Правил проведення судово-медичної експертизи (дослідження) трупів в бюро судово-медичної експертизи».

Порядок відбору зразків крові у живих осіб викладений в методичних рекомендаціях «Дослідження рідкої крові та її слідів на речових доказах, Київ, 2010р.(Розділ III, п.1.Відбір крові).

Відбір зразків крові проводиться у облаштованому для таких процедур кабінеті, який повинен відповідати вимогам п.п.4.4,4.5.,5.8., 9.1.- 9.5. Сан Пин 5179 – 90.

Однак, є деякі особливості щодо подальшого збереження відібраних зразків з метою запобігання деградації ДНК:

2.1. В зразки крові, які передбачено досліджувати в рідкому вигляді (в експертизах і дослідженнях щодо визначення спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності), доцільно одразу додати стабілізатори: р-ни глюціциру, 0,5М ЕДТА (рН- 8,0), цитрату натрію або використовувати спеціальні пробірки з внесеним в них стабілізатором. Зберігати такі зразки до початку дослідження потрібно в холодильнику при температурі +4°C не більше 2-3 діб.

Одразу після відбору частину крові потрібно розмістити на фільтрувальному папері або лабораторній марлевій серветці і висушити при кімнатній температурі, подалі від нагрівальних приладів, після чого запакувати в паперові пакети, маркувати і зберігати в архіві відділення (зразки крові, що використовуються в експертизах спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності, після дослідження знищуються). Як показують дослідження, збережені таким чином зразки перші три місяці зовсім не



знають деградації. В такому вигляді рекомендується і транспортувати зразки крові, якщо цього вимагають обставини.

У випадку тривалого зберігання зразків крові до початку дослідження можна рекомендувати такий спосіб як заморожування при  $-20^{\circ}\text{C}$ , що забезпечує довгий термін зберігання в доброму стані. Однак потрібно пам'ятати, що до початку дослідження такі зразки піддавати розморожуванню неможна. Якщо необхідне транспортування – проводити його в термосі з льодом або в сумці-холодильнику.

2.2. Зразок слини для ДНК-дослідження у звичайному розумінні, як для імунологічного дослідження не відбирається, для цього відбирається букальний епітелій, який береться шляхом потирання слизової оболонки щоки (зіскоб) спеціальними паличками або, за відсутності таких, ватним тампоном (можна використовувати вушні палички), який теж одразу висушується.

2.3. Якщо є необхідність дослідження зразка сперми, то рідкий зразок сперми потрібно як найшвидше висушити на марлевій серветці, оскільки в рідкій спермі деградація ДНК відбувається значно швидше ніж в крові, що, вочевидь, пов'язане з мікробним забрудненням сперми за рахунок великої кількості білку. Збереження сперми в замороженому стані приводить до руйнування сперматозоїдів і неможливості, при необхідності, встановити наявність сперматозоїдів, якщо потрібно провести диференціальний діагноз щодо оліго- або правдивої азооспермії.

2.4. При поступленні у відділення тканин ( в тому числі кісток) і органів необхідно одразу провести виділення ДНК, перевірити її кількісний і якісний стан, якщо її стан задовільний, то частину, що залишилася, одразу заморозити. Якщо ні, то провести повторне виділення, після чого зразки заморозити. У зв'язку із швидкими змінами, що настають в органах і тканинах, актуальним стає питання транспортування цього матеріалу. Найкраще такий матеріал зберігається в замороженому стані, однак, розморожування, особливо неодноразове, має несприятливий вплив на стан ДНК. Це потрібно мати на увазі при організації транспортування, не допускати розморожування до початку дослідження (див.п.1 цього розділу).

Якщо забезпечити це немає можливості, то краще транспортувати зразки без заморожування, але в охоложеному стані. Гарний результат щодо збереження ДНК дає також висушування очищених кісткових залишків з наступним зберіганням в паперових конвертах при кімнатній температурі.

### **3. Особливості дослідження слідів різного біоматеріалу на речових доказах**

3.1. Як відомо, на даний час в Україні досліджується ядерна ДНК. Тобто, дослідженню підлягає любий біоматеріал, який містить клітини з ядрами. В цьому відношенні немає особливих проблем при дослідженні слідів крові, слини, сперми, піхвового епітелію, кісток, інших тканин, органів.

Але успішне виділення ДНК і подальше її типування можливе, якщо речові докази були правильно вилучені і правильно зберігалися до направлення їх на дослідження. В нативному стані, в такому як ДНК знаходиться в клітині

живого організму, вона являє собою високомолекулярну структуру – безперервну довгу молекулу. В слідах на речових доказах ДНК завжди знаходиться в деградованому стані, тобто вона розпадається на фрагменти різної довжини. Особливо швидкому руйнуванню ДНК сприяє перебування у вологому стані та дія високої температури, тобто ДНК розпадається на фрагменти малих розмірів і чим коротші ці фрагменти, тим менша вірогідність отримати позитивний результат аналізу. Тому експерти повинні особливо звертати увагу слідчих, які проводять відбір і направлення речових доказів на дослідження, на недопустимість перебування речових доказів у вологому стані навіть короткий час. Отже, вилучені речові докази потрібно добре просушити при кімнатній температурі без дії нагрівальних приладів і запакувати в паперові пакети, ні в якому разі не використовувати скляні або пластикові флакони, що щільно закриваються, поліетиленові кульки, оскільки при довгому зберіганні навіть висушених речових доказів без доступу повітря в такій упаковці починається утворення конденсату з наступним руйнуванням ДНК. А при сприятливих умовах зберігання ДНК-типування можливе і при значній давності утворення слідів (навіть десятки років).

3.2. Щодо дослідження волосся потрібно зауважити, що клітини з ядрами містяться в піхвових оболонках цибулин волосин. Отже, волосини потрібно вилучати з місця події дуже обережно і ні в якому разі не розміщувати їх на клейкій стрічці, інакше їх відокремлення від неї приведене до втрати піхвових оболонок, а потрібно запакувати у паперові пакетики, складені як для аптечного порошку і маркувати.

Перед проведенням імунологічного дослідження волосся, вилученого з місця події і направлено у відділення, експерт повинен дослідити кореневі кінці волосин в сухому вигляді (хоча обробка етиловим спиртом або ксилолом не впливає на виділення ДНК), і при наявності таких цибулин, описати їх, а потім обережно відділити від волосин, зафіксувати на предметних скельцях під покривними по краям клейкою стрічкою, маркувати і залишити для подальшого ДНК-дослідження при потребі.

3.3. Такі біологічні рідини як сльози і сеча в нормі не містять клітин придатних для ДНК-аналізу. Однак, за наявності у людини запального процесу в цих рідинах з'являються лейкоцити, за якими можливе ДНК-типування. Також в сечі жінок можлива присутність клітин піхвового епітелію, що дає змогу використати їх для типування. Отже, якщо виникає необхідність дослідження такого біоматеріалу, його спочатку потрібно піддати цитологічному дослідженню і за наявності ядровмісних клітин можна провести спробу виділення ДНК.

3.4. Піт та потожирові виділення. Як відомо, піт – це водний розчин солей та органічних речовин, що виділяється потовими залозами людини. Потожирові відбитки – це, по-суті, піт і жир. Тобто, клітин з ядрами у таких виділеннях не міститься.

Але нас цікавлять не самі виділення в чистому вигляді, а їх сліди на речових доказах, а саме: слідах на ручках ножів, сокир, інших знаряддях травми, рукавицях, головних уборах, комірцях, манжетах, мобільних телефонах,

окулярах, наручних годинниках, ювелірних виробках –каблучках, кульчиках, намисті тощо. Тобто, це сліди, що утворювалися не від короткочасного контакту із шкірою людини, а протягом якогось певного часу. За цей час відбувався тісний контакт шкіри з предметом, навіть тертя по шкірі, внаслідок різних причин на шкірі за цей час могли утворитися мікроушкодження, які не викликають будь-яких відчуттів у людини і невидимі оком, але із базального шару шкіри на речові докази можуть попадати клітини, що містять ядра. І як показали експериментальні дослідження, зокрема, проведені у відділенні судово-медичної цитології, в таких слідах дійсно виявляються ядровмісні клітини.

Отже, якщо стоїть питання проведення ДНК-аналізу в слідах поту або потожирових відбитків, такі сліди, перш за все, потрібно дослідити у відділенні судово-медичної цитології на наявність ядровмісних клітин і, якщо клітини будуть знайдені, направити на дослідження молекулярно-генетичними методами. Визначити, яка саме кількість клітин потрібна для виділення ДНК у таких випадках, важко. Результати дослідження бувають неоднозначні. В будь-якому випадку, потрібно пробувати провести виділення ДНК і, при позитивному результаті - наступне типування, якщо це важливо для слідства. В окремих випадках, якщо біоматеріалу надзвичайно мало, потрібно одразу йти на спробу виділення ДНК, оскільки ДНК може міститися і в зруйнованому ядрі, і в частково деградованому стані.

3.5. У випадках вилучення біоматеріалу від трупів, що є гнильно зміненими, скелетованими, а також після ексгумації – потрібно відбирати цілі трубчасті кістки та кістки з найбільшим вмістом губчастої речовини (грудина, тазові кістки, ребра). Від обгорілих трупів – фрагменти кісток, на яких збереглися м'які тканини, у разі відсутності таких, відбираються кістки у стані чорного розжарення.

3.6. Також дослідженню можуть підлягати цитологічні препарати, якщо екстрагування біологічного матеріалу відбувалося не більше ніж 10% оцтовою кислотою, та гістопрепарати.

## **РОЗДІЛ II. Проведення ДНК-аналізу біологічних зразків та слідів на речових доказах**

### **1. Виділення ДНК**

Висока якість розчину виділеної ДНК впливає на якість продуктів ампліфікації, забезпечує здобуття більш достовірних і збалансованих результатів, незалежно від методу аналізу, що використовується.

Висока чутливість ПЛР-аналізу висуває жорсткі вимоги до методів екстракції й очищення ДНК із біологічного матеріалу, через це виникає необхідність індивідуально добирати відповідну методику залежно від досліджуваного об'єкту і його початкового стану.

Залежно від стану досліджуваного об'єкту використовуються різні методи виділення ДНК із біологічного матеріалу для аналізу методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЦР). Вимоги, які висуваються до методів виділення геномної ДНК із експертного біологічного матеріалу наступні: оптимальний протокол виділення ДНК повинен забезпечити високу якість та максимально можливий вихід ДНК з врахуванням кількості, виду та стану об'єкту та усунути вплив інгібіторів. Вимоги до протоколів:

- 1) безпечність;
- 2) швидкість;
- 3) надійність;
- 4) рентабельність;
- 5) простота виконання;
- 6) мінімальна кількість етапів та процедур зміни пробірок;
- 7) достовірність та відтворюваність результатів;
- 8) можливість роботи з різними біологічними об'єктами;
- 9) високий рівень виходу та чистоти отриманої ДНК;
- 10) можливість автоматизування;
- 11) валідація результатів.

В основу цих протоколів покладено загальний принцип екстракції, який полягає в руйнуванні плазматичної і ядерної мембран клітин, звільненні від білків, видаленні або нейтралізації клітинних компонентів і домішок, з метою отримання ДНК, придатної для ампліфікації у ПЛР. Протоколи умовно можна розділити на кілька груп, кожна з яких об'єднує методи, що передбачають застосування різних варіантів депротейнізації (отримання ДНК, очищеної від білків).

До першої групи належать методи, засновані на використанні лізуючих буферів, до складу яких входять аніонні або неіонні детергенти (додецилсульфат натрію, тритон X-100), а також протеолітичний фермент протеїназа K, що спричинюють швидку денатурацію білків й інактивацію нуклеаз. Остаточна депротейнізація проводиться сумішшю хлороформу й ізоамілового спирту; осадження ДНК із розчину здійснюється ізопропанолом або етанолом. Ці методи дозволяють одержати ДНК без домішки білків. Однак вони доволі працемісткі, складаються із декількох етапів.

До другої групи належать методи, основою лізуючих буферів яких є сильні хаотропні агенти (гуанідинтіюціонат, сечовина), що руйнують клітинні мембрани і денатурують клітинні білки. Із розчину ДНК осідає на нуклеосорбент, з подальшим її елююванням. Методи зручні, технологічні, проте слідові кількості гуанідинтіюціонату можуть інгібувати реакцію ампліфікації. Внаслідок багатоетапності процесу підвищується ймовірність значних втрат ДНК, а також можливість контамінації між пробами.

До третьої групи належать методи, засновані на використанні аніонообмінної смоли Челекс-100. Процедура виділення ДНК містить тривалу інкубацію і кип'ятіння досліджуваного об'єкта в розчині Челекс-100, що забезпечує очищення від металовмісних сполук і протеїнів. Метод не пов'язаний із великими витратами часу, використанням агресивних речовин. Виділення ДНК здійснюється в одній пробірці, що знижує ризик забруднення зразків.

До четвертої групи належать методи, засновані на властивостях деяких солей у високих концентраціях утворювати комплекси із білками і полісахаридами.

Наприклад, при використанні у лізуючому буфері аніонного детергенту додецилсульфату натрію і протеолітичного ферменту протеїнази К відбувається денатурація білків, внаслідок чого руйнуються мембрани клітин і ДНК виходить у розчин. Білки і частина полісахаридів при додаванні до лізату ацетату калію при температурі 0°C утворюють комплекси із додецилацетатом калію і видаляються центрифугуванням; ДНК із розчину осаджується ізопропанолом. Метод дозволяє провести депротеїнізацію без органічних розчинників.

Для виділення ДНК також застосовують спеціальні комерційні набори, призначені для отримання геномної ДНК із експертного матеріалу.

### **1.1. Підготовка об'єктів дослідження**

При дослідженні речових доказів або сухих біологічних зразків робляться вирізки безпосередньо із речей або фрагментів марлі, з твердих поверхонь проводяться змиви на стерильну марлю, змочену фізіологічним розчином або зіскоби біологічних слідів в пробірку.

Фрагменти м'яких тканин, внутрішніх органів тощо подрібнюються. Фрагменти кісток, нігтів спочатку механічно очищують від нашарувань різного походження (землі, піску), видаляють залишки м'яких тканин. Після чого кістки промивають під помірним тиском теплої проточної води з використанням розчину рідкого детергенту, видаляють залишки детергенту і висушують. Далі об'єкти піддають жорсткій стерилізації з використанням високореакційноздатних сполук, таких як розчин 7 мМ NaOCl або хлорамін.

Використання даних речовин руйнує ДНК зовнішніх джерел і забезпечує безпечну роботу з біологічним матеріалом. В такому вигляді кістки можна зберігати певний час до початку дослідження. Зберігання має бути в стабільних умовах, найкраще в замороженому стані.

Основний етап підготовки кісткових об'єктів проводиться безпосередньо перед процедурою виділення ДНК і полягає у повторному (за необхідності) механічному видаленні нашарувань. Далі за допомогою дрібного напилка з поверхні фрагмента кістки видаляють зовнішній шар приблизно 0,1–0,2 мм для усунення інгібуючого впливу на компоненти ПЛР речовин, які, можливо, проникли у кісткову тканину із зовнішнього середовища або ґрунту. Одержані кісткові фрагменти переносять в колби з дистильованою водою, струшують, воду зливають, додають 96 %-й етиловий спирт, повторно струшують, спирт видаляють. Фрагменти просушують одноразовими серветками. Для отримання кісткового порошку використовують стерильні дрібні напилки.

Гістологічні препарати в парафінових блоках подрібнюють, роблячи тонкі зрізи, розміщують в мікропробірку, додають 1мл ксилола, перемішують, витримують при 56°C 5-10 хв. для розчинення парафіну, ксилол зливають; при необхідності процедуру звільнення від парафіну повторюють кілька разів.

При виділенні ДНК різними методами для моніторинга можливої контамінації паралельно таку ж процедуру проводять в окремій пробірці без внесення біологічного матеріалу.

## **1.2. Виділення ДНК з використанням іонообмінної смоли «Chelex<sup>R</sup> 100»**

Процедура виділення ДНК складається з етапів руйнування клітини фізичними способами та подальшої очистки зразків ДНК від металовмісних сполучень та протеїнів шляхом кип'ятіння в присутності іонообмінної смоли Chelex<sup>R</sup> 100.

В 1,5-мл мікроцентрифужній пробірці розміщують 1мл деіонізованої води. Додають 80-100мкл крові (або вирізки із плями крові чи епітелію діаметром від 0,3-0,5см<sup>2</sup> до 2-3см в залежності від насиченості ватного тампону з букальним епітелієм), перемішують. Інкують при кімнатній температурі, обережно перемішуючи, протягом 15-30 хвилин (для застарілих плям до 1 год.). Центрифугують при 10тис. обертів протягом 3 хвилин. Акуратно видаляють супернатант, залишають з осадом 20-30 мкл. Проводять повторне промивання бідистильованою (деіонезованою) водою. Додають 5% суспензію Chelex<sup>R</sup>100 до кінцевого об'єму 200мкл. Інкують протягом 15-30 хвилин при +56°C. Струшують на вортексі 5-10 сек. Інкують протягом 10 хвилин при +99 - +100°C. Струшують на вортексі 5-10 сек. Центрифугують при 10тис. обертів протягом 3 хвилин. Зразок зберігають при +4°C. При повторному використанні розчину ДНК повторюють струшування і центрифугування. При тривалому зберіганні надосадову рідину відбирають в чисту пробірку і зберігають в морозильній камері (-20°C).

### **1.3. Виділення ДНК з використанням протеїнази К**

В основі метода лежить лізис клітин додецилсульфатом натрію (SDS) і деградація білків протеїназою К. Клітинний лізат очищують органічними розчинниками, ДНК висаджують холодним спиртом з подальшим розчиненням в ТЕ(Трис-ЕДТА) буфері.

У 1,5-мл мікроцентрифужній пробірці розміщують вирізку, змив, подрібнений біоматеріал, 100-200мкл рідкої крові та ін., додають 300-600 мкл лізуючого буферу TENS, до складу якого входить 10мМ Трис-НСl, 5мМ Na<sub>2</sub>ЕДТА, 0,1М NaCl, 2% SDS. Додають 2-8мкл (до кісток і внутрішніх органів 10-25 мкл) водного розчину протеїнази К (20мг/мл), вміст пробірки перемішують. Зразок інкубують при +56°С протягом від 1-2 год. до 24-48 год. (для кісток, внутрішніх органів). При довготривалій інкубації в пробірку додають дробно по 10-25 мкл розчину протеїнази К (20мг/мл). Предмет-носії видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. При дослідженні твердого біоматеріалу в чисту пробірку переносять надосадову рідину. Додають 1/5 (2/5 для кісток, внутрішніх органів) частину від загального об'єму 3М ацетату амонію або ацетату калію та поміщають на кілька хвилин в холод. Центрифугують 5хв. при 10 тис. об/хв. Супернатант відбирають в чисту пробірку. Екстракцію та очистку ДНК проводять двома шляхами:

- 1). До надосадової рідини додають рівний об'єм хлороформу (або суміші хлороформ-ізоамилового спирту 24:1). Акуратно перемішують протягом 3-5 хвилин. Центрифугують 20 хв. при тах об/хв. Верхню водну фазу акуратно відбирають в нову пробірку, додають 2,5 об'єму 96° етилового спирту.
- 2). До надосадової рідини додають рівний об'єм ізопропілового спирту. Після процедури 1) або 2) пробірку розміщують в морозильну камеру на 1-18 год., центрифугують 15-30 хв. при тах об/хв. Супернатант видаляють декантуванням. Осад просушують, промивають 200-500 мкл 75° етилового спирту (перевертаючи в руках), центрифугують 5 хв. при тах об/хв. Супернатант видаляють декантуванням, осад просушують на фільтрувальному папері (можна підсушити в термостаті при +56°С) та додають до нього 60-120 мкл ТЕ-буферу, перемішують. Для кращого розчинення можна розмістити пробірку в термостат при температурі +56°С на 5-10 хв. Зразок зберігають при +4°С. Для тривалого зберігання зразок заморожують.

### **1.4. Виділення ДНК із змішаних біологічних слідів, що містять сперму**

При статевих злочинах в більшості випадків відбувається змішування сперми злочинця з епітеліальними та іншими клітинами (виділень, крові тощо) жертви. При дослідженні таких біологічних слідів застосовують диференційний лізис клітин. В основі метода лежить властивість сперматозоїдів зберігати свою цілісність після лізису інших клітин. При диференційному лізисі отримують дві фракції, які умовно називають епітеліальною і спермальною. При цьому треба відмітити, що при дуже незначній кількості сперматозоїдів в змішаних слідах не вдається отримати

чисту спермальну фракцію, в ній буде домішок складової епітеліальної фракції. Диференційне виділення ДНК можна проводити двома методами:

1). В 1,5-мл мікроцентрифужну пробірку розміщують вирізку, додають 300-700мкл лізуючого буферу TENS та 2-8мкл водного розчину протеїнази К (20мг/мл), вміст пробірки перемішують. Зразок інкубують при +56°C протягом 40-60 хв. Предмет-носій видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. Розчин центрифугують 5 хв. при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину переносять в чисту пробірку, яку розміщують в холодильнику (епітеліальна фракція) при +4°C - +8°C. До осаду (20-30 мкл) додають 200мкл лізуючого буферу TENS, перемішують, центрифугують 5 хв. при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють максимально. Осад промивають 1-2 рази 1мл бідистильованої води, обережно перемішують, центрифугують 5 хв. при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють максимально. До осаду додають 400 мкл лізуючого буферу TENS та 10мкл водного розчину протеїнази К (20мг/мл), вміст пробірки перемішують (можна також додати меркаптоетанол до 2% або дітіотрейтол до 0,04М). Зразок інкубують при +56°C протягом 2 год. Отримують спермальну фракцію. Далі обидві фракції досліджують разом. До кожної з пробірок додають 1/5 частину від загального об'єму 3М ацетату амонію або ацетату калію та поміщають на кілька хвилин в холод. Центрифугують 5хв. при max об/хв. Супернатант відбирають в чисті пробірки. Екстракцію та очистку ДНК проводять двома шляхами:

а) до надосадової рідини додають рівний об'єм хлороформу (або суміші хлороформ-ізоамилового спирту 24:1). Акуратно перемішують протягом 3-5 хвилин. Центрифугують 20 хв. при max об/хв. Верхню водну фазу акуратно відбирають в нову пробірку, додають 2,5 об'єму 96° етилового спирту.

б) до надосадової рідини додають рівний об'єм ізопропилового спирту. Після процедури 1) або 2) пробірки розміщують в морозильній камері на 1-18 год., центрифугують 15-30 хв. при max об/хв. Супернатант видаляють декантуванням. Осад просушують, промивають 200-500 мкл 75° етилового спирту (перевертаючи в руках), центрифугують 5 хв. при max об/хв. Супернатант видаляють декантуванням, осад просушують на фільтрувальному папері (можна підсушити в термостаті при +56°C) та додають до нього 60-100 мкл ТЕ-буферу, перемішують. Для кращого розчинення можна розмістити в термостаті при температурі +56°C на 5 - 10 хв. Зразок зберігають при +4°C. Для тривалого зберігання зразок заморожують.

2). В 1,5-мл мікроцентрифужній пробірці розміщують вирізку, додають 200-500мкл бідистильованої води та 2-6мкл водного розчину протеїнази К (20мг/мл), вміст пробірки перемішують. Зразок інкубують при +56°C протягом 40-60 хв. Предмет-носій видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. Розчин центрифугують 5 хв. при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину переносять в чисту пробірку, до якої додають 20% Chelex<sup>R</sup>100 до загального об'єму 200 мкл, розміщують в холодильнику (епітеліальна фракція) при +4°C - +8°C. До осаду (20-30 мкл) додають 200мкл лізуючого буферу TENS, перемішують, центрифугують 5 хв.



при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють максимально. Осад промивають 1-2 рази 1мл бідистильованої води, обережно перемішують, центрифугують 5 хв. при 10 тис. об/хв. Надосадову рідину видаляють максимально. До осаду додають 5% Chelex<sup>R</sup> 100 до загального об'єму 200 мкл таб-10 мкл водного розчину протеїнази К (20мг/мл), вміст пробірки перемішують (можна також додати меркаптоетанол до 2% або дітіотрейтол до 0,04М). Отримують спермальну фракцію. Зразки епітеліальної і спермальної фракцій інкубують при +56°C протягом 1-2 год. Далі інкубують при +99-+100°C протягом 8-10 хвилин. Струшують на вортексі 5-10 сек. Центрифугують при 10 тис. g протягом 3 хвилин. Зразки зберігають при +4°C. При повторному використанні розчину ДНК повторюють струшування і центрифугування. При тривалому зберіганні надосадову рідину відбирають в чисту пробірку і зберігають в морозильній камері (-20°C).

### **1.5. Виділення ДНК з використанням сорбенту SiO<sub>2</sub>**

Методика використовується при незначних кількостях ДНК, забрудненні, впливі предмету-носія. Процедура виділення ДНК складається із етапів руйнування клітин за допомогою лізуючого буферу, що містить гуанідінтіоціанат, подальшої екстракції ДНК на сорбент SiO<sub>2</sub> та її елюції в ТЕ-буфер при нагріванні.

У 1,5-мл мікроцентрифужній пробірці розміщують вирізку, змив, подрібнений біоматеріал, 50 мкл рідкої крові та ін., додають 300-600 мкл лізуючого буферу, до складу якого входить 10М гуанідінтіоціанат, 0,1М трис-НСІ, 0,2М Na<sub>2</sub>ЕДТА, 2,6% тритон Х-100, перемішують на вортексі 3-5 сек. Розміщують в термостаті на 10 хв. при температурі +65°C (при застарілих плямах, дослідженні кісток, нігтьових пластинок, тканин органів від 40 хв. до декількох годин). Предмет-носії видаляють, перемістивши в чисту пробірку та максимально відібравши з нього залишки розчину. При дослідженні твердого біоматеріалу в чисту пробірку переносять надосадову рідину. Сорбент ретельно перемішують на вортексі та додають 30-40 мкл в пробірку з лізатом. Протягом 10 хв. пробірку перемішують. Центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю та додають 300 мкл відмиваючого розчину, що містить 10М гуанідінтіоціанат, 0,1М трис-НСІ, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю та додають 700 мкл етанолу, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють, додають 700 мкл ацетону, ретельно перемішують на вортексі, центрифугують 15 сек. при 7 тис. об/хв. Супернатант видаляють повністю. Відкриті пробірки розміщують в термостаті при температурі +65°C до повного висихання (осад повинен тріснути). До осаду додають 70-100 мкл ТЕ-буферу, перемішують на вортексі, розміщують в термостаті при температурі +65°C 5-10 хв. Центрифугують 1 хв. при 7 тис. об/хв. При повторному використанні елюату повторюють струшування і центрифугування. Для тривалого зберіганні надосадову рідину відбирають в чисту пробірку і зберігають в морозильній камері (-20°C).

Для виділення ДНК можна застосовувати комерційні набори, які містять всі необхідні компоненти, розчини і реактиви.

**1.6. Окремо пропонуємо методику виділення ДНК із кісткової тканини**, протокол якої запропонований співробітниками кафедри судової медицини та медичного законодавства Одеського національного медичного університету проф. Кривдою Г.Ф. та к.мед.н. Кривдою Р.Г. [Пат. 10445 Україна, МПК 7: А61В 5/117 Спосіб ідентифікації особи / Кривда Г. Ф., Кривда Р. Г. ; заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № u 200504118 ; заявл. 29.04.2005 ; опубл. 15.11.2005, Бюл. № 11. – 4 с. ].

Протокол заснований на використанні в лізуючому буфері аніонного детергента додецилсульфату натрію (SDS) у концентрації 1,5 % і протеолітичного ферменту протеїнази К у кінцевій концентрації 0,1 мг/мл, які денатурують білки, внаслідок чого відбувається руйнування мембран клітин і вихід ДНК у розчин. Білки і полісахариди при додаванні ацетату калію до кінцевої концентрації 1,5 М утворюють комплекси із додецилацетатом калію при температурі 0°C і видаляються центрифугуванням; ДНК із розчину осаджується ізопропанолом.

Склад лізуючого буфера: 100 мМ трис-НСl, рН 8,0; 50 мМ ЕДТА; 500 мМ NaCl; 1,5 % SDS; протеїназа К (20 мг/мл) до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл.

У мікроцентрифужну пробірку типу «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл вносять 50,0 мг подрібненого кісткового порошку і 500,0 мкл лізуючого буфера, перемішують, інкубують 12–14 год. при 56°C, періодично перемішуючи. Лізат охолоджують до кімнатної температури, додають 5 М ацетат калію до кінцевої концентрації 1,5 і 3М ацетату натрію до кінцевої концентрації 0,3 М, ретельно перемішують. Інкубують при температурі 0°C протягом 3год. Центрифугують при 13 000 об/хв. протягом 20хв., відокремлюють супернатант у стерильну пробірку, додають однаковий об'єм ізопропанолу й інкубують не менше 3 год. при температурі –20 °С, пробу центрифугують протягом 20 хв. при 12 000 об/хв., супернатант видаляють, осад ДНК промивають 70% етанолом, центрифугують протягом 2–3 хв. при 12 000 об/хв., осад розчиняють у 50,0 мкл ТЕ. Пробу зберігають при температурі +4 °С.

## **2.Вимірювання концентрації виділеної ДНК за допомогою флюорометра**

Встановлення кількості виділеної ДНК проводиться для оптимізації концентрації ДНК, яка вноситься у полімеразну ланцюгову реакцію. Ампліфікація мікросателітних локусів, як правило, здійснюється при значеннях концентрації ДНК у діапазонах від 0,5 до 2,0 нг, внесення незбалансованої кількості ДНК у реакцію призводить до зниження її чутливості і не отримання неспецифічних продуктів або до їх повної відсутності.

Для встановлення кількості виділеної ДНК у розчині широко використовуються три методи. Найбільш простим і точним є

спектрофотометричний метод, однак, він має дуже малу чутливість. Концентрацію ДНК експертних об'єктів з низьким вмістом ДНК частіше встановлюють за інтенсивністю флюоресценції її комплексів з бромистим етидієм або Hoechst 33258 з допомогою флюорометрів. Нижче наведена методика.

Концентрацію виділеної ДНК у розчині визначають за допомогою ДНК-флюориметра (зокрема Hoefer DuNA Quant™200 «Hoefer Scientific Instruments», США).

У присутності ДНК у бісбензimidу (барвник Hoechst 33258) змінюються параметри флюоресценції, інтенсивність якої пропорційна концентрації ДНК. Інтеркалюючий барвник Hoechst 33258 специфічно взаємодіє, зв'язуючись тільки з дволанцюговою ДНК, що дозволяє коректно вимірювати концентрацію ДНК у присутності білкових і РНКових контамінантів. При вимірюванні концентрації ДНК використовувати наступні розчини :

1. Розчин TE (1 мМ Na<sub>3</sub>ЕДТА; 10 мМ трис-НСІ; рН 8,0).
2. Розчин ДНК із відомою концентрацією (контрольна високомолекулярна ДНК з концентрацією 10 нг/мл).
3. 10 x TNE буфер (100 мМ трис-НСІ; рН 7,4; 10 мМ Na<sub>3</sub>ЕДТА; рН 8,0; 1 М NaCl).
4. Водний розчин 10 мг/мл інтеркалюючого барвника Hoechst 33258 .

Флюориметр вмикають за 15 хв до вимірювання. Калібрують відносно зразка контрольної ДНК із відомою концентрацією в 1xTNE буфері у присутності 10 мг/мл Hoechst 33258. Вимірювали концентрацію одержаних препаратів ДНК в 1xTNE у присутності 10 мг/мл Hoechst 33258.

### **3. Ампліфікація отриманих препаратів ДНК методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)**

Виділену ДНК використовують в якості матриці для синтезу специфічних поліморфних мікросателітних (STR) локусів ДНК генома людини шляхом полімеразної ланцюгової реакції. Рекомендовано використовувати для аналізу обов'язкові STR-локуси: FGA, D18S51, D2S1338, D19S433, TPOX, D8S1179, CSF1PO, D16S539, TH01, VWA, D5S818, D3S1358, D13S317, D7S820, при необхідності – додаткові STR-локуси. Для визначення генетичної статі проводять ампліфікацію за локусом амелогеніну (Amel).

ДНК-аналіз може проводитися з використанням індивідуалізуючої мультиплексної панелі для ПЛР-аналізу “AmpFI STR® Identifier™” (“Applied Biosystems”, США) або за допомогою індивідуалізуючої панелі мікросателітних локусів у монолокусному форматі. Дана індивідуалізуюча панель також сформована з локусів які входять до складу “AmpFI STR® Identifier™” (“Applied Biosystems”, США).

Вищеназвані індивідуалізуючі панелі для ПЛР-аналізу передбачають різні методи проведення аналізу отриманих продуктів ампліфікації – їх детекції, які залежать від характеристики основних компонентів ПЛР – праймерів.

Існує два способи детекції продуктів ампліфікації, в основі яких використовується електрофоретичне розділення фрагментів ДНК (продуктів ампліфікації - ампліконів) за довжиною – фрагментний аналіз ДНК.

Перший спосіб, який набув свого поширення в класичній молекулярній генетиці та судовій медицині - це електрофорез, який проводиться в камері (горизонтальній або вертикальній), заповненій буферним розчином. Найчастіше використовуються буфери, які містять, EDTA, Tris-HCl і борну кислоту TAE і TBE. Буфер необхідний для підвищення іонної сили розчину, в якому відбуватиметься розділення молекул ДНК під дією прикладеного електричного поля. Після розділення фрагменти ДНК різної довжини візуалізують за допомогою різних фарбників з використанням флюоресцентних фарбників або нітрату срібла, що специфічно взаємодіють з ДНК, наприклад, агарозні (для відносно довгих молекул ДНК) або поліакріламідні (для високого розподілу коротких молекул ДНК). Гелі зазвичай фарбують бромистим етідієм, який інтеркалізує між азотистими підставами дуплексу і флюоресцирує в УФ-променнях. Визначення розмірів проводять шляхом порівняння комерційно доступних фрагментів ДНК (DNA ladder, «лінійка»), що містить лінійні фрагменти ДНК відомої довжини.

При проведенні ДНК-аналізу у судово-медичних цілях раніше використовувалися індивідуалізуючі системи, детекція продуктів ампліфікації яких відбувається за рахунок візуалізації фрагментів ДНК за допомогою нітрату срібла, так званий метод «ручного ДНК-аналізу».

Метод проведення «ручного ДНК-аналізу» має як свої переваги, так і недоліки. Серед переваг – рентабельність (невелика вартість реагентів, устаткування та обладнання), простота виконання досліджень. До недоліків можна віднести працемісткість, необхідність використання токсичних речовин, обмеження чутливості.

Інший спосіб детекції - це розділення за допомогою капілярного електрофорезу, яке засноване на відмінностях в електрофоретичній рухливості молекул, які розділяються. У 1960-х роках була запропонована методика капілярного електрофорезу для розділення молекул за зарядом і розміром, яка проводилася в тонкому капілярі, заповненому електролітом. На сьогоднішній день, для проведення капілярного гель-електрофорезу використовується спеціальне обладнання – генетичні аналізатори, в основі роботи яких закладена детекція поглинання випромінювання в ультрафіолетовій ділянці світла – «автоматичний ДНК-аналіз». Визначення розмірів фрагментів ДНК відбувається за рахунок свічення продуктів ампліфікації, отриманих з флюоресцентно-міченими праймерами.

Наприклад, індивідуалізуюча панель “AmpFISTR®Identifiler™» комплектується флуоресцентно-міченими праймерами, детекція продуктів ПЛР ДНК з якими проводиться з використанням генетичного аналізатору. Генетичні аналізатори представляють собою прилади для проведення капілярного електрофорезу, які дозволяють з високою роздільною здатністю, чутливістю, точністю, відтворюваністю результатів та за короткий термін провести дослідження.

Використання сучасних мультиплексних наборів набуває все більшої актуальності за рахунок того, що ампліфікація виділеної геномної ДНК біологічних об'єктів за усіма досліджуваними локусами здійснюється в одній пробірці, після чого розділення продуктів ампліфікації проводиться за допомогою генетичного аналізатору. Цей методичний підхід має низку переваг: зниження витрат матричної ДНК і реактивів, зниження працевтрат та ризику контамінації. У функціональному плані мультиплексні ампліфікаційні індивідуалізуючі системи типування мікросателітних локусів поєднують специфічність та чутливість ПЛР з високими параметрами інформативності та високим дискримінаційним потенціалом.

### 3.1. Ампліфікація локусів в монолокусному форматі

Підготовка до ПЛР: в окремих пробірках для кожного локусу готують реакційну суміш, що містить буфер, дезоксинуклеозидтрифосфати, пару олігонуклеотидних праймерів, термостабільну ДНК-полімеразу, в кількості, пропорційній сумарній кількості досліджуваних зразків ДНК з урахуванням контролю виділення ДНК, негативного (всі компоненти, окрім ДНК) і позитивного (містить ДНК з відомим набором алелей за кожним локусом), контролів реакції ампліфікації. Отриману суміш після перемішування і осадження розливають по 20-29 мкл в марковані тонкостінні пробірки об'ємом 0,2-0,5мл, куди додають по 1-10 мкл виділеної ДНК. Пробірки струшують і центрифугують 5-10 сек. при 1,5-2 тис.об/хв., розміщують в ампліфікаторі (термоциклері), задають програму ПЛР згідно інструкціям до наборів для ампліфікації. По закінченні ампліфікації пробірки розміщують в холодильнику і зберігають при +4°C. Для тривалого зберігання заморожують.

### 3.2. Ампліфікація локусів мультиплексних систем

ДНК, виділену із біологічних об'єктів, досліджують за допомогою набору для ПЛР-ампліфікації "AmpFISTR®Identifiler" (Applied Biosystems", США) відповідно до інструкції, яка додається виробниками реагентів. При постановці ПЛР здійснюють негативний контроль (реакційна суміш містить всі компоненти, крім ДНК) і позитивний контроль (реакційна суміш містить ДНК із відомим набором алелей за кожним локусом). Зразки контрольної ДНК надані виробником реагентів. Дослідження проводиться з використанням системи «GeneAmp® PCR 2720» ("Applied Biosystems", США).

Приготування робочої суміші: необхідно змішати суміш реагентів для ПЛР до якої входить буфер, ДНК-полімераза і набір праймерів в одній пробірці. Для ампліфікації з набором AmpFISTR®Identifiler™ потрібно 10,0 мкл ДНК в концентрації 0.05-0.125 нг/мкл. Кінцевий об'єм в кожній пробірці для ПЛР складає 25,0 мкл. Проведення ПЛР здійснюється відповідно до рекомендуємих параметрів термоциклювання.

## 4. Аналіз продуктів ПЛР методом електрофорезу

### 4.1. Аналіз ампліфікованих фрагментів ДНК в монолокусному форматі

Орієнтовну оцінку якості і кількості ампліфікатів проводять шляхом горизонтального електрофорезу в 2% агарозних гелях. Відповідну навіску агарози розплавляють в ТБЕ (трис-боратному) буфері. Теплий розчин виливають на підложку з гребінками. Після застигання агарози гребінки виймають. Гель розміщують в електрофорезній камері з ТБЕ буфером. В лунки вносять зразки ДНК в суміші з барвником бромфеноловим синім. Електрофорез проводять при напрузі поля не більше 15 В/см, розміщуючи гель стартовими лунками до катоду (-). Візуалізацію фрагментів ДНК відбувається забарвленням гелю бромистим етідієм з подальшим переглядом в ультрафіолетовому променях. За інтенсивністю свічення смуг в УФ-променях визначають якість проведеної ПЛР та орієнтовну кількість ампліфікованих фрагментів ДНК.

Для встановлення ДНК-профілю отриманих ПЛР-продуктів проводять їх електрофоретичне розділення в 6-10% поліакриламідних гелях (ПААГ) в денатуруючих умовах з послідуєчим забарвленням нітратом срібла. При приготуванні 20% розчину ПАА використовують акриламід та метиленбісакриламід, додається 8М сечовина. Для отримання поліакриламідного гелю до розчину додається персульфат амонію, для прискорення процесу полімеризації додається ТЕМЕД. Отриманий розчин заливається в касету з двох скріплених між собою скельця, зверху розміщується гребінка. Після застигання ПААГ (40-60 хв.), гребінка виймається, скельця з ПААГ прикріплюються в вертикальну електрофоретичну камеру, заливаються ТБЕ-буфером. Після префорезу (30-60 хв.) в лунки гелю вносяться денатуровані при +95°C та швидко охолоджені при 0°C зразки ПЛР-продуктів в суміші з барвниками (бромфеноловим синім та ксиленціанолом) та денатуруючим агентом формамідом. Поряд із зразками в лунки вносяться локус-специфічні алельні маркери. Електрофорез проводять при напрузі поля 25 В/см, розміщуючи гель стартовими лунками до катоду (-). Візуалізацію фрагментів ДНК проводять забарвленням нітратом срібла. Спочатку фрагменти ДНК фіксують в гелі, витримуючи їх в розчинах 10% етанолу та 1% азотної кислоти (по 5-10 хв.), промивають дистильованою водою. Потім гелі розміщують в розчині 0,012М нітрату срібла на 25-30 хв., промивають дистильованою водою. Проявляють розчином 0,28М карбонату натрію та 0,019% формальдегіду до появи забарвлених фрагментів ДНК. Для фіксації витримують в 10% розчині оцтової кислоти кілька хвилин.

#### 4.2. Аналіз продуктів ПЛР методом капілярного електрофорезу за допомогою генетичного аналізатору

Проводять автоматичний аналіз продуктів ампліфікації з набором "AmpFISTR® Identifiler" і розділенням флуоресцентно-мічених ПЛР-фрагментів у чотирьох капілярних матрицях методом капілярного гель-електрофорезу з полімером POP-4™. Здійснюють відповідну попередню підготовку до аналізу з встановленням робочих параметрів приладу 3130-Genetic Analyzer відповідно до інструкцій виробника. Якість генотипування контролюють, використовуючи стандартний набір алелів всіх 16 мікросателітів (леддер), завантажуючи леддер в кожному циклі генотипування.

Готують зразки для аналізу, для чого в промаркованій пластиковій мікроцентрифужній пробірці об'ємом 0,5 мл змішують 24,5 мкл формаміду Ni-Di і 0,5 мкл внутрішнього розмірного стандарту GenScan™-500 LIZ, ретельно перемішують на вортексі, коротко центрифугують. Додають 1,5 мкл ампліфікату або аналогічну кількість алельного ледеру, перемішують на вортексі і коротко центрифугують. Після чого денатурують кожний зразок при 95°C на водяній бані протягом 3 хвилин. Охолоджують зразки на льоду не менш ніж 3 хвилини. Вміст пробірок акуратно переносять автоматичним мікродозатором в лунки планшету, після чого планшет закривають кришкою і розміщують в автоматичний пробовідбірник пристрою 3130-Genetic Analyzer. Флуоресцентний сигнал, випромінюваний фрагментами ДНК, фіксується CCD-камерою і передається у комп'ютер.

#### **5. Визначення генотипічних характеристик досліджуваних об'єктів в «ручному режимі» та їх порівняльний аналіз**

Після забарвлення на доріжках поліакриламідного гелю повинні чітко виявлятися одна (гомозиготний генотип) або дві смуги (гетерозиготний генотип), утворені фрагментами ДНК. Встановлення ДНК-профілів (розмірів ампліфікованих фрагментів) досліджуваних зразків відбувається за допомогою алельних маркерів для кожного локусу.

При ідентифікації біологічних слідів порівнюються генотипічні характеристики ДНК досліджуваного біологічного сліду і ДНК особи, яку ідентифікують. При цьому, на відміну від батьківства, порівнюється ідентичність не однієї алелі кожного локуса, а ідентичність алельної комбінації кожного локуса. Генетична стать визначається за наявністю одного (відповідає жіночій генетичній статі) або двох (відповідає чоловічій генетичній статі) синтезованих фрагментів гена амелогеніна. Результати генотипування заносяться в таблицю. Якщо за всіма дослідженими локусами генотипічні ознаки порівнюваних об'єктів збігаються, то їх ідентичність не виключається. Якщо за двома (а іноді і одним) дослідженими локусами

генотипічні ознаки порівнюваних об'єктів не збігаються, то їх ідентичність виключається.

При отриманні генетичної ідентичності об'єкту біологічного сліду і порівняльного об'єкту (певної особи) за 8-10 STR-локусами та за генетичною статтю робиться висновок про належність досліджуваного біологічного сліду цій особі. При цьому відзначається, з якою частотою в популяції зустрічається вказана комбінація генетичних ознак (наприклад, вказана комбінація генетичних ознак зустрічається у двох чоловік на 10 мільярдів).

## **6. Багатокомпонентний аналіз продуктів ПЛР на автоматичному генетичному аналізаторі**

Проводять автоматичний аналіз продуктів ампліфікації з набором "AmpFISTR<sup>®</sup> Identifiler" і розділенням флуоресцентно-мічених ПЛР-фрагментів у чотирьох капілярних матрицях методом капілярного гель-електрофорезу з полімером POP-4<sup>™</sup>. Здійснюють відповідну попередню підготовку до аналізу з встановленням робочих параметрів приладу 3130-Genetic Analyzer відповідно до інструкцій виробника. Якість генотипування контролюють, використовуючи стандартний набір алелей всіх 16 мікросателітів (ледер), завантажуючи ледер в кожному циклі генотипування.

Готують зразки для аналізу, для чого в промаркованій пластиковій мікроцентрифужній пробірці об'ємом 0,5 мл змішують 24,5 мкл формаміду Hi-Di і 0,5 мкл внутрішнього розмірного стандарту GenScan<sup>™</sup>-500 LIZ, ретельно перемішують на вортексі, коротко центрифугують пробірку. Додають 1,5 мкл ампліфікату або аналогічну кількість алельного ледеру, перемішують на вортексі і коротко центрифугують. Денатурують кожний зразок при 95°C на водяній бані протягом 3 хвилин. Охолоджують зразки на льоду не менш ніж 3 хвилини. Вміст пробірок акуратно переносять автоматичним мікродозатором в лунки планшету, після чого планшет закривають кришкою і розміщують в автоматичний пробовідбірник пристрою 3130-Genetic Analyzer. Флуоресцентний сигнал, випромінюваний фрагментами ДНК, фіксується CCD-камерою і передається у комп'ютер.

Прочитання одержаних генотипів проводиться за допомогою програмного забезпечення «Gene Mapper ID Software Version 3.1», відповідно до інструкції виробника. Одержані дані виводяться у вигляді електрофореграми, яка являє собою хроматографічне зображення, в якому інтенсивність флуоресценції вказана по вісі «у» у відносних одиницях (ВОФ). Після чого задають і застосовують внутрішній розмірний стандарт по вісі «х» електрофореграми і встановлювали розміри ампліфікованих фрагментів в парах основ. Одержані генотипи автоматично реєструються у комп'ютерній базі даних. Друкують одержані електрофореграми на зовнішньому друкуючому принтері.



## 7. Проведення розрахунків

Для підтвердження генетичної ідентичності недостатньо збігу геномних профілів біологічного сліду і особи, з якою порівнюють, необхідно провести оцінку вірогідності такого збігу. При цьому враховують ймовірність випадкового успадкування генотипічних ознак кожного з досліджених локусів – статистичну частоту генотипу (P). При її розрахунку використовують значення популяційних частот алелі (p).

Якщо в порівнюваних об'єктах спостерігається гомозиготний профіль, то ймовірність випадкового збігу генотипу

$$P=p^2.$$

Якщо в порівнюваних об'єктах спостерігається гетерозиготний профіль, то ймовірність випадкового збігу генотипу

$$P=2 p_1p_2.$$

Кумулятивна ймовірність випадкового збігу всього дослідженого генотипу дорівнює добутку ймовірностей випадкового збігу генотипу за окремими локусами

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

Вірогідність генетичної ідентичності

$$PP=1/(1+P_{\text{кум}}) 100\%$$

Умовне значення вірогідності генетичної ідентичності відповідає байєсовській ймовірності при 50% апіорній ймовірності генетичної ідентичності і показує, що отриманий результат не є наслідком випадкового збігу генетичних ознак.

При отриманні генетичної ідентичності об'єкту біологічного сліду і порівняльного об'єкту (певної особи) за 8-10 STR-локусами та за генетичною статтю робиться висновок про належність досліджуваного біологічного сліду цій особі. При цьому відзначається, з якою частотою в популяції зустрічається вказана комбінація генетичних ознак (наприклад: вказана комбінація генетичних ознак зустрічається у двох чоловік на 10 мільярдів). При відмінності генетичних ознак порівнюваних об'єктів мінімум за 2 (а в деяких випадках і одним) STR-локусами робиться висновок про неналежність досліджуваного біологічного сліду певній особі.

## **РОЗДІЛ III. Проведення експертизи (дослідження) спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності**

### **1. Основні положення проведення експертиз (досліджень) спірного батьківства, материнства, підміни дітей, родинності**

Судово-медичні експертизи спірного батьківства, материнства, підміни дітей родинності, в основному проводяться у цивільних справах за ухвалами суду, в яких виносяться рішення, якій установі доручається проведення експертизи та кому із підекспертних осіб потрібно з'явитися для відбору зразків.

Відбір зразків біоматеріалу проводиться тільки у разі явки всіх підекспертних осіб одночасно в лабораторію бюро. В деяких окремих випадках, як виняток, (якщо хтось із підекспертних є нетранспортабельним) зразок біоматеріалу може бути відібраним за місцем проживання співробітником медичного закладу, знову ж тільки за рішенням суду, суд також виносить рішення і щодо доставки зразка в бюро, яке проводить експертизу.

Також в бюро судово-медичної експертизи виконуються дослідження із зазначених питань за заявами громадян і за результатами досліджень складається «Висновок спеціаліста».

Згідно Постанови Кабінету Міністрів України від 17.09.1996р., №1138 та Постанови №8 Пленуму Верховного Суду України від 30.05.№1997р. судово-медичні експертизи та дослідження у цивільних справах є платними і оплата проводиться за рахунок сторони, яка порушила відповідне клопотання.

Проведення вищезазначених експертиз і досліджень з використанням ДНК-аналізу базуються на законах спадковості Менделя, які характерні власне для ядерної ДНК. Спадкова інформація передається внаслідок самоудвоєння хромосом ( у людини є 23 пари хромосом, із яких одна пара – статеві хромосоми). Кожна хромосома (крім статевих хромосом чоловіків) має дві копії, одна із яких передається від матері, інша – від батька. Одні і ті ж батьки передають своїм дітям різні комбінації генетичних ознак. В процесі дослідження молекули ДНК вся її послідовність не розшифровується, вивчаються лише деякі ділянки, які називаються локусами, а саме ті, що є поліморфними, тобто, на відміну від консервативних ділянок, (що однакові у всіх людей), мають різну будову у різних людей. Локуси мають обмежену кількість варіантів послідовностей ДНК – від двох до декількох десятків (якщо брати все населення). Кількість варіантів послідовностей ДНК, які відносяться до певного локусу називаються алелями. У окремо взятої людини алелей може бути не більше двох (по одному від батька і матері). Якщо батьки передали дитині різні варіанти алелей, то відповідно їх буде два, якщо алелі, що передали батьки, ідентичні, то у дитини буде один алельний варіант. Комбінація алелей складає генотип.

ДНК-аналіз дає можливість проводити експертизи спірного батьківства від моменту народження дитини. Для цього проводиться порівняння генотипічних характеристик ДНК матері, дитини та передбачуваного батька. І тільки за відсутності матері (її смерті, пропажі безвісти тощо) допускається дослідження біоматеріалу дитини і передбачуваного батька.

Найдоцільніше для проведення зазначених експертиз (досліджень) проводити відбір зразків крові, в окремих випадках – букального епітелію.

## 2. Виключення батьківства

Отже, у дитини можуть бути тільки ті алелі, які є у біологічних батьків. При відсутності у заявленого батька алелей, що співпадають з алелями не материнського походження (батьківського) в геномі дитини, робиться висновок про виключення батьківства. Однак з урахуванням можливих мутацій, за одним локусом однозначно не можна робити такий висновок. За міжнародними вимогами, що були прийняті на Другому Міжнародному Симпозіумі з Ідентифікації людини в 1991 році, для виключення батьківства необхідне неспівпадіння **як мінімум за трьома локусами** (при дослідженні 12-18 локусів). Таких вимог дотримується і Україна.

## 3. Розрахунок відсотка ймовірності батьківства

За вимогами цього ж Симпозіуму батьківство вважається доведеним, якщо його ймовірність складає не менше ніж 99,99% (для повного тріо: мати, передбачуваний батько, дитина за умови, що істинність іншого із батьків є безспірною) і 99,9% (для дуету: передбачуваний батько - дитина), що вираховується з використанням теореми Байєса – **PP**(англ. – Probabiliti of Paterniti, PP).

Ймовірність батьківства розраховується за формулою:

$$PP = 1/(1+P_{\text{кум.}}),$$

де  $P_{\text{кум.}}$  – частота розповсюдження сукупності генетичних ознак в популяції. Зазвичай, ймовірність визначають у відсотках:  $PP \times 100 = \%$

Розрахунок ймовірності батьківства проводиться на підставі частот розповсюдження алелей кожного маркера ( $p_1, p_2$ ) в популяції. Як з'ясовано, що частоти деяких алелей різняться в залежності від расової належності, внаслідок чого потрібно користуватися частотами тої етнічної групи, до якої належать підекспертні.

Вірогідність того, що співпадіння нематеринської алелі дитини і алелі заявленого батька випадкове для кожного маркера ( $k$ ) розраховується за формулами:

$$P_k = 2p_1 - p_1^2 + 2p_2 - p_2^2 - 2p_1p_2$$

у випадку співпадіння обох алелей (1 та 2) у матері і дитини в гетерозиготному стані або

$$P_k = 2p - p^2 \text{ в іншому випадку, де}$$

$P$  – ймовірність випадкового успадкування алелі,  $p$  – частота розповсюдження цієї алелі в популяції.

Кумулятивна ймовірність ( $P_{\text{кум.}}$ ) випадкового успадкування дитиною сукупності генетичних ознак (усіх алелей досліджуваних локусів) від заявленого батька дорівнює добутку ймовірностей, розрахованих для кожного локуса.

У випадку встановлення походження дитини від конкретної батьківської пари застосовується такий розрахунок:

Якщо у дитини спостерігається гомозиготний профіль, то ймовірність випадкового успадкування материнської і батьківської алелі в генотипі дитини:

$$P = np^2,$$

де  $n$  – кількість можливих варіантів генотипів у даних батьків.

Якщо у дитини спостерігається гетерозиготний профіль, то ймовірність випадкового успадкування материнської і батьківської алелі в генотипі дитини:

$$P = 2np_1p_2.$$

#### **4. Використання частот розповсюдження алелей при розрахунках в експертизі спірного батьківства**

В інституті молекулярної біології і генетики НАН України були проведені наукові пошуки щодо вивчення алельного поліморфізму гіперваріабельних локусів серед населення різних регіонів України. За результатами дослідження не виявлено статистично вірогідної диференціації за розподілом частот алельних варіантів STR-локусів серед населення міст Києва, Львова, Кременчука та Алчевська, що свідчить про відносну генетичну гомогенність населення цих регіонів України.

В Одеському Центрі молекулярно-генетичних досліджень (Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи) аналогічні дослідження проведені відносно населення Одеської, Дніпропетровської, Донецької та Київської областей, які також підтвердили генетичну гомогенність населення зазначених регіонів.

За результатами аналізу гаплотипів STR-локусів Y-хромосоми в популяціях слов'янського походження не виявлено генетичної диференціації серед східнослов'янських популяцій (це стосується і слов'янського населення Росії та Білорусії).

Порівняння показників алелей STR-локусів розрахованих для різних регіонів популяцій із України з європейськими теж не виявили високої ймовірної різниці, що свідчить про відносну генетичну гомогенність вказаного населення.

Отже, дані про частоти поширення алелей, за якими проводяться розрахунки відсотка ймовірності батьківства доступні для використання спеціалістами за запитом, а також є опублікованими, крім того, можливе використання і європейських показників. При оформленні «Висновку експерта» або «Висновку спеціаліста» в експертизах (дослідженнях) при використанні певних частот розповсюдження алелей необхідно вказати джерела інформації щодо отримання показників.

## **5. Панель алельних маркерів локусів, що використовується в експертизах (дослідженнях)**

При проведенні ДНК-аналізу в експертизах та дослідженнях використовується стандартна тест-система, яка відпрацьована виробником, і тільки вимагає дотримання параметрів, викладених в доданій інструкції. В цю тест-систему входить і панель алельних маркерів, яка складається із наступних локусів: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TROX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA. Використання вказаного числа локусів достатнє, щоб при розрахунках отримати ймовірність батьківства не нижче 99,99%.

Незважаючи на високу інформативність названої системи, бувають випадки, коли її недостатньо. Це випадки встановлення родинності або так званого «зворотнього батьківства», тобто, по набору отриманих алелей (при дослідженні останків) однозначно визначити батьків. Для більш точного рішення такої задачі доцільно використовувати STR-локуси Y-хромосоми.

Y-хромосома передається тільки по чоловічій лінії і практично не рекомбінується в мейозі, тож за аналізом її алелей можна точно визначити її походження. Найбільш інформативними STR-локусами Y-хромосоми вважаються наступні: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385I|II, які об'єднані в так званий «мінімальний» гаплотип.

Також особливо актуальним стає використання алелей маркерів Y-хромосоми при проведенні експертиз у випадках статевих злочинів.

При встановленні родинності виникає потреба у використанні значно більшої кількості маркерів локусів, ніж прийнято при проведенні стандартного аналізу (до 20-25), такі додаткові STR-локуси потрібно використовувати.

По жіночій лінії ідентичною є мітохондріальна ДНК – це ДНК, яка міститься в мітохондріях, що розташовані в цитоплазмі, і складає менше 1% всієї ДНК клітини. У людини яйцеклітина приносить в зиготу набагато більше цитоплазми ніж спермій. Тому мітохондріальна ДНК передається тільки від одного з батьків, а саме – від матері. Цей мітотип передається іншим поколінням по материнській лінії і є своєрідною альтернативою Y-хромосомі. У зв'язку з високою вартістю і значними трудовими витратами в Україні ця методика тільки починає впроваджуватися.

У випадку, коли одного із батьків немає в живих, для встановлення батьківства (материнства) може бути використаний біоматеріал, який можливо залишився від них в силу різних причин (при дослідженні трупа у відділені судово-медичної експертизи, зразки крові в клініці, зразки волосся на одязі, що використовувався цією особою тощо). В будь-якому випадку, рішення про дослідження такого матеріалу приймається судом, якщо справа вирішується в суді і без рішення суду, якщо дослідження виконується за заявою громадян.

Також можливе дослідження ДНК родичів померлого.

## **6.Встановлення батьківства до народження дитини**

З такою метою дослідженню можуть підлягати ворсинки хоріона або клітини амніотичної рідини. Щоб отримати такий матеріал необхідно:

- вилучити ворсинки хоріона на 10-13 тижнях вагітності трансцервікально (через канал шийки матки) або трансабдомінально (через передню черевну стінку);
- провести амніоцентез на 14-24 тижнях вагітності.

Обидві процедури дуже складні, небезпечні ускладненнями, навіть перериванням вагітності. Тому в Україні на даний час такі маніпуляції для вилучення матеріалу з метою проведення експертизи спірного батьківства не проводяться.

Можна взяти зразок під час родів, в таких випадках береться зразок крові дитини із пупкового канатика.

## **РЕЗЮМЕ**

При проведенні судово-медичної експертизи речових доказів у кримінальних справах стосовно цілого ряду важких злочинів: вбивств, нанесення тяжких тілесних пошкоджень, зґвалтувань тощо дуже важливо встановити належність того чи іншого біоматеріалу конкретній особі. Запропоновані методичні рекомендації «Судово-медичне дослідження речових доказів з використанням ДНК-аналізу» дадуть можливість судовим експертам, які займаються генною дактилоскопією, із одного джерела найти відповіді на питання щодо різних методик виділення ДНК, ампліфікації методом ПЛР, визначення генотипічних характеристик об'єктів та їх порівняльного аналізу, правильного збереження біоматеріалу та виділеної ДНК, проведення розрахунків в експертизі спірного батьківства.

Це дозволить покращити якість виконаних експертиз та скоротити терміни їх проведення.

## Література

1. **Walsh P.**, Metzger D., Higuchi R. (1991) Chelex<sup>R</sup> 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. - Bio Techniques, v.10, №4, p.506-513.
2. **Перепечина И.О.** Об исследовании ДНК в судебной медицине и криминалистике, Москва, Научно-исследовательский центр ДНК-анализа, 1999, 57с.
3. **Перепечина И.О.** «Разработка проблемы судебно-медицинской генетической идентификации», Москва, 2004, 72с.
4. **Тверская С.М.**, Поляков А.В. «Современные аспекты генетики идентификации личности, Москва, ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, 2002, с.138-151
5. **Кожухова Н.С.**, Кривда Г.Ф., Кривда Р.Г., Сиволап Ю.М., Суліма Ю.Ю., Чеботар С.В. Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах: Науково-практичне видання / За ред. Ю.М. Сиволапа та Г.Ф.Кривди. – Одеса. Одеський державний медичний університет, 2001.
6. **Корниенко И.В.**, Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел./ Под общ.ред. П.Л.Иванова. – Ростов-на-Дону. 2001.
7. **Иванов П.Л.** Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установлении родства. //Судебно-медицинская экспертиза. – 1999 - №5, с.35-41.
5. Руководство по судебной медицине. Под ред. ВВ. Томилина, Г.А. Пашиняна. - Москва., «Медицина», 2001, гл.44.
8. Алельний поліморфізм мінісателітних та мікросателітних локусів в популяціях з різних регіонів України. Кравченко С.А., Дис. канд. біол. наук: 03.00.26.-К.2002.-158с.
9. **Кравченко С.А.**, Пампуха В.Н., Экциян А.Ю., Нечипоренко М.В., Лившиц Л.А. Аллельный полиморфизм микро- и минисателитных локусов среди населения региональных популяций Украины // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 5. – С.30-37.
10. **Кравченко С.А.**, Сломинский П.А., Бец Л.А., Степанова А.В., Микулич А.И., Лимборская С.А., Лившиц Л.А. Полиморфизм STR локусов Y-хромосомы у восточных славян в трех популяциях из Белоруссии, России и Украины // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 97-104.
11. **Перепечина И.О.**, Гришечкин С.А. Вероятностные расчеты в ДНК-дактилоскопии. Методические рекомендации. Москва, ЭКЦ МВД РФ, 1996, 16с.
12. **Перепечина И.О.**, Стегнова Т.В., Пименов М.Г. Использование методов генетического анализа для исследования объектов экспертизы вещественных доказательств, Экспертная практика, 1994, №35, с.58-62.
13. Изучение аналитических характеристик молекулярно-генетических индивидуализирующих систем в аспекте судебно-экспертного типирования ДНК . Диссертация (по ВАК 14.00.24), Земскова Елена Юрьевна, Москва, 2008 г.