

Сергей. О.Ф.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

**ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНДИВИДУАЛИЗИРУЮЩЕЙ
СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА НУКЛЕОТИДНЫХ
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРАЛЬНОЙ ДНК В СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ И
УСТАНОВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО РОДСТВА**

(№ 2001/4, утв. МЗ РФ 25.01.2001)

Москва, 2001

Введение

Настоящие методические указания касаются общих принципов экспертного использования молекулярно-генетических индивидуализирующих систем, основанных на анализе митохондриальной ДНК человека и посвящены регламентированию, в рамках экспертного подхода, методических и аналитических процедур, направленных на исследование полиморфизма нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК при решении задач судебно-медицинской экспертизы. В частности, описано практическое применение метода при судебно-экспертной идентификации личности и установлении биологического родства. Обобщен и проанализирован накопленный практический опыт, касающийся производства судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств с помощью применения методов молекулярно-генетической индивидуализации человека, основанных на анализе полиморфизма последовательностей амплифицированных фрагментов (ППАФ) митохондриальной ДНК.

Методические указания предназначены для врачей судебно-медицинских экспертов молекулярно-генетического профиля, а также для научных работников-биологов, специализирующихся в области судебной медицины.

Методические указания подготовлены заведующим отделом судебно-медицинских генетических научных и экспертных исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы доктором биологических наук Ивановым П.Л.

Энзиматическая амплификация в полимеразной цепной реакции tandemно организованных гипервариабельных локусов мини- и микросателлитной природы ядерной (хромосомной) ДНК приводит к формированию индивидуально специфических продуктов (аллельных фрагментов), различающихся по длине; их дифференцируют путем электрофоретического фракционирования. Этот методический подход подробно описан, и его принципы положены в основу индивидуализирующих систем ПДАФ-типа, широко используемых в судебно-медицинской молекулярно-генетической экспертизе родства и идентификации личности [Иванов П.Л. "Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства." Методические указания. // Минздрав РФ, Москва, 1999 г.]

Между тем, решение судебно-медицинской задачи установления родства с помощью анализа хромосомных ПДАФ-маркеров в определенных случаях оказывается проблематичным - в частности, когда генетическая дистанция, разделяющая родственников оказывается большей чем одно поколение (т.е. отцы-дети или сибсы). Одним из наиболее перспективных путей решения этой проблемы является переход от анализа хромосомных генов к анализу митохондриальной ДНК (мтДНК).

МтДНК отличает моноклональная природа и матрилинейное наследование. При этом определенные участки мтДНК - так называемые гипервариабельные (ГВ) области, - демонстрируют высокий уровень полиморфизма. Именно такие гипервариабельные участки митохондриального генома, благодаря своему уникальному способу наследования и тому, что они не подвержены рекомбинированию, представляют большой интерес как потенциальные источники новых индивидуализирующих характеристик человека. Их уникальные свойства делают их высокоэффективным инструментом для целей судебно-медицинской экспертизы.

Полиморфизм в нуклеотидных цепях мтДНК обусловлен точковыми нуклеотидными заменами, микроделециями и микроинсерциями. Дифференцировать такие полиморфные варианты с помощью обычных методов электрофореза невозможно, поэтому в индивидуализирующих системах этого типа используются иные принципы дифференциации вариантов, чем в случае ПДАФ-систем. Наиболее радикальный путь - это так называемое секвенирование (англ. - *sequencing*) амплифицированных фрагментов ДНК, то есть определение первичной структуры олигонуклеотидных продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР), синтезированных на матрице мтДНК. Этот аналитический подход условно можно обозначить сокращением ППАФ - как анализ полиморфизма последовательности амплифицированных фрагментов ДНК.

В настоящее время единственной молекулярно-генетической индивидуализирующей системой, основанной на секвенировании сайт-полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК является локус D-петли мтДНК. Судебно-медицинские аспекты технологии типирования ППАФ в D-петле мтДНК были разработаны и впервые реализованы в идентификационной экспертизе в 1992-95 гг. П.Л.Ивановым в соавторстве со специалистами из Великобритании и США в ходе идентификации останков семьи российской императрицы Екатерины II [P. Gill, P. Ivanov et al. // Nature Genetics, 1994, N6, V.2, P. 130-135; P. Ivanov et al. // Nature Genetics, 1996, N12, V.6, P. 417-425].

В настоящих Методических указаниях изложены общие принципы экспертного использования молекулярно-генетической индивидуализирующей системы на основе феномена ППАФ мтДНК человека для целей молекулярно-генетической верификации родственных связей и - как вариант - идентификации личности и экспертизы родства. Рассмотрены принципиальные вопросы, касающиеся специфики лабораторных процедур и интерпретации экспертных данных, а также методические приемы, призванные повысить точность и надежность анализа.

Описание метода

1. Формула метода.

Описанная в настоящем руководстве технология судебно-экспертного типирования ППАФ митохондриальной ДНК, в отличие от ПДАФ-систем ядерной (хромосомной) ДНК, основана на применении не близкородственных, а так называемых трассирующих родословных маркеров, наследуемых по материнской линии.

В общем виде формула метода включает:

На первом этапе выделение из исследуемых объектов биологической природы суммарной клеточной ДНК, ее очистку и введение в качестве матрицы в ПЦР, где происходит направляемый специфическими праймерами избирательный синтез молекулярных копий контрольного участка D-петли мтДНК. Структурно этот участок представляет собой фрагмент молекулы мтДНК человека, картирующийся между позициями (16024-16569/1-576). Этот участок включает два полиморфных района, условно называемых гипервариабельными сегментами 1 и 2 (*HVC1* и *HVC2*, англ.: *HVR-1* и *HVR-2*). Синтезируемые на них (амплифицируемые) фрагменты ДНК у разных людей могут иметь разную первичную последовательность нуклеотидов (то есть, обладают свойством индивидуальной специфичности). Это так называемый сайт-полиморфизм (от англ. "site" - участок), который условно можно обозначить как полиморфизм последовательностей фрагментов ДНК, в данном случае - полиморфизм последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК (ППАФ).

На втором этапе проводят очистку амплифицированных фрагментов от компонентов реакционной смеси, после чего их вводят в качестве субстрата в так называемые секвенирующие реакции (то есть химические реакции, посредством которых происходит расшифровка первичной структуры олигонуклеотидов). По окончании реакции терминированные продукты секвенирующих реакций фракционируют под действием высоконапряженного электрического поля в денатурирующих условиях в полиакриламидной или аналогичной гелевой среде по принципу "молекулярного сита".

На третьем этапе проводят сравнительный анализ расшифрованных нуклеотидных последовательностей мтДНК, характеризующих объекты экспертизы. Для этого по определенным правилам сопоставляют полученные индивидуальные профили полиморфизма анализируемых фрагментов ДНК с целью их отождествления или выявления сходства и различий и установления на этом основании определенных фактов, которые могут иметь доказательственное значение по делу.

2. Материально-техническое обеспечение метода.

2.1. Требования к помещениям.

Судебно-медицинская экспертиза вещественных доказательств с помощью применения индивидуализирующих систем ППАФ-типа, основанных на анализе мтДНК, должна проводиться только в специализированной лаборатории бюро судебно-медицинской экспертизы. Необходимым условием является соответствие материально-технической базы и состояния лабораторных помещений следующим специальным нормам и техническим требованиям.

Главным требованием является обеспечение и строгое соблюдение принципа компартиментализации основных стадий производственного процесса. Это означает, что в лаборатории должны быть выделены территориально автономные операционные зоны (компарменты), каждая из которых предназначена для выполнения строго определенного

круга операций. Каждая зона должна быть укомплектована спецодеждой, лабораторным и офисным оборудованием, посудой, которые предназначены для использования только в границах данной зоны. Таких зон минимум четыре:

- лабораторная зона общего назначения: помещения для хранения и препарирования вещественных доказательств, забора крови, выделения и очистки ДНК, мойки и стерилизации посуды; к этой зоне относятся кабинеты экспертов, лаборантские и санитарские помещения, компьютерный зал для обработки данных и оформления документов, аппаратные;
- чистая зона ПЦР: стерильные, оборудованные УФ-облучателями боксированные помещения с приточно-нагнетательной вентиляцией - для приготовления реагентов, компонентов реакционных смесей, для пробоподготовки и постановки ПЦР;
- зона для анализа и очистки продуктов амплификации: оборудованные УФ-облучателями и моечной арматурой боксированные помещения с вытяжной вентиляцией - для проведения электрофореза ДНК, окрашивания гелей, элюции и преципитации ДНК, документирования электрофореграмм.
- Зона «е» должна иметь выделенный компармент (или лучше, если это отдельная зона) для постановки секвенирующих реакций, очистки продуктов секвенирующих реакций и пробоподготовки для секвенирующего электрофореза

Компартиментализация рабочего процесса, связанного с применением ПЦР, служит абсолютно необходимой мерой предосторожности, которая позволяет свести к минимуму риск случайных загрязнений компонентов реакции ранее амплифицированными продуктами или молекулами ДНК из посторонних источников. Способность ПЦР амплифицировать единичные молекулы ДНК означает, что опасность представляют даже самые незначительные, следовые количества ДНК-контаминатов, которые могут вовлекаться в реакцию как матричные молекулы. Это приводит к искажению результатов исследования.

2.2. Необходимое оборудование.

В соответствии с процедурой метода, на первом этапе осуществляется выделение из исследуемых объектов суммарной геномной ДНК, ее очистка, определение концентрации и хранение. Для этого необходимо стандартное лабораторное оборудование для молекулярной биологии: вытяжной шкаф, мини- и микроцентрифуга, термостат, pH-метр, ультрадиализатор-деионизатор, спектрофотометр или флуориметр, прецизионные весы, микродозаторы автоматические, стеклянная и пластиковая лабораторная посуда, холодильники/морозильники.

Постановка ПЦР требует наличия специального стерильного шкафа-бокса с ультрафиолетовым облучателем, а также ДНК-амплификатора (все позиции выпускаются серийно).

Для электрофоретического фракционирования ДНК необходимы аппараты для электрофореза в гелях агарозы и полиакриламида (соответственно, горизонтальные и вертикальные), печь СВЧ, источники постоянного тока для электрофореза - низковольтный (300в) и высоковольтный (1000в), УФ-трансиллюминатор, снабженный документальной фотокамерой, прибор для вакуумной сушки гелей.

Анализ результатов электрофореза требует наличия фото- или компьютерной системы видеодокументирования и обработки экспертных данных, а также набора стандартной офисной оргтехники (компьютеры, принтеры, сканер и проч.).

Постановка секвенирующих реакций требует наличия стерильного шкафа-бокса с ультрафиолетовым облучателем, а также ДНК-амплификатора; очистка продуктов секвенирующих реакций и пробоподготовка для секвенирующего электрофореза требует

стандартного оснащения: микроцентрифуга, микротермостат, микродозаторы автоматические, стеклянная и пластиковая лабораторная посуда, холодильник/морозильник.

Детекция и анализ фрагментов ДНК - продуктов секвенирующих реакций, выполненных в формате наиболее современных - флуоресцентных - технологий, требует наличия автоматического флуоресцентного секвенатора ДНК - аппаратно-программной системы, который позволяет в автоматическом режиме и с высокой точностью разделять флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК на основе различий в их электрофоретических свойствах, регистрировать и обрабатывать данные с использованием встроенных программных средств, что обеспечивает полную расшифровку нуклеотидной последовательности анализируемого фрагмента ДНК. В качестве примера можно указать модели ДНК-секвенаторов ABI 373 и ABI 373A фирмы Applied Biosystems (США), которые по сути открыли и развили это высокотехнологическое направление, и более новые, серийно выпускаемые в настоящее время модели ABI 377 PRIZM или ABI 31, PRIZM фирмы ABI/PE Biosystems (США), а также использующие несколько другую реагентную базу модели фирмы Amersham-Pharmacia (США-Швеция) или другие аналоги.

ДНК-секвенатор должен обеспечивать получение надежных, воспроизводимых и предельно высокой степени разрешения (1 нуклеотид) данных, а программное обеспечение - их обработку, архивирование, и хранение как для целей анализа продуктов секвенирующих реакций, так и фрагментного анализа.

3. Технология использования метода.

3.1. Получение препаратов ДНК.

Предметом судебно-медицинских молекулярно-генетических экспертных исследований являются следы и иные вещественные доказательства по делу - объекты биологического происхождения от трупов и живых лиц. Митохондриальная ДНК содержится во всех клетках организма, поэтому для экспертного исследования в принципе пригодны любые биологические субстраты, в которых сохранились хотя бы единичные ядерные клетки или остатки их цитоплазматического материала: мягкие ткани, жидкая кровь и выделения, высохшие следы крови и выделений, зубы и волосы человека, отчужденные части тела и фрагменты частей тела от неопознанных и расчлененных трупов, фрагменты скелетированных трупов, отдельные кости, костные фрагменты, и др. Поскольку (с определенными оговорками) можно считать, что во всех клетках одного организма митохондриальная ДНК в норме одинакова, это позволяет (с учетом определенных нюансов - см. ниже) проводить отождествление объектов на основании сравнительного ППДФ-анализа биологических образцов разного тканевого происхождения.

С точки зрения экспертного использования, среди множества известных методик выделения и очистки ДНК наибольшее значение имеет классическая фенол-хлороформная экстракция, которая универсальна, обладает хорошей воспроизводимостью и способна обеспечить высокую степень чистоты ДНК; полученные этим методом препараты стабильны и могут храниться при +4°C в течение нескольких месяцев. Поэтому методикам выделения ДНК, основанным на органической экстракции следует отдать предпочтение.

В общем случае, это многоступенчатые процедуры, которые предусматривают разрушение (лизис) клеточных структур и диссоциацию хромосомных нуклеопротеидных комплексов с помощью применения детергентов, протеазную обработку лизата, экстрагирование белков органическими растворителями, отделение водной фазы, содержащей ДНК, и концентрирование и очистку ДНК путем спиртовой преципитации или ультрамикрофильтрации.

Существуют также методики, которые без применения органических растворителей позволяют получать пригодные для использования в ПЦР препараты ДНК. Наиболее распространенным универсальным неорганическим методом, пригодным для экспертного применения является метод с использованием хелатирующего реагента "Килекс" (Chelex[®] 100). Это экспресс-метод, который вообще не предполагает выделения ДНК в очищенном виде; получаемый препарат по сути представляет клеточный лизат, который содержит все исходные компоненты, только в инактивированной форме. Этот метод прост и не требует много времени. Нужно однако учитывать, что его надежность, а также качество и стабильность "килексных" препаратов в целом заметно ниже, чем фенол-хлороформных экстрактов.

ПРИМЕЧАНИЕ. Принципиально важное замечание по поводу получения препаратов ДНК для целей типирования ППДФ мтДНК заключается в том, что здесь, в отличие от систем на основе ПДФ хромосомной ДНК, оказывается неприменим метод селективного выделения ДНК сперматозоидов из смешанных следов, содержащих сперму (см. [Иванов П.Л. "Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства." Методические указания. Минздрав РФ, 1999 г.]. Таким методом можно изолировать только ядерную (хромосомную) ДНК сперматозоидов, но невозможно избирательно выделить их цитоплазматические ДНК-компоненты, к которым относится мтДНК.

3.2. ПЦР-амплификация полиморфных локусов ГВС 1 и ГВС 2 на матрице митохондриальной ДНК.

При постановке ПЦР суммарную клеточную ДНК, обычно в количестве 0.5-50 нг, вводят в реакционную смесь, содержащую все необходимые компоненты для работы фермента - термостабильной ДНК-полимеразы (обычно, Taq полимеразы в количестве 1-3 е.а.). Там молекулы мтДНК, присутствующие в препарате суммарной ДНК, будут служить субстратом-матрицей для амплификации нужных локусов. Специфическим компонентом реакции и амплификационной индивидуализирующей системы в целом являются олигонуклеотидные (15-30 звеньев) праймеры - именно они определяют какой генетический локус будет избирательно нарабатываться в ходе реакции. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез новых полинуклеотидных цепей с помощью ДНК-полимеразы осуществляется только между ними, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК. Для проведения полимеразной цепной реакции кроме исходного препарата ДНК, праймеров (в концентрации 0.1-1 мкМ), Taq полимеразы, нужны еще так называемые предшественники ДНК - дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дезоксинуклеотиды) в концентрации 200 мкМ и солевой буферный раствор. Эти компоненты смешивают в реакционной пробирке в микрообъеме (обычно, 25-50 мкл) и помещают в специальный прибор - программируемый термоциклер (ДНК-амплификатор), который обеспечивает необходимый температурный профиль реакции: она претерпевает 25 - 35 циклов нагрева и охлаждения в интервале температур от 50 до 95°C.

Параметры температурного профиля - продолжительность и температура каждой стадии полимеразной реакции зависят от структуры используемых праймеров и потому индивидуальны для каждой конкретной амплификационной индивидуализирующей системы.

Весь процесс длится несколько часов. За время процесса интересующие последовательности ДНК, присутствующие в исходной ДНК-матрице, многократно

(миллионкратно) копируются ферментом Taq полимеразой, и эти молекулярные копии накапливаются в реакционной смеси.

Аmplифицируемые в ходе ПЦР гипервариабельные участки (локусы) мтДНК - это два полиморфных района, условно называемых гипервариабельными сегментами 1 и 2 (*GBC1* и *GBC2*, англ.: *HVR-1* и *HVR-2*). Структурно эти участки представляют собой фрагменты кольцевой молекулы мтДНК, расположенные в области D-петли между позициями 16024-16365 и 73-340 (границы *GBC1* и *GBC2* в определенной степени условны; указаны наиболее широко распространенные обозначения).

Высокий уровень вариабельности (феномен гиперполиморфизма) здесь обусловлен тем, что у разных людей эти участки могут иметь разную первичную последовательность нуклеотидов. В популяции обнаруживается целый набор вариантов (митотипов), отличающихся друг от друга наличием точковых нуклеотидных замен, микроделений и микроинсерций. У каждого индивидуума в популяции имеется в норме только один такой вариант-митотип, который этот индивидуум унаследовал по своей материнской линии. (поэтому такого рода генетические элементы получили название трассирующих родословных маркеров). Как следствие, полинуклеотидные тракты *GBC1* и *GBC2* мтДНК обладают свойством индивидуальной специфичности. Это так называемый сайт-полиморфизм (от англ. "site" - участок), который условно можно обозначить как полиморфизм последовательностей фрагментов ДНК, в данном случае - полиморфизм последовательностей амплифицированных фрагментов ДНК (ППАФ).

3.3. Фрагментный анализ. Фракционирование продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза.

Гипервариабельные локусы мтДНК у разных людей имеют разную первичную последовательность нуклеотидов, но практически не отличаются по длине. При амплификации с праймерами, расположенными на флангах такого локуса, образуются фрагменты ДНК одинаковой длины, которые, в то же время, неодинаковы по своей первичной структуре.

Таким образом, в данной аналитической системе индивидуальные образцы мтДНК человека характеризуются наличием амплифицированных фрагментов одинаковой длины, которые могут отличаться отдельными заменами звеньев-нуклеотидов в тех или иных позициях полинуклеотидной цепи. Таких отличий-замен может быть до нескольких десятков, но обычно это 5-10 позиций.

Синтезированные в ходе ПЦР продукты - молекулярные копии полиморфных участков мтДНК накапливаются в реакционной смеси, вследствие чего количественно оказываются доступными для количественной и качественной оценки и последующего анализа. Для этого полученные амплификационные продукты фракционируют по длине с помощью электрофореза в геле агарозы и фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе реакции выявляют, используя различные методы детекции. Чаще всего на электрофореграмме визуализируют полосы (зоны локализации фрагментов ДНК одного размера) с помощью флуоресцентного красителя этидиумбромид и затем регистрируют фотографически в УФ свете.

Необходимо подчеркнуть, что в отличие от хромосомных гипервариабельных локусов ПДАФ-типа, индивидуальность митохондриальной ДНК на данном этапе никак не проявляется и потому так называемый амплификационный профиль ДНК не является в данном случае индивидуализирующей геномной характеристикой человека, которому принадлежит анализируемая мтДНК. Для целей отождествления амплифицированных фрагментов мтДНК или выявления в них признаков сходства и различий необходимо

установит их первичную структуру и провести сопоставление их нуклеотидных последовательностей.

3.4. Установление первичной структуры амплифицированных фрагментов мтДНК. 3.4.1. Очистка амплификационного продукта.

Если результаты фрагментного анализа, то есть аналитического электрофореза амплифицированных фрагментов мтДНК признаны удовлетворительными в количественном и качественном отношении, то тогда проводят очистку амплифицированных фрагментов от компонентов реакционной смеси. Это можно сделать с помощью применения стандартных молекулярно-биологических методов очистки нуклеиновых кислот от низкомолекулярных примесей - таких как гель-фильтрация, ультрамембранная фильтрация, методы избирательной адсорбции ДНК на твердых носителях или преципитации ДНК из солевых растворов и наконец, такой радикальный способ как препаративный гель-электрофорез и последующая элюция ДНК с помощью хаотропных агентов или - в случае использования легкоплавких агарозных сред - путем расплавления геля при температурах ниже температуры плавления одного из вышеперечисленных методов.

Важно отметить, что основная цель описанной процедуры - как можно более полное удаление праймеров, участвовавших в ПЦР-амплификации полиморфных локусов на матрице митохондриальной ДНК. Даже следовые количества посторонних праймеров в препарате могут сильно осложнить анализ и расшифровку его первичной структуры (секвенирование) если применяется методика циклического секвенирования с флуоресцентно мечеными терминаторами полинуклеотидной цепи (см. ниже).

ПРИМЕЧАНИЕ. Любые манипуляции с амплифицированными фрагментами ДНК и в частности, их очистку следует проводить в специально выделенной лабораторной зоне, которая как территориально, так и инвентарно строго отделена от зоны общего назначения (помещений для хранения и препарирования вещественных доказательств, забора крови, выделения и очистки ДНК, мойки и стерилизации посуды) и от чистой зоны, где осуществляется приготовление реагентов и компонентов реакционных смесей, пробоподготовка и постановка ПЦР. Эта мера позволяет свести к минимуму риск случайных загрязнений других препаратов ранее амплифицированными продуктами, которые могут оказаться предпочтительными матрицами для ПЦР и тем самым обусловить ложный результат типирования.

После того как очищенные амплифицированные фрагменты мтДНК получены в виде водного раствора, их можно хранить в течение 2-4 недель при -20°C . Для дальнейшего анализа ППАФ аликвоту такого раствора вводят в качестве субстрата в так называемые секвенирующие реакции (то есть химические реакции, посредством которых происходит расшифровка первичной структуры поли- и олигодезокси-нуклеотидов).

3.4.2. Постановка секвенирующих реакций.

Наиболее современный подход к проведению секвенирующих реакций, детекции и анализу фрагментов ДНК - продуктов секвенирующих реакций, основан на использовании праймеров, несущих на 5'-концах флуоресцентную метку или же предшественников ДНК - дезокси- и дидезокси-нуклеозидтрифосфатов (dNTPs/ddNTPs), которые связаны с флуоресцентной меткой. Для работы в этом формате применяют автоматизированные аппаратно-программные системы (секвенаторы ДНК), позволяющие в автоматическом

режиме разделять флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК на основе различий в их электрофоретических свойствах.

ПРИМЕЧАНИЕ. Использование других (нефлуоресцентных) форматов секвенирующих реакций и методов детекции модифицированных ДНК-продуктов как то: окрашивание нитратом серебра или введение в ДНК радионуклидных меток и последующая автордиография, предполагают применение так называемых технологий «ручного секвенирования». Методики «ручного секвенирования» требуют другого реактивного и аппаратного обеспечения. Эти методики в настоящем руководстве не рассматриваются – по той причине, что хотя они и находят применение в научно-исследовательских работах, однако они не могут быть рекомендованы для судебно-экспертных целей ввиду их нетехнологичности и недостаточной точности.

В судебно-экспертном ППАФ-анализе как правило используют наиболее высокочувствительный метод секвенирования – так называемое циклическое секвенирование с предшествующими-терминаторами полинуклеотидной цепи. Этот методический подход является одной из модификаций известного базового метода Сэнгера (F.Sanger). Его флуоресцентный формат основан на высокотехнологичных разработках фирмы ABI (Applied Biosystems, США). В настоящее время этой фирмой производятся высокостандартизованные наборы реагентов «*ABI Prism Rhodamin Sequencing kit*» или «*ABI Prism Big Dye Terminator Sequencing kit*», которые содержат все необходимые компоненты для постановки секвенирующих реакций, включая ключевые элементы реакционной смеси - высокоэффективную термостабильную ДНК-полимеразу *AmpliTag FS* и разные варианты флуоресцентно меченных дидезоксирибонуклеотидов-терминаторов (ddNTPs). При использовании наборов постановка секвенирующей реакции должна выполняться в строгом соответствии с протоколами фирмы-изготовителя. Эти протоколы весьма подробны: они доступны и поэтому в настоящем руководстве нет смысла их пересказывать. Поясним кратко лишь существо самого метода.

3.4.3. Циклическое секвенирование ДНК с использованием Таq полимеразы и флуоресцентно меченых терминаторов полинуклеотидной цепи.

В интересующем нас частном случае – при секвенировании последовательностей мтДНК, - в роли матричных молекул выступают очищенные амплифицированные фрагменты мтДНК, полученные на предыдущем этапе анализа и сохраняемые при -20°C . Для постановки секвенирующей реакции аликвоту такого раствора вводят в качестве субстрата в реакционную смесь, содержащую все вышеописанные необходимые компоненты.

Особенностью рекомендуемой флуоресцентной технологии Applied Biosystems является, во-первых, применение для мечения новосинтезируемой в секвенирующей реакции ДНК флуоресцентных красителей четырех разных специфичностей (по числу четырех «букв»-нуклеотидов), и во-вторых, использование для дотройки полинуклеотидной цепи высокоэффективной термостабильной Таq полимеразы. Все это позволяет провести реакционный процесс Сэнгера сразу для четырех специфичностей в одной пробирке, и вдобавок его многократно повторить на одной и той же матрице, используя циклический процесс, аналогичный ПЦР. Благодаря этим особенностям, в сочетании с автоматизированной обработкой данных, технология Applied Biosystems обеспечивает высокую эффективность, скорость и чувствительность анализа.

При постановке секвенирующей реакции с использованием набора реагентов «*ABI Prism Rhodamin Sequencing kit*» или «*ABI Prism Big Dye Terminator Sequencing kit*», очищенные амплифицированные фрагменты мтДНК в водном растворе, полученные на

предыдущем этапе анализа, обычно в количестве 2-5 нг, вводят в микрообъем (8 мкл) реакционной смеси, которая содержит все необходимые компоненты для циклической ДНК-полимеразной реакции. Эти молекулы мтДНК будут служить субстратом-матрицей для процесса Сэнгера – то есть ДНК-полимеразной реакции, протекающей в присутствии флуоресцентно меченных дидезоксирибонуклеотидов-терминаторов цепи (ddNTPs) при заданном балансе концентраций dNTPs и ddNTPs. Добавляемым (то есть отсутствующим в наборе) компонентом реакции является один олигонуклеотидный (15-30 звеньев) праймер, который определяет какая последовательность будет «читаться» в ходе секвенирующей реакции. Наличие только одного праймера отличает эту реакцию от стандартной ПЦР. (Напомним, что в ПЦР синтез новых полинуклеотидных цепей с помощью ДНК-полимеразы осуществляется только на участке между двумя праймерами, удваивая в каждом цикле количество копий этого участка ДНК. В случае же постановки полимеразной реакции «по Сэнгеру» в каждом цикле образуется только одна случайным образом абортированная копия секвенируемого фрагмента ДНК). Реакционную микропробирку помещают в программируемый термоциклер (ДНК-амплификатор), который обеспечивает необходимый температурный профиль реакции: она претерпевает 25 - 35 циклов нагрева и охлаждения в интервале температур от 50 до 95 $^{\circ}\text{C}$.

Параметры температурного профиля - продолжительность и температура каждой стадии полимеразной реакции зависят от структуры используемых праймеров и потому индивидуальны для каждой конкретной секвенирующей системы.

3.4.4. Электрофоретическое фракционирование терминированных олигонуклеотидов. Расшифровка первичной структуры мтДНК.

Описанный выше реакционный процесс длится несколько часов. За это время терминированные олигонуклеотиды, многократно скопированные с исходной ДНК-матрицы, накапливаются в реакционной смеси. Далее они подлежат очистке и электрофоретическому фракционированию по размеру для определения порядка расположения нуклеотида каждой из четырех специфичностей в составе анализируемой цепи ДНК.

При использовании стандартной процедуры секвенирования ДНК по методу Сэнгера, по окончании реакции терминированные продукты секвенирующих реакций фракционируют под действием высоконапряженного электрического поля в денатурирующих условиях в полиакриламидной среде по принципу «молекулярного сита». Для электрофоретического фракционирования флуоресцентно-меченных терминированных ДНК-продуктов применяют специальный прибор - автоматический флуоресцентный секвенатор ДНК.

Автоматический флуоресцентный секвенатор ДНК - это аппаратно-программная система, позволяющая в автоматическом режиме разделять флуоресцентно-меченные фрагменты ДНК на основе различий в их электрофоретических свойствах. Прибор обеспечивает получение надежных, воспроизводимых и предельно высокой степени разрешения (1 нуклеотид) данных, а также их обработку, архивирование, и хранение. Все процедуры высокостандартизованы. Регистрируемые данные обрабатываются с использованием встроенных программных средств, которые на выходе обеспечивают полную расшифровку нуклеотидной последовательности анализируемого фрагмента мтДНК в области *ГВС1* и/или *ГВС2*. Эта последовательность может быть записана в стандартном виде как последовательность однобуквенных символов IUPAC для соответствующих дезоксирибонуклеотидов: А; Т; Г; С (англ.: А; Т; G; С).

ПРИМЕЧАНИЕ. Работа на приборе требует обучения и приобретения комплекса специальных технических навыков. Обсуждение этих вопросов не входит в задачу данного руководства.

3.5. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК в объектах экспертизы.

3.5.1. Номенклатура митотипов.

Индивидуальность мтДНК реализуется в виде ее индивидуально-специфичной первичной структуры (последовательности нуклеотидов в составе полинуклеотидной цепи). Иными словами, полинуклеотидная цепь мтДНК у разных людей может иметь разную последовательность нуклеотидных звеньев. Каждый конкретный вариант нуклеотидной последовательности, установленный для данного полиморфного участка (локуса) молекулы мтДНК представляет собой так называемый *митотип*. Локальный митотип является в данном случае индивидуализирующей характеристикой человека, которому принадлежит анализируемая мтДНК. Для целей отождествления митотипов или выявления в них признаков сходства и различий проводят их сравнительный анализ.

По сложившейся и рекомендуемой практике, сравнение индивидуализирующих характеристик - митотипов - осуществляют не напрямую, а опосредованно, путем сопоставления каждой расшифрованной последовательности сначала с соответствующим участком последовательности нуклеотидов в так называемой *референтной последовательности* мтДНК, выполняющей функцию своеобразного эталона. За такую последовательность принят исторически первый полностью расшифрованный митотип, описанный в 1981 г. С.Андерсоном и соавт. [Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al.// Nature (1981), Vol. 290., P. 457-465], который получил наименование «*Кембриджская референтная последовательность*» или *CRS* (англ.: Cambridge Reference Sequence).

Сравнение анализируемого митотипа с *CRS* позволяет записать (зарегистрировать) этот митотип в универсальной, удобной для последующих сравнений форме, а именно - в виде таблицы позиционных отличий в нуклеотидной последовательности анализируемой мтДНК от *CRS*. Например запись: "ГВС 1: L 16126(Т→С), 16163(А→G); ГВС 2: L 73(А→G), 263(Т→С)" означает, что при сравнении L-цепи Кембриджской референтной последовательности и нуклеотидной последовательности локуса ГВС 1 и ГВС 2 молекулы мтДНК у данного индивидуума, в нуклеотидной последовательности мтДНК этого человека обнаружены указанные отличия. В приведенном примере это нуклеотидные замены типа *транзиции* в позициях 16126, 16163, 73 и 263. Митотип можно записать и в более короткой форме, указав только замещающие нуклеотиды: "ГВС 1: L 16126(С), 16163(G); ГВС 2: L 73(G), 263(С)".

Кроме точковых замен типа *транзиций* и (более редких) *трансверсий*, могут наблюдаться и другие варианты отличий. Это *делеции*, которые при записи митотипа обозначаются латинской буквой *d*: "L 16174d", и *инсерции*, которые принято обозначать добавлением к номеру предшествующей позиции порядкового числительного после точки: "L 309.1С". В последнем примере запись означает, что после нуклеотида с порядковым номером 309 в цепи исследованной мтДНК есть один «лишний», то есть отсутствующий в Кембриджской последовательности, нуклеотид С.

3.5.2. Сравнение установленных митотипов.

Как явствует из предыдущего раздела, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК в объектах экспертизы сводится к сравнительному анализу митотипов, установленных в этих объектах. Такой анализ включает сопоставление и

оценку различий или совпадения комплекса признаков-митотипов с целью разрешения вопросов, поставленных перед экспертизой.

Выше уже говорилось, что сравнение анализируемых митотипов начинают с сопоставления их с референтной последовательностью *CRS*. Иными словами, полученный результат как бы приводят к «общему знаменателю», то есть нормируют. Это позволяет записать (зарегистрировать) любой митотип в универсальной, удобной для последующих сравнений форме, а именно - в виде таблицы позиционных отличий в нуклеотидной последовательности анализируемой мтДНК от *CRS*. Затем эти нормированные данные, полученные для объектов анализа сравнивают между собой и определяют одинаковы или неодинаковы интересующие митотипы.

Понятно, что вопрос о том, одинаковы или неодинаковы митотипы (профили полиморфизма), в препаратах ДНК, выделенных из объектов экспертизы (скажем, из биологических следов на вещественных доказательствах и из крови проходящих по делу лиц) является в экспертизе ключевым. Это очевидно, поскольку от того, как будет интерпретирован результат сравнения, зависит экспертный вывод: в одном случае это неисключение, а в другом - исключение причастности данного лица к происхождению следов. Между тем, вопрос о сходстве или несходстве митотипов таит в себе определенные трудности, могущие привести к неверному выводу.

В общем случае одинаковость или неодинаковость митотипов устанавливают на основании совпадения или несовпадения характеризующих их позиционных отличий от *CRS*. Если совпадение 100%-ное, то вывод ясен - в объектах экспертизы установлен один и тот же комплекс признаков мтДНК (митотип) и значит можно переходить к оценке статистической значимости этого совпадения (см. ниже). Если есть множественные отличия (скажем, для двух ГВС - более трех точковых отличий), то здесь тоже все ясно: митотипы разные. Однако трудности могут представлять случаи, когда различия хотя и обнаруживаются, но не являются вполне однозначными.

3.5.3. Межтканевой полиморфизм мтДНК.

Одним из примеров может служить межтканевой полиморфизм мтДНК. Митохондриальная ДНК содержится во всех клетках организма, поэтому для экспертного исследования в принципе пригодны любые биологические субстраты, в которых сохранились хотя бы единичные ядерные клетки или остатки их цитоплазматического материала: мягкие ткани, жидкая кровь и выделения, высохшие следы крови и выделений, зубы и волосы человека, отчлененные части тела и фрагменты частей тела от неопознанных и расчлененных трупов, фрагменты скелетированных трупов, отдельные кости, костные фрагменты, и др. В целом можно считать, что во всех клетках одного организма митохондриальная ДНК в норме одинакова. Это в большинстве случаев позволяет проводить отождествление объектов на основании сравнительного ПШАФ-анализа биологических образцов разного тканевого происхождения. Тем не менее, в отдельных случаях могут наблюдаться единичные точковые отличия в нуклеотидных последовательностях мтДНК, выделенной из какой-нибудь одной ткани организма от других тканей.

Межтканевой полиморфизм - явление избирательное, то есть различия могут проявиться только в весьма ограниченном наборе тканей, тогда как во всех остальных тканях данного организма митотип будет одинаков. Поэтому при сомнительном результате следует провести типирование мтДНК в ряде контрольных образцов.

3.5.4. Явление гетероплазмы.

В ходе сравнительного анализа последовательностей мтДНК из скелетированных останков последней Российской императорской семьи, было показано [P.Gill, P.Ivanov et al. // Nature Genetics, (1994), N6, V.2, P. 130-135; P.Ivanov et.al // Nature Genetics, (1996) N12, V.6, P. 417-425], что митохондриальная ДНК одного из индивидуумов (императора Николая II) представлена двумя митотипами. При этом один тип молекул оказался полностью идентичен контрольным объектам сравнения, а именно прямым родственникам Николая II по линии его бабки - датской королевы Луизы Гессен-Кассель; другой же тип молекул отличался по одной (единственной) позиции. Это явилось первой экспериментальной демонстрацией так называемой гетероплазмической мутации в контрольном участке митохондриальной ДНК.

Феномен гетероплазмы заключается в том, что у одного индивидуума сосуществуют в различных пропорциях новый (мутантный) и старый ("нормальный") митотипы. Возможной интерпретацией этого феномена является наличие относительно короткоживущей фазы частично фиксированной мутации - собственно гетероплазмического переходного состояния - в процессе формирования нового митотипа.

Различают гетероплазмю точковую и гетероплазмю по длине.

Например, образцы мтДНК Николая II продемонстрировали точковую С/Т-гетероплазмю в позиции L 16169 (70%С, 30%Т). В мтДНК его брата Георгия Романова позиция L 16169 также оказалась гетероплазмической, однако обнаружила "обратное" соотношение С/Т - 40%С : 60%Т.

При секвенировании мтДНК гетероплазмические позиции могут дать неоднозначный результат. Поскольку в реакции участвуют два вида матриц, расшифровываемые последовательности нуклеотидов будут как бы накладываться друг на друга; там где они одинаковы, это наложение никак не проявится, однако в точке несовпадения разные «буквы» генетического кода будут выявляться одновременно. В графическом выражении это очень похоже на то, как если бы в машинописном тексте одна буква оказывалась напечатанной поверх другой.

Стоит отметить, что точковые гетероплазмы встречаются достаточно редко и носят единичный характер. Поэтому при появлении неоднозначных позиций при секвенировании мтДНК следует в первую очередь поставить контрольные тесты на индивидуальную чистоту препарата ДНК, поскольку гораздо более вероятно, чем гетероплазмия, смешение в анализируемом препарате ДНК от разных лиц. Чаще всего причиной такого результата становится случайное загрязнение (контаминация) компонентов реакции ранее амплифицированными продуктами или молекулами ДНК из посторонних источников. Способность ПЦР амплифицировать даже единичные молекулы ДНК означает, что даже самые незначительные, следовые количества ДНК-контаминантов могут вовлекаться в реакцию как матричные молекулы. Это и приводит к искажению результатов. По этой причине обязателен строгий мониторинг на всех стадиях исследования индивидуальной чистоты препаратов суммарной ДНК, получаемых из объектов экспертизы.

Гетероплазмия по длине - гораздо более обычное явление. Проявляется она в том, что часть молекул, амплифицированных в индивидуальном препарате ДНК, имеет одну длину, а другая часть оказывается чуть короче (в норме - всего на один-два нуклеотида) или длиннее. Особенность этого феномена в том, что как правило, он имеет место для вполне определенных позиций в цепи мтДНК - так называемых «горячих точек». В полинуклеотидных цепях ГВС 1 и ГВС 2 таких участков известно два: это области 16184-16193 и 303-315, которые содержат тракты поли-С. В этом случае расшифровываемые последовательности нуклеотидов будут также как и при точковой гетероплазмии

накладываться друг на друга, и пока они одинаковы, это наложение также никак не проявится, поскольку оно происходит «в фазе». Однако в области несовпадения между этими последовательностями возникнет фазовый сдвиг и их оставшиеся порции наложаться друг на друга уже со сдвигом. В графическом выражении это будет похоже на то, как если бы все буквы одного машинописного текста оказались напечатаны поверх букв другого текста. Такой текст прочитать очень трудно, а при сильно выраженной гетероплазмии - невозможно. Единственный способ преодолеть эту трудность - секвенировать интресующую последовательность с двух разных концов, используя в качестве матриц разные цепи ДНК.

3.6. Интерпретация результатов типирования мтДНК.

Описанная в настоящем руководстве технология судебно-экспертного типирования ПШАФ мтДНК, в отличие от ПДАФ-систем, основана на применении не близкородственных, а так называемых трассирующих родословных маркеров, наследуемых по материнской линии. Поэтому вопросы, поставленные на разрешение экспертизы, а также стратегия и тактика экспертного исследования и его смысловая нагрузка должны трактоваться строго в плоскости молекулярно-генетической верификации матрилинейного родства.

В этом плане достоверная нетождественность митотипов должна быть интерпретирована в общем случае как исключение происхождения сравниваемых биологических объектов от одной генетической линии и только если это обусловлено ситуационно - как исключение их происхождения от одного индивидуума.

При этом следует соблюдать следующее условие: несовпадение митотипов в исследуемых препаратах ДНК, как правило, имеет доказательственное исключющее значение только при том условии, что оно зарегистрировано в анализируемом полинуклеотидном тракте более чем в двух «нормальных» позициях. Несовпадения в потенциально гетероплазмических «горячих точках» не рассматриваются как доказательные. Это требование компенсирует возможность межканевого полиморфизма и гетероплазмических мутаций в мтДНК.

В свою очередь, достоверная тождественность митотипов не влечет безусловный вывод о происхождении сравниваемых биологических объектов от одной генетической линии и тем более, от одного индивидуума. Здесь строго обязательна вероятностная оценка идентичности генетического происхождения объектов экспертизы при условии зарегистрированного совпадения их митотипов. Это требование диктуется необходимостью принимать во внимание возможность случайного совпадения индивидуализирующих признаков у разных лиц.

Действительно, совпадение митотипов в препаратах ДНК, полученных из биологических следов с места преступления и в ДНК подозреваемого, или же идентичность митотипов в препаратах ДНК предполагаемых матрилинейных родственников еще не означает, что у этих мтДНК общее происхождение. Иначе говоря, сам по себе факт митотипического совпадения не обязательно влечет за собой вывод о том, что (в зависимости от формулы экспертного задания) следы произошли именно от этого человека или его матрилинейного родственника, или же что тестируемые индивидуумы относятся к одной генетической линии. Следы могли произойти и от другого неродственного индивидуума, который неотличим по исследованным генетическим признакам от первого. Точно так же, в экспертизе родства факт совпадения митотипов еще не означает доказанной принадлежности к одной генетической линии, ибо неродственные люди в принципе могут иметь один и тот же митотип.

Это объясняется тем, что как бы ни высока была индивидуализирующая значимость анализируемых признаков-митотипов, она не абсолютна. По сути, эти признаки являются группоспецифическими, то есть каждый митотип в той или иной степени распространен в популяции. Поэтому после того как в ходе экспертизы установлен факт совпадения митотипов, характеризующих объекты экспертизы, перед экспертом встает последний и самый важный вопрос:

- Если митотипы двух препаратов ДНК совпадают, то какова вероятность того, что объекты экспертизы принадлежат к одной [материнской] генетической линии, или (только если этот вопрос ситуационно обусловлен) - произошли от одного человека?

Для того чтобы ответить на этот ключевой вопрос и, тем самым, решить экспертную задачу, необходимо прояснить два момента.

Во-первых, необходимо оценить индивидуализирующее значение выявленного комплекса признаков, то есть количественно определить насколько полученные в ходе исследования генетические признаки позволяют отграничить исследованный объект экспертизы от любого другого, ему подобного. Это так называемая раздельная оценка установленных признаков-митотипов.

Во-вторых, нужно правильно выбрать алгоритм расчета вероятности для оценки идентификационной значимости результатов экспертизы. Это - анализ совокупности экспертных данных с целью разрешения вопросов, поставленных перед экспертизой.

3.6.1. Оценка индивидуализирующего значения установленных признаков-митотипов.

В качестве индивидуализирующего признака, имеющего идентификационное значение выступает целиком митотип.

Для того, чтобы определить индивидуализирующее значение установленного митотипа нужно определить его распространенность в популяции. Исходным параметром популяционных выкладок, касающихся оценки распространенности признака служит величина, называемая вероятностью признака. В нашем случае это - вероятность митотипа, которую можно обозначить символом (p). По определению эта величина равна отношению числа митотипов данной специфичности к общему числу митотипов в наблюдаемой выборке. Величину (p) называют также частотой митотипа. Ее определяют эмпирически - на основании результатов популяционных исследований.

Из этого следует, что величина (p) служит параметром, который определяет шансы любого (случайного) человека, имеющего данный митотип, считаться отпрыском именно конкретной интересующей генетической линии, которая характеризуется точно таким же же митотипом.

3.6.2. Вычисление вероятности генетической идентичности объектов экспертизы.

Расчет вероятности для оценки идентификационной значимости результатов экспертизы основывается на вычислении математической величины, называемой отношением правдоподобия (англ.: *LR, Likelihood Ratio*). Это позволяет ответить на вопрос:

- во сколько раз более вероятно, что выявленные в ходе анализа индивидуализирующие признаки совпадают закономерно, например, когда исследуемые образцы ДНК относятся к одной материнской генетической линии (вариант - произошли от одного человека), а не случайно - то есть, когда они

принадлежат к двум разным генетическим линиям (или двум неродственным членам популяции).

В количественном выражении:

$$LR = 1/p$$

Однако, строго говоря, вычисление LR не дает ответа на главный вопрос, призванный количественно охарактеризовать доказательственное значение экспертизы, а именно:

- если совпадение признаков установлено, то какова вероятность того, что это совпадение закономерно, а не произошло по воле случайности?

Ответить на этот вопрос можно, используя формулу вычисления условной вероятности, выведенную Байесом (Bayes). Общий смысл этой формулы в том, что зная так называемую априорную ("до опыта") вероятность интересующего нас некоего события, (например, происхождения ДНК от этого, или же от другого человека) мы можем определить величину постериорной ("после опыта") вероятности этого же события при условии, что уже произошло другое событие, имеющее определенное отношение к первому (например, митотип идентифицирующего объекта и митотип идентифицируемого человека совпали).

Априорную вероятность в общем случае принято считать равной 0.5. (Надо подчеркнуть, что хотя эта величина и не является бесспорной, изменение оценки априорной вероятности не входит в компетенцию эксперта и является прерогативой суда). Можно показать, что подставляя это и другие соответствующие рассматриваемому случаю значения величин в формулу Байеса, мы получим выражение, определяющее конечную постериорную вероятность того, что при наблюдаемом совпадении митотипов исследованные образцы мтДНК имеют генетически общее происхождение. Эту байесову вероятность генетической общности происхождения объектов типирования можно обозначить буквой P .

В количественном выражении:

$$P = 1/(1 + LR)$$

Эту вероятность можно выразить в процентах: $P \times 100 = \%$.

ПРИМЕЧАНИЕ. Строго говоря, подобный расчет приемлем только в том случае, если общность происхождения генетического материала в объектах экспертизы не исключается другими методами.

3.7. Эффективность использования метода и показания к применению.

С точки зрения задач судебно-медицинской экспертизы использование анализа ПШАФ мтДНК эффективно в двух случаях: это идентификация личности и установление биологического родства. Речь может идти об идентификационных исследованиях при расследовании убийств, тяжких телесных повреждений, изнасилований и других преступлений против личности, требующих судебно-медицинского исследования вещественных доказательств, а также при опознании расчлененных, сильно деформированных, обгоревших трупов - в случае массовых катастроф, взрывов, землетрясений и военных конфликтов.

Особая ценность данного методического подхода обусловлена тем обстоятельством, что в перечисленных случаях для экспертизы могут быть недоступны идентифицирующие объекты, которые позволили бы прямо установить индивидуализирующие признаки

погибших на уровне их хромосомной ДНК. Поэтому остается только возможность непрямой идентификации, например, путем использования в качестве идентифицирующих объектов биологических образцов от родственников устанавливаемых лиц. Однако, в этих условиях решение судебно-медицинской задачи идентификации с помощью только стандартного молекулярно-генетического анализа хромосомных маркеров представляет серьезные трудности, поскольку речь может идти о достаточно отдаленном родстве или о более вариантных принципах наследования ядерных генов-признаков. По этой причине, как было показано ранее П.Ивановым и сотр. [P.L.Ivanov et al.//Fingerprint News (Cambridge, UK), 1992, vol.4(3), P.11-15.], во всех этих случаях – когда генетическая дистанция, разделяющая родственников по вертикали, превышает одно поколение, или в случае горизонтальных схем, - верификация родственных связей с помощью анализа одной лишь хромосомной ДНК оказывается проблематичной.

Между тем, описанная в настоящем руководстве технология типирования ППАФ мтДНК является по существу методом молекулярно-генетической верификации родственных связей с помощью применения не близкородственных, а так называемых трассирующих родословных маркеров. Именно поэтому в описанных сложных случаях оказывается выше специфичность признака-маркера, а значит, и его избирательность, то есть способность выделять конкретный объект среди других, даже сходных по другим признакам.

В целом, идентификационная значимость признаков, определяемых на уровне мтДНК достаточно высока, и использование этой индивидуализирующей системы в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства потенциально обеспечивает высокий уровень доказательности.