

**Молекулярные технологии и идентификация личности. Различные области приложения и методы.**

**Корсакова И.И.**

## Общие положения

**Личность** - это человек, носитель индивидуальных биологических и психических свойств, социальный и юридический статус которого зарегистрирован в документах.

**Идентификация личности** - установление тождества неизвестного человека с разыскиваемым.

В настоящее время – время военных действий, террористических актов, природных катаклизмов и техногенных катастроф, сопровождающихся возникновением массовых жертв, важнейшим направлением в изучении человека является его идентификация.

На данном этапе развития науки об идентификации вместе с совершенствованием организации и технологии процесса отождествления одним из важнейших вопросов является разработка новых прогрессивных методов, с помощью которых результаты отождествления становятся 100 % точными.

Актуальность данной проблемы обусловлена и тем, что в России по данным МВД ежегодно регистрируются десятки тысяч трупов неизвестных лиц. Установление личности погибших в значительной мере затруднено из-за изменения их внешнего вида под действием различных повреждающих факторов. Поэтому разработка новых и усовершенствование уже имеющихся методов идентификации является чрезвычайно важной стратегической задачей.

# Общие положения

## Биометрические параметры

### Статические

Отпечаток пальца



Форма кисти



Рисунок вен руки



Радужная оболочка глаз



Форма лица

ДНК



### Динамические

Почерк

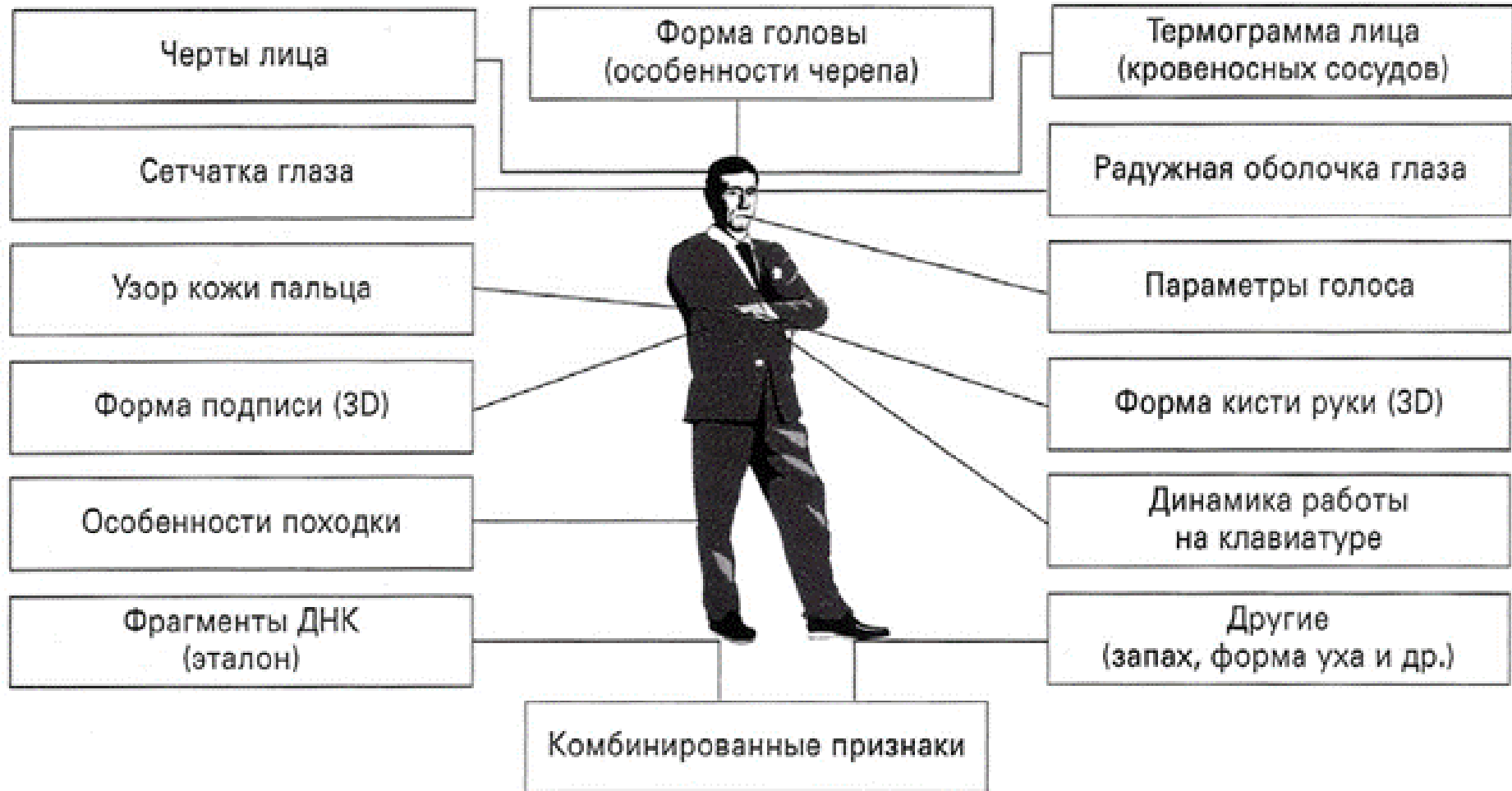


Походка



Голос

# Общие положения



## **Общие положения**

**Использование достижений молекулярной генетики привело к значительному повышению уровня идентификационных возможностей. Расшифровка ДНК в 1953 году стала поворотным событием в истории человечества, когда ученые получили сильное орудие для установления родства и идентификации человека по следам биологического происхождения.**

**С того времени ДНК-диагностика прочно укрепила свои позиции в медицинской и судебной практике и открывает перед человеком новые и перспективные возможности. Так, при идентификации жертв взрыва в Московском метрополитене 6 февраля 2004 года и цунами, произошедшего в Тайланде в декабре того же года, центральное место в системе экспертных действий по идентификации большого количества погибших заняли молекулярно-генетические методы исследования, обеспечившие выполнение высокодоказательной экспертизы.**

## История вопроса

**В 1985 г. в июльском номере журнала «Nature» появилась статья профессора Лестерского университета в Англии А. Джеффриса «Индивидуально-специфичные «отпечатки пальцев» ДНК человека». В декабре того же года А. Джеффрис и П. Гилл из Алдермастонского экспертно-криминалистического центра МВД Великобритании опубликовали еще одну статью под названием «Судебно-экспертное использование «отпечатков пальцев» ДНК».**

**В этих ключевых работах впервые была продемонстрирована возможность использования анализа хромосомной ДНК человека для судебно-экспертной идентификации личности.**

**Так родилась геномная «дактилоскопия» - метод, который признан одним из самых выдающихся достижений XX столетия в области судебных наук.**

Сэр Алек Джеффрис, 1985



## История вопроса

**В нашей стране исследования по геномной дактилоскопии были начаты в 1987 г. в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта АН СССР, в лаборатории академика Г.П. Георгиева. Здесь в группе, руководимой доктором биологических наук А.П. Рысковым, был получен целый ряд приоритетных результатов и разработан первый отечественный метод мультилокусного типирования ДНК.**

**В декабре 1988 г. на базе Института молекулярной биологии и Бюро Главной судебно-медицинской экспертизы Минздрава России Ивановым П.Л. была проведена первая в нашей стране молекулярно-генетическая идентификационная экспертиза, позволившая изобличить особо опасного убийцу-маньяка. Тогда же была организована первая в СССР экспертная лаборатория молекулярно-генетической идентификации (ныне Отдел молекулярно-генетических научных и экспертных исследований Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России), которая освоила методы анализа биологических следов как объектов судебно-медицинской экспертизы с использованием технологии молекулярно-генетической индивидуализации человека. Ее успешная деятельность подтвердила необходимость активного внедрения молекулярно-генетических методов в практику судебно-медицинской службы России.**

# Генотипирование как вид судебно-медицинской экспертизы

Молекулярно-генетический идентификационный анализ, традиционно называемый **геномной (генетической) «дактилоскопией»** или **генотипированием (DNA profiling, DNA fingerprinting, DNA typing)**, направлен на выявление индивидуальных особенностей генетической конституции конкретного человека. Этот подход не имеет аналогов среди использовавшихся ранее методов судебно-экспертной идентификации личности.

Геномная или генетическая дактилоскопия - технология установления личности, основанная на анализе клеточной ДНК - универсального носителя наследственной информации.

Каждый человек, как и любой живой организм, имеет свой характеристический фенотип (то есть набор внешних и внутренних признаков и свойств), отличающий его от других ему подобных организмов. Отличия обусловлены уникальностью любого индивидуального генотипа - всего набора генов данного организма. Генетический же материал, заключенный в разных клетках и тканях одного индивидуума, в норме одинаков.



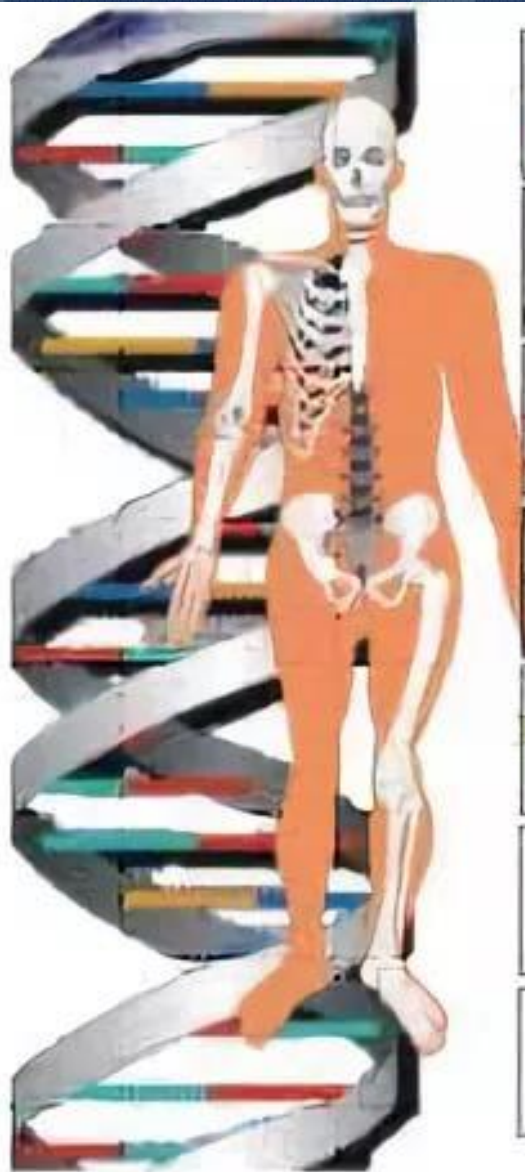
# Генотипирование как вид судебно-медицинской экспертизы

В основе **молекулярно-генетического метода идентификации личности и установления кровного родства** лежат следующие основополагающие принципы:

- 1) принцип индивидуальной генетической уникальности любого организма;
- 2) принцип генетической идентичности абсолютно всех его клеток и тканей;
- 3) принцип неизменности индивидуализирующих признаков в теле человека в течение всей его жизни.

К числу объектов генетического анализа относятся ткани и биологические жидкости.

# Биологический материал для идентификации личности



КРОВЬ



СЕМЯ



ТКАНЬ



ВОЛОСЫ  
(корни)



СЛЮНА



ЗУБЫ



КОСТИ



# Генотипирование как вид судебно-медицинской экспертизы

**Ключевой смысл анализа - выявление индивидуальных генетических различий или генетического сходства биологических объектов и, как следствие, установление их отличия или тождества либо их генетического родства.**

**На ранних этапах развития метода типирования ДНК или генетической идентификации конечный этап всей сложной многостадийной процедуры сводился к анализу специфических графических изображений, «отпечатков пальцев» наследственного материала человека. При этом основой для экспертного заключения чаще всего служило отображение индивидуальных характеристик ДНК в виде графического образа, а именно: специфического набора линий.**



**«Геномный оттиск» ДНК человека**

# Генотипирование как вид судебно-медицинской экспертизы

Молекулярно-генетический идентификационный анализ позволяет исследовать особые участки ДНК, строго специфичные для каждого индивидуума, и получить таким образом уникальный генетический «паспорт» или «удостоверение личности» человека, которое нельзя ни скрыть, ни изменить, ни подделать. Индивидуализирующие признаки, определяемые на уровне ДНК, характеризуются почти абсолютной устойчивостью, то есть сохраняются в организме человека неизменными всю его жизнь и неизменными отображаются в его биологических следах. Поэтому идентификационная значимость генетических признаков чрезвычайно высока.

Типирование ДНК стало наиболее доказательным методом анализа биологического материала при производстве судебно-медицинской идентификационной экспертизы. Эти технологии прочно вошли в арсенал экспертной деятельности судебно-медицинских служб большинства развитых стран мира. Опыт внедрения молекулярно-генетических методов в практику работы правоохранительных органов убедительно свидетельствует о том, что эффективность расследования многих тяжких преступлений против личности может быть существенно повышена.

# Генотипирование как вид судебно-медицинской экспертизы

Применительно к задачам судебно-медицинской экспертизы генетические методы особенно эффективны в двух случаях: идентификации личности и установления биологического родства.

В первую очередь, речь идет об **идентификации личности** при расследовании убийств, тяжких телесных повреждений, изнасилований и других преступлений, требующих судебно-медицинского исследования вещественных доказательств, а также при опознании расчлененных или сильно разрушенных трупов, например, в случаях массовых природных и техногенных катастроф и военных конфликтов.

Геномная «дактилоскопия», в отличие от традиционной криминалистической дактилоскопии, позволяет не только однозначно устанавливать личность, но и **определять кровное родство лиц**. Это делает ее незаменимым экспертным методом в сложных случаях подмены, утери, похищения детей, определения родства малолетних или потерявших память лиц, выявления фактов кровосмешения.

Метод также весьма эффективно используется и в решении гражданских дел - **установлении отцовства или материнства**. Возможно даже пренатальное исследование, позволяющее устанавливать отцовство в процессе беременности, то есть до рождения ребенка.

# Научные основы молекулярно-генетической идентификации личности

В криминалистике практические идентификационные исследования предполагают выявление и регистрацию таких признаков и свойств объекта, которые можно считать индивидуальными. В судебно-биологической идентификационной экспертизе в роли индивидуальных признаков человека традиционно выступали **биохимические маркеры**. К ним относятся некоторые антигенные характеристики крови и тканей организма, а также изоформы ряда ферментов, определяемые при изучении следов на вещественных доказательствах, выделений или тканей тела человека.

Индивидуализирующие возможности маркерных систем зависят от их полиморфности, от степени их вариабельности и количества вариантов в популяции. Чем эти величины больше, тем выше специфичность маркера, а значит, его способность выделять конкретный объект среди других, даже сходных по иным признакам.

У всех известных биохимических маркеров индивидуализирующий потенциал оказывается недостаточно высок для позитивной идентификации, отождествления объектов. Так, классические серологические маркеры - эритроцитарные антигены системы АВО - встречаются у каждого третьего или четвертого индивидуума, вероятность их случайного совпадения у разных людей достаточно велика.

# Научные основы молекулярно-генетической идентификации личности

Таким образом, биохимические маркеры являются группоспецифическими и потому отождествление если и возможно, то с использованием многих разных систем, каждая из которых, взятая изолированно, имеет лишь относительное значение. Это означает, что существующие методики классического биохимического и иммунологического анализа, на которых в значительной мере основано получение экспертных оценок при судебно-биологической идентификации личности, способны лишь исключить с достаточной степенью достоверности принадлежность исследуемого биологического материала конкретному лицу. Позитивная же идентификация почти всегда носит условный характер и ограничивается констатацией только групповой принадлежности биологических объектов.

Прогресс молекулярно-биологической науки открыл новые пути решения проблемы судебно-медицинской идентификации личности, обеспечив возможность выявления индивидуализирующих личность признаков на уровне не фенотипа, а генетической матрицы - клеточной ДНК.

# Научные основы молекулярно-генетической идентификации личности

**Молекулярно-генетические маркерные системы** основаны на существовании различий в структуре ДНК (генов) у разных индивидуумов.

Гомологичные гены, то есть те, что определяют формирование одного и того же признака, например, форму носа или цвет глаз, у разных людей могут находиться в разных аллельных состояниях. На молекулярном уровне аллельные варианты одного и того же гена отличаются небольшими изменениями в структуре их ДНК, в последовательности нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Возможны замена единичных нуклеотидов, так называемые точковые замены, или локальные перестройки, именуемые делециями и инсерциями - соответственно утрата либо добавление небольших участков цепи.

Столь незначительные различия в конечном итоге и определяют то, чем разные люди отличаются друг от друга: уникальное сочетание аллельных вариантов всех генов обеспечивает **биологическую индивидуальность** каждого человека.



# Научные основы молекулярно-генетической идентификации личности

Выявление этих различий как индивидуализирующих характеристик требует специальных методов и подходов, позволяющих работать непосредственно с молекулами ДНК и определять в них наличие дифференцирующих признаков.

Геном человека содержит десятки тысяч генов и состоит из более чем 3 млрд. нуклеотидных пар, при этом молекулы ДНК любых двух людей (не родственников) отличаются в среднем только одним нуклеотидом из каждых трехсот-четырехсот. Но даже такие отличия, как правило, носят характер случайных отклонений от некой доминирующей нормы. Теоретически это означает, что если у сотни человек проанализировать фрагмент ДНК длиной 300-400 нуклеотидов для одного и того же среднестатистического гена, то девяносто девять человек вполне могут оказаться неотличимыми друг от друга.

Практическое значение для целей генетической индивидуализации личности имеют не любые гены, а только такие, у которых много аллельных форм: **мультиаллельные гипервариабельные гены** (гипервариабельные генетические локусы). Индивидуализирующими характеристиками служат многочисленные структурные варианты таких локусов, которые в разных сочетаниях присутствуют в ДНК разных индивидуумов.

# Технологии молекулярно-генетической индивидуализации

**В судебно-экспертной практике базовыми молекулярно-генетическими технологиями признаны:**

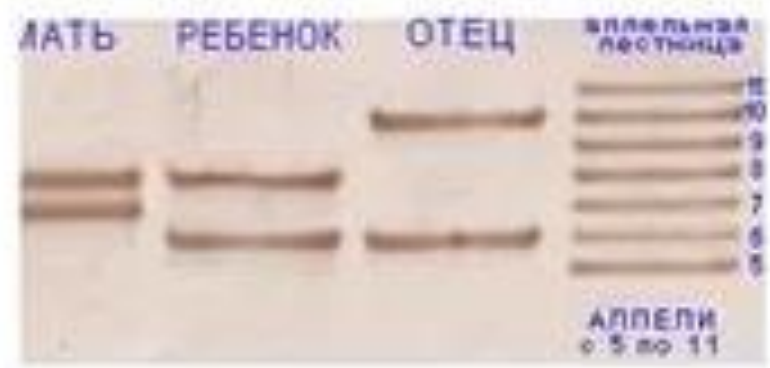
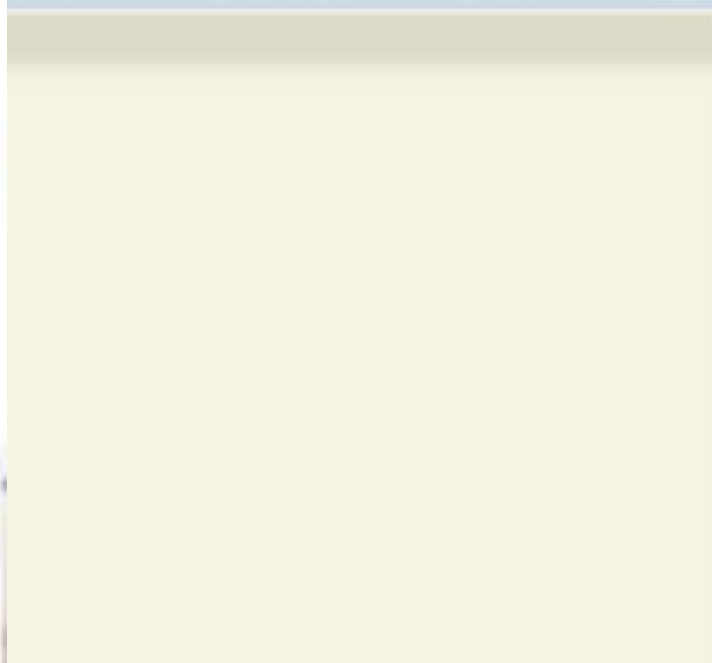
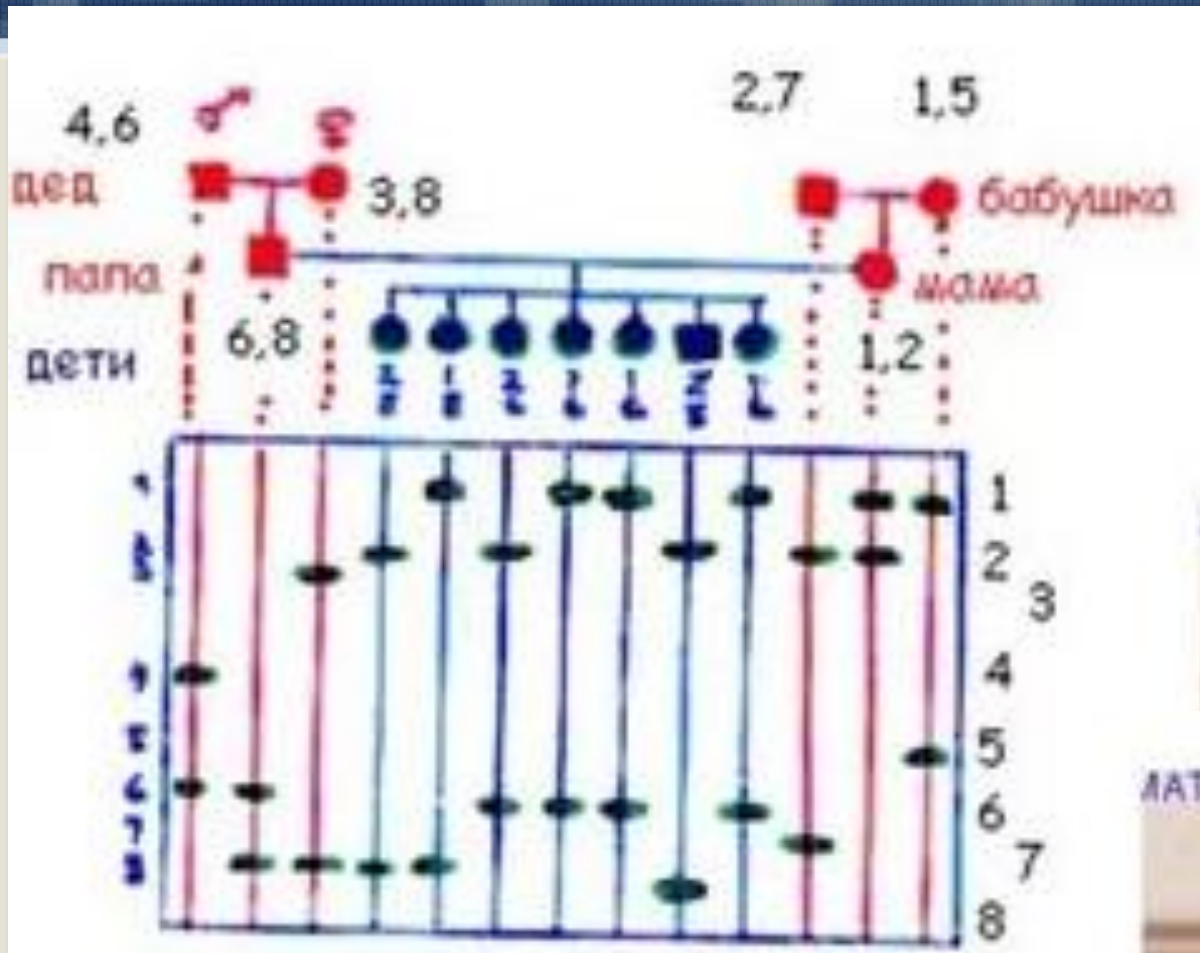
- **анализ полиморфизма (вариабельности) длины рестрикционных фрагментов ДНК;**
- **анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК;**
- **анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей (сайт-полиморфизма) ДНК.**

# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК

Большая часть вариаций в полинуклеотидной цепи геномной ДНК вызвана точечными нуклеотидными заменами и некоторыми другими вариантами реорганизации нуклеотидных последовательностей - инверсиями, делециями и инсерциями. В результате в молекулах ДНК появляются новые или утрачиваются существовавшие ранее участки воздействия (сайты) особых ферментов - рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз), в которых они расщепляют полинуклеотидные цепи ДНК. Это, в свою очередь, обуславливает изменение длины получающихся рестрикционных фрагментов ДНК.

Интересующие фрагменты ДНК можно визуализировать путем молекулярной гибридизации с соответствующим зондом; данный метод хорошо известен в молекулярной биологии нуклеиновых кислот как **блот-гибридизационный анализ**. С его помощью полиморфные участки генома обнаруживаются в виде имеющих разную длину гомологичных фрагментов ДНК, которые образуются после гидролиза геномной ДНК рестриктазами. Этот феномен получил название **полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ДНК**.

# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК



# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК

Индивидуальный полиморфизм длины рестрикционных фрагментов создает предпосылки для решения задач, связанных с индивидуализацией организма и установлением его биологических родственных связей с другими индивидуумами. Однако большинство полиморфных геномных локусов - потенциальных генетических маркеров - имеет только два варианта: дикий тип/мутация, то есть являются диморфными или диаллельными. Ценность диморфных маркеров невелика, потому что у многих людей может оказаться один и тот же вариант такого гена. Поэтому индивидуализирующее значение имеют только **гипервариабельные полиморфные фрагменты**.

Поскольку гипервариабельные локусы мультиаллельны, то информативность маркерных систем на их основе намного выше, чем информативность систем, базирующихся на единичных нуклеотидных заменах. Теоретически можно предполагать, что высокая локальная генетическая вариабельность вызвана не столько точечными нуклеотидными мутациями или микроделециями/инсерциями, сколько другими механизмами, приводящими к более существенной реорганизации геномных последовательностей: транспозициями, неравными или незаконными рекомбинациями, проскальзыванием репликативного комплекса и т.п. Как оказалось, такие локусы достаточно широко распространены в геноме человека.

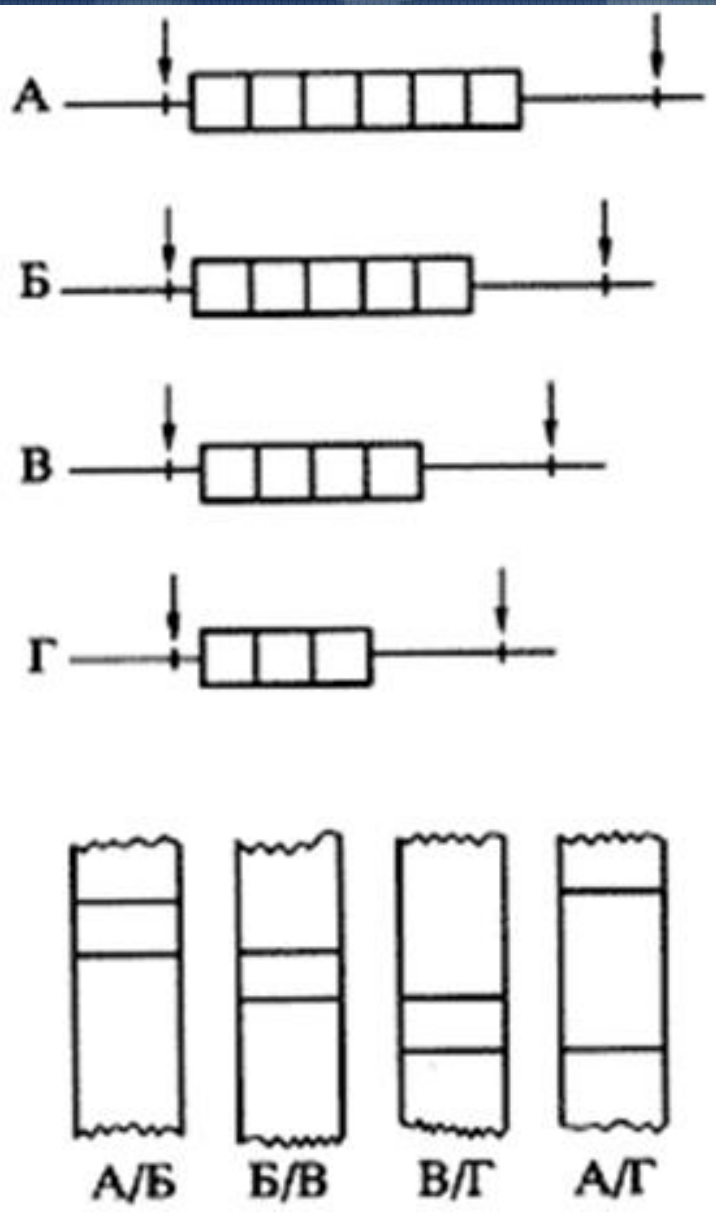
# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК

Наиболее примечательны из них «минисателлитные» ДНК - относительно короткие (10-60 нуклеотидных пар), рассеянные по геному, повторяющиеся нуклеотидные последовательности, имеющие тандемную организацию и демонстрирующие разную степень внутригрупповой гомологии. Число тандемных повторов в минисателлитных блоках (и следовательно, длина самих блоков) варьирует в широких пределах - от трех-четырех до нескольких тысяч; такие блоки представляют разные аллельные варианты мультиаллельных генетических локусов.

В 1987 г. И. Накамура предложил называть такого рода генетические элементы локусами с варьирующимся числом тандемных повторов или просто тандемными повторами с переменным числом звеньев (общепринятая английская аббревиатура **VNTR - Variable Number Tandem Repeat**).

Вариации числа повторяющихся элементов в VNTR-блоках как раз и обуславливают структурный полиморфизм этих локусов, проявляющийся в форме ПДРФ. Дело в том, что длина соответствующих рестрикционных фрагментов, если отсутствуют участки расщепления внутри самих повторов (из-за их достаточно простого нуклеотидного состава), зависит от числа повторяющихся единиц.

# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК



Последовательности ДНК с  
варьирующим числом тандемных  
повторов:

вверху - варианты таких локусов А, Б, В  
и Г различаются по длине на один  
повторяющийся сегмент, сайты  
рестрикции отмечены стрелками;

внизу - схематическая картина блот-  
гибридизации с молекулярным зондом,  
гомологичным тандемному повтору,  
некоторых гетерозиготных по данному  
локусу ДНК.

# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК

Наиболее значимое свойство **минисателлитов** - их существование в виде семейств, диспергированных по геному. Все локусы каждого семейства содержат наборы тандемных олигонуклеотидных последовательностей, объединяемых одним нуклеотидным «мотивом», или кор-последовательностью.

Таким образом, помимо мультиаллельности, то есть полиморфизма, обусловленного переменным числом повторяющихся элементов в самих локусах, минисателлитные маркеры характеризуются еще и **«системным» полиморфизмом** - возможностью одновременного выявления аллельных вариантов сразу нескольких (часто генетически не сцепленных между собой) локусов, представляющих одно семейство.

В результате информативность таких гиперполиморфных мультилокусных систем оказывается предельно высокой и достаточной для доказательной индивидуализации человека.



# **Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК**

**В настоящее время неизвестно общее число семейств гипервариабельных локусов в геноме человека, но, по-видимому, оно достаточно велико; каждое из них потенциально представляет собой мультилокусную гипервариабельную систему с очень высоким индивидуализирующим потенциалом.**

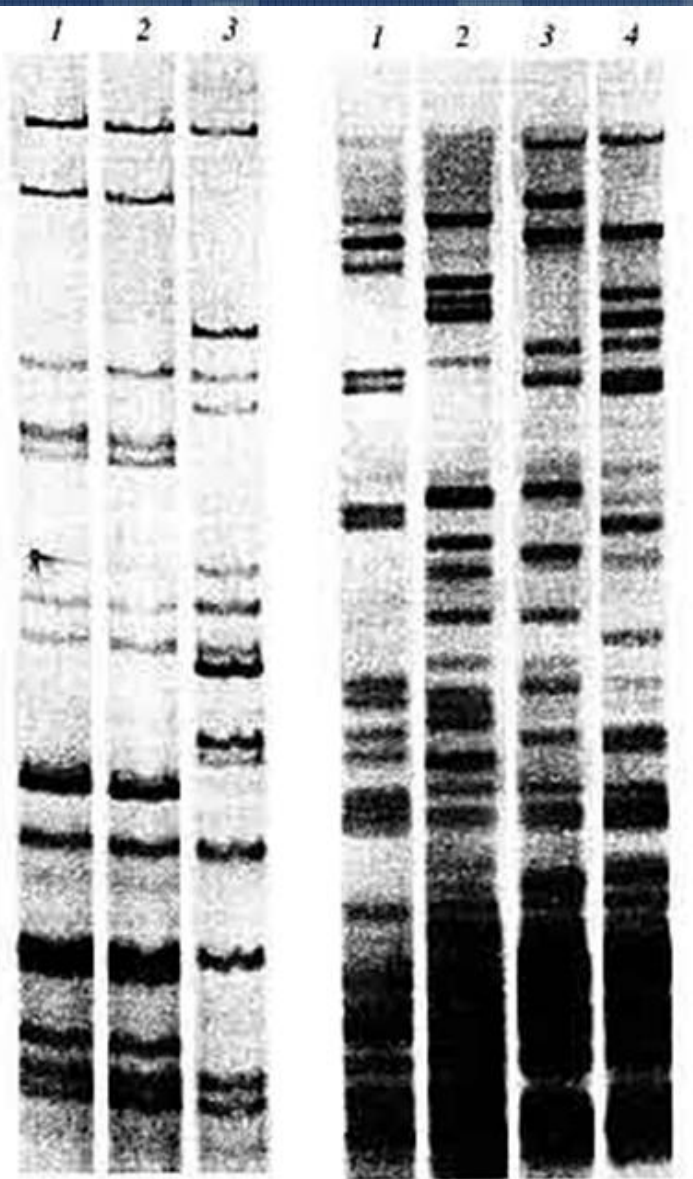
**Для реализации потенциала мультиаллельных ПДРФ-маркеров в середине 1980-х годов был разработан комплекс гибридизационных методик с использованием ДНК-зондов, позволяющих эффективно выявлять индивидуально-специфичные наборы аллельных вариантов гипервариабельных локусов в геноме человека.**

**Молекулярный зонд специфичен либо к индивидуальному локусу (монолокусная система), либо к целому семейству таких локусов (мультилокусная система).**

**Для выявления участков геномной ДНК, гомологичных зонду, используются радиоавтография, нерадиоактивные методы детекции, такие как флуоресцентная визуализация, хромогенные иммунохимические реакции и т.п.**

**На конечном этапе работы формируется оценочный графический образ: поперечно исчерченная чередующимися полосами дорожка.**

# Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК



Результаты идентификационной экспертизы, полученные с помощью меченного диоксигенином молекулярного зонда (САС) И. Эплена (слева): «Отпечатки», характеризующие препараты геномной ДНК, которые были получены из следов крови на одежде подозреваемого в убийстве (1) и из лимфоцитов крови погибшего (2), идентичны и в то же время отличаются от образца крови самого подозреваемого (3).

Геномные «отпечатки» четырех неродственных индивидуумов, полученные с использованием зонда M13 в качестве гибридизационной пробы для анализа рестриктазного гидролизата суммарной геномной ДНК человека: Для каждого индивидуума характерен свой, присущий только ему набор отличающихся по длине минисателлитных фрагментов, который при электрофоретическом анализе выявляется как индивидуально- специфичная нерегулярная «лестница» из поперечных полос, большая часть которых у не родственников не совпадает. У близких родственников число совпадений полос может быть существенно больше.

# Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК

**Метод энзиматической амплификации гипервариабельных генетических локусов** с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет преодолеть все ограничения молекулярно-генетических методов исследования, которые были связаны с недостаточным для анализа количеством ДНК.

ПЦР дает возможность выделить и размножить любую необходимую для анализа последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в десятки и даже сотни миллионов раз. Такая высокая степень направленного обогащения теоретически позволяет работать с единичными молекулами ДНК, следовательно, открывается возможность молекулярно-генетического типирования даже в случае исчезающе малых количеств доступного для экспертизы биологического материала. Действительно, еще в 1986 г. Джеффрис экспериментально доказал, что с помощью ПЦР реальной становится задача геномной идентификации на уровне нескольких или даже одной клетки. Кроме того, ПЦР весьма эффективна при анализе сильно разрушенных ДНК, подвергшихся высокой степени деградации.

# Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК

Гипервариабельные локусы VNTR-типа содержат различное число повторяющихся элементарных звеньев. При амплификации с праймерами, расположенными по краям такого локуса, образуются фрагменты ДНК различной длины, причем длина фрагмента будет пропорциональна числу повторов.

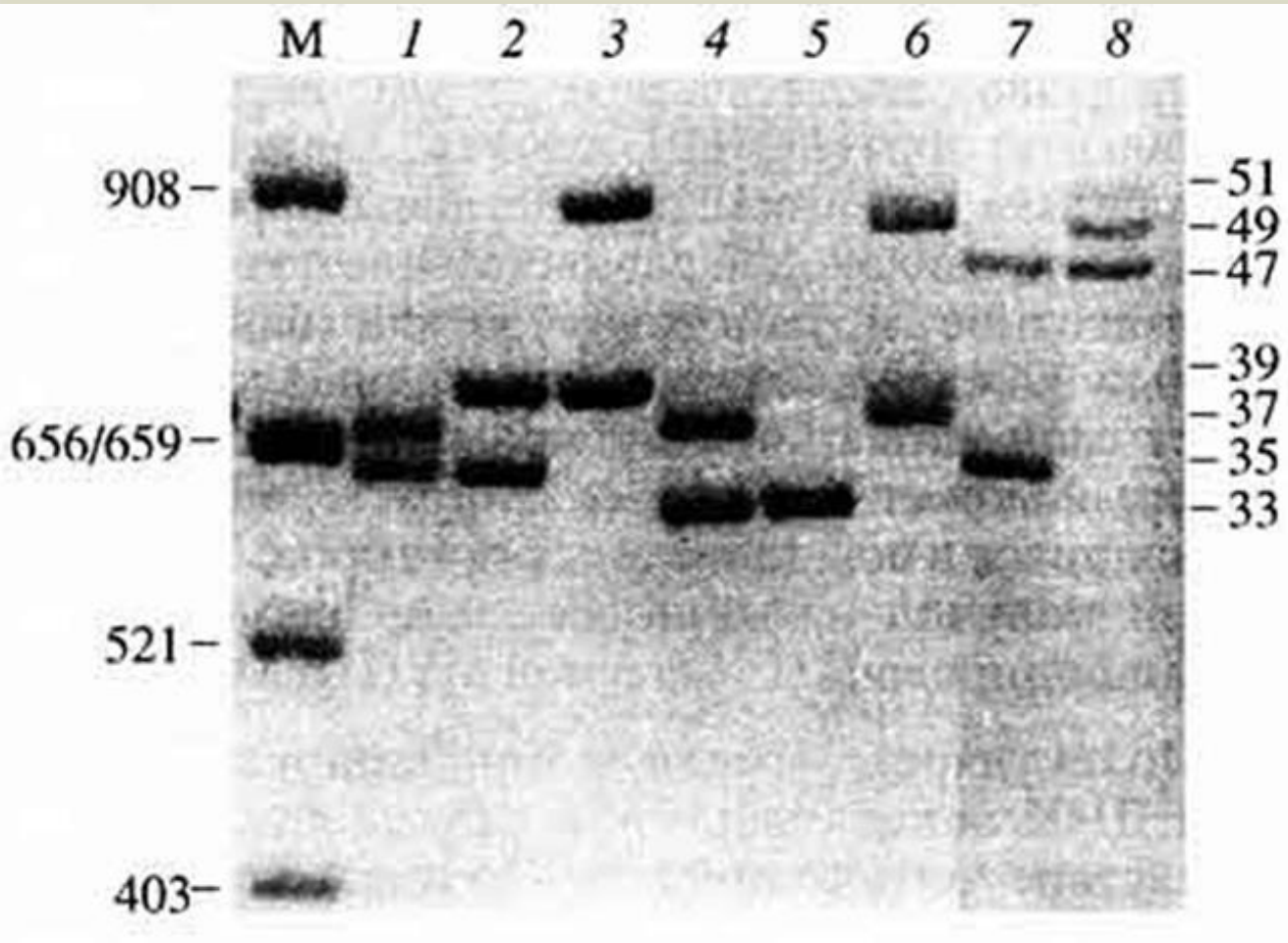
Таким образом, в данной аналитической системе любой индивидуальный образец ДНК человека характеризуется наличием двух амплифицированных фрагментов разной или одинаковой длины (соответственно, гетерозиготное и гомозиготное состояние), поскольку каждая из двух гомологичных хромосом несет свой вариант гипервариабельного локуса, который может отличаться от других числом содержащихся в нем тандемных повторов. Этот феномен получил название **полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК**.

# **Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК**

**Молекулярные копии амплифицируемого локуса ДНК накапливаются в реакционной смеси, вследствие чего количественно оказываются доступными для сравнительного анализа. Далее полученные амплификационные продукты фракционируют с помощью электрофореза в геле агарозы или полиакриламида, фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе реакции, выявляют, используя различные методы детекции.**

**Собственно идентификационный анализ ПДАФ хромосомной ДНК в целом аналогичен монолокусному анализу ПДРФ: полиморфные по длине фрагменты, представляющие разные аллельные варианты гипервариабельных локусов, выступают в качестве индивидуализирующих личность признаков. Они регистрируются в виде индивидуально-специфичного набора из двух полиморфных фрагментов (две полосы на электрофореграмме), характеризующихся определенным расположением на дорожке геля. Этот так называемый амплификационный профиль ДНК и является индивидуализирующей геномной характеристикой человека, которому принадлежит анализируемая ДНК.**

# Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК



Электрофореграмма  
(окрашивание  
серебром)  
амплифицированных  
фрагментов ДНК -  
аллелей  
хромосомного локуса  
AroB-3'VNTR (2p24-  
p23) восьми  
неродственных  
индивидуумов.

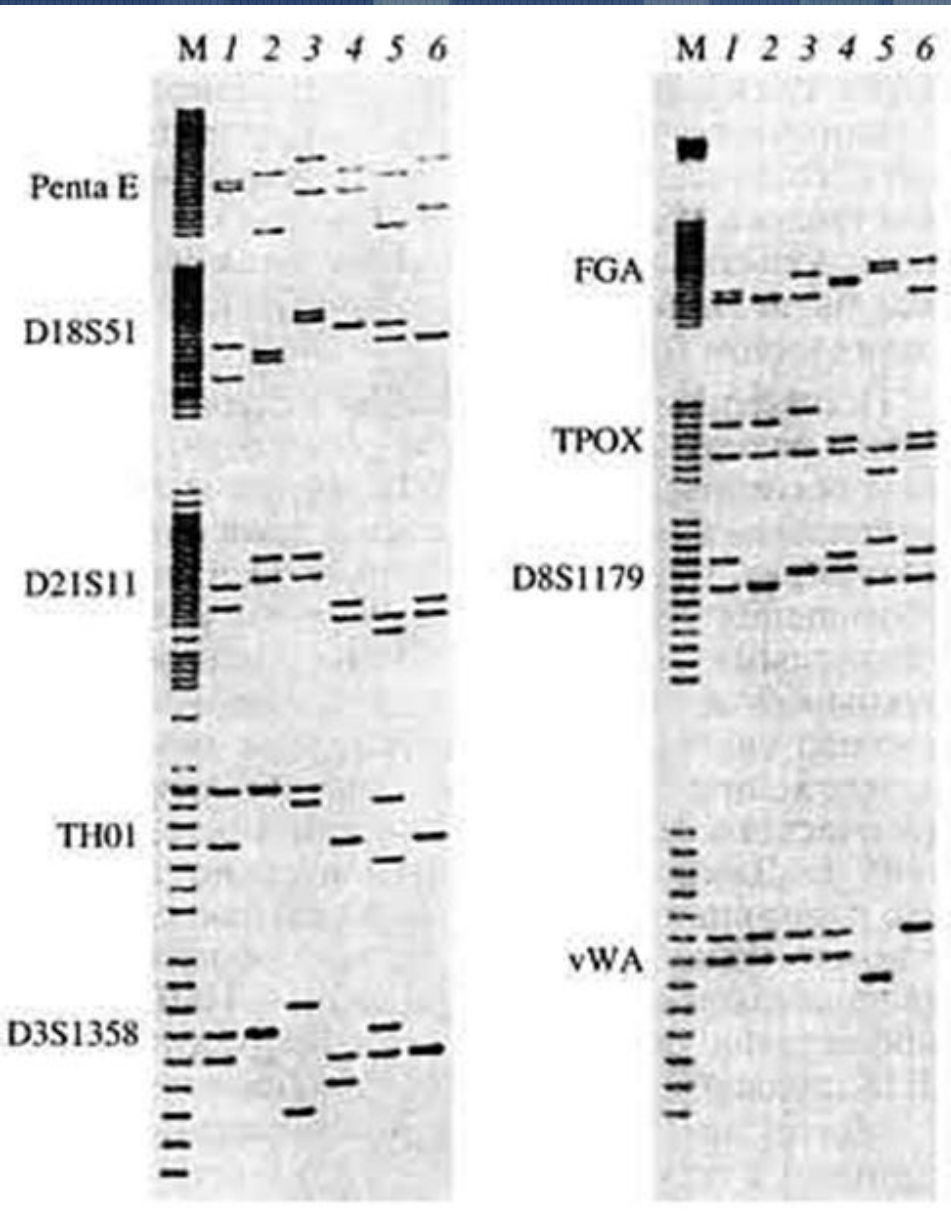
# **Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК**

**Чаще всего полосы на электрофореграмме визуализируют с помощью красителя этидиумбромид в ультрафиолетовом излучении или путем окрашивания нитратом серебра.**

**В последнее время все более активно внедряется регистрация амплифицированных фрагментов ДНК с использованием более чувствительных методов детекции, например, с помощью флуоресцентных меток, возбуждаемых лазерным излучением. Подобные методы требуют специального аппаратного обеспечения и относительно дороги, но они анализируют картину электрофоретического разделения с очень высокой точностью в режиме реального времени.**

**Кроме того, открывается возможность разработки мультиплексных амплификационных систем, которые позволяют одновременно анализировать ПДАФ сразу нескольких локусов (их может быть больше десятка). Создаваемый уже суммой локусов амплификационный профиль ДНК оказывается чрезвычайно полиморфным, ведь он является комбинацией нескольких независимых полиморфных элементов, что и обуславливает его очень высокую индивидуальную специфичность.**

# Анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК



Типирование хромосомной ДНК шести  
неродственных индивидов с помощью  
мультиплексной амплификационной системы  
**PowerPlex2.1 System (Promega Corp., США)**

Эта система позволяет одновременно  
анализировать ПДАФ девяти хромосомных  
локусов: Penta E, D18S51, D21S11, TH01,  
D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179 и vWA  
(компьютерный интерпретационный образ  
трехцветной картины, полученной на  
аппаратно-программном комплексе Hitachi  
FMBIO II Fluorescence Imaging System): M -  
комбинированный аллельный стандарт  
(представлены все аллельные варианты  
анализируемых локусов). Суммарный  
амплификационный профиль ДНК для  
каждого индивидуума создается комбинацией  
девяти пар полос, которые у не родственников  
ведут себя как независимые полиморфные  
элементы, что обуславливает очень высокую  
индивидуальную специфичность.



# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

Существенная часть вариаций в полинуклеотидных цепях геномной ДНК обусловлена точечными нуклеотидными заменами: очень многие локусы, в том числе и высокополиморфные, имеют варианты (аллели), которые на молекулярном уровне одинаковы по длине, но в той или иной степени различаются последовательностью нуклеотидов. Это так называемый **сайт-полиморфизм** (от англ. site - участок), который условно можно обозначить **ППАФ - полиморфизм последовательности амплифицированных фрагментов ДНК**. Понятно, что амплификация локусов ДНК, обладающих свойством сайт-полиморфизма, приведет к образованию неразличимых по длине фрагментов. Дифференцировать такие фрагменты с помощью обычных методов электрофореза невозможно, поэтому в индивидуализирующих системах ППАФ-типа используются иные принципы дифференциации аллельных вариантов.

Наиболее радикальный путь - **секвенирование** амплифицированных фрагментов ДНК, то есть определение первичной структуры полинуклеотидной цепи. Теоретически это самый точный и доказательный метод анализа индивидуальных генетических вариаций, поскольку по своей сути секвенирование означает расшифровку генетического кода, который в принципе уникален для каждого организма.

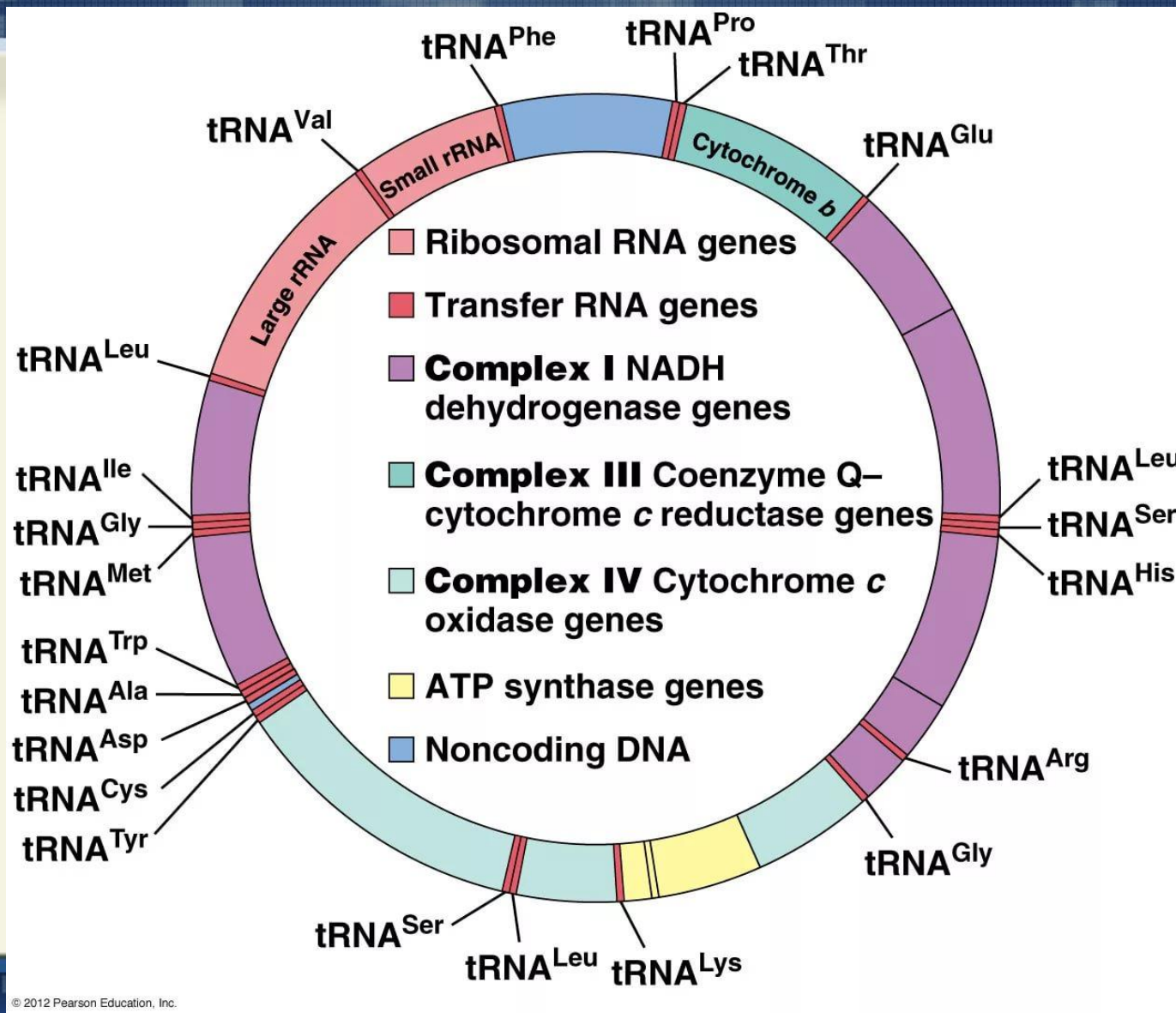
# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

В настоящее время единственной молекулярно-генетической индивидуализирующей системой, основанной на секвенировании сайт-полиморфных амплифицированных фрагментов ДНК, являются полиморфные локусы митохондриальной ДНК (мтДНК).

**Митохондриальная ДНК** человека представляет собой кольцевую молекулу, которая имеет размер 16 569 пар нуклеотидов. Предполагается, что мтДНК эволюционировала из хромосомы свободноживущей бактерии, значительная часть генов исходной бактериальной хромосомы была утрачена или переместилась в ядро.

Сейчас мтДНК человека насчитывает всего 37 генов. Она характеризуется рядом уникальных биологических свойств: быстрым темпом мутирования и, как следствие, высоким уровнем изменчивости, большим числом копий в каждой клетке, материнским характером наследования и отсутствием рекомбинации. Эти свойства, ставшие причиной широкого использования мтДНК в популяционных и эволюционных исследованиях, делают ее высокоинформативным, а в некоторых случаях единственно применимым инструментом и в судебно-медицинской практике.

# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

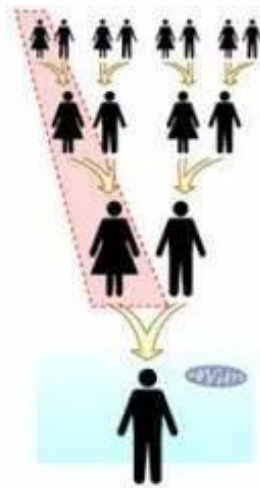


# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

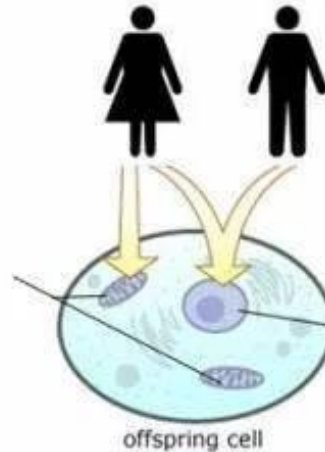
Можно использовать мтДНК как генетический **маркер материнской линии наследования**, и особенно успешно при установлении родства в тех случаях, когда генетическая дистанция, разделяющая родственников, больше, чем одно поколение. Здесь аутосомные маркеры не дают доказательного результата, поскольку практически невозможно проанализировать очень большое количество вариантов их наследования в ряду поколений. Нуклеотидная же последовательность мтДНК идентична у всех родственников, связанных материнской линией родства (за исключением редких мутационных событий).

По этой причине для установления принадлежности индивида к конкретной генетической линии, а следовательно, для его косвенной идентификации, можно использовать сравнительный анализ мтДНК любых родственников индивида по материнской линии (сестра, бабушка, дядя, племянник и т.д.).

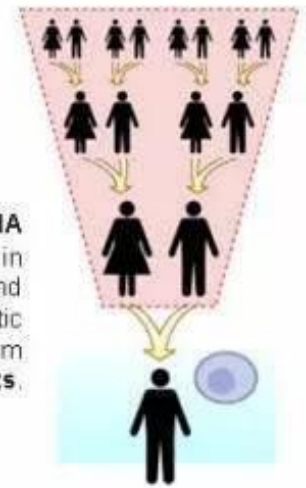
# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК



**Mitochondrial DNA (mtDNA)** is found in cell mitochondria and contains genetic material only from the **mother**.

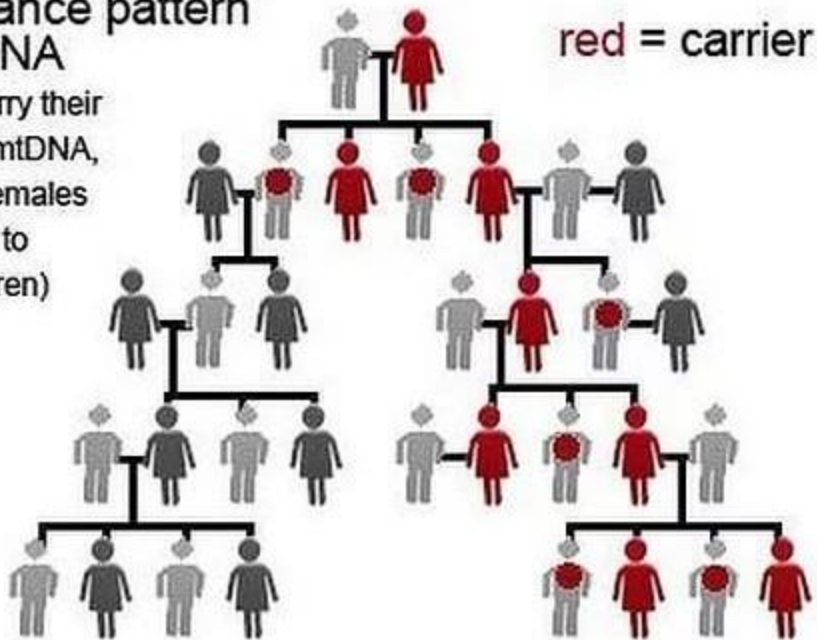


**Nuclear DNA (nuDNA)** is found in the cell nucleus and contains genetic material from **both parents**.



## Inheritance pattern of mtDNA

(males carry their mother's mtDNA, but only females pass it on to their children)



# **Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК**

**Анализ мтДНК возможен, если для экспертного исследования доступны крайне малые количества биологического материала или ДНК, содержащаяся в образце, сильно деградирована и хромосомная ДНК не может быть амплифицирована.**

**Митохондриальная ДНК многократно использовалась для анализа костных останков, возраст которых исчисляется десятками, сотнями и даже десятками тысяч лет. Такие результаты недостижимы для индивидуализирующих систем, основанных на анализе однокопийных генов хромосомной ДНК.**

**Высокий уровень изменчивости мтДНК обеспечивает широкий спектр индивидуализирующих характеристик, а значит, и высокий дискриминирующий потенциал данного метода.**

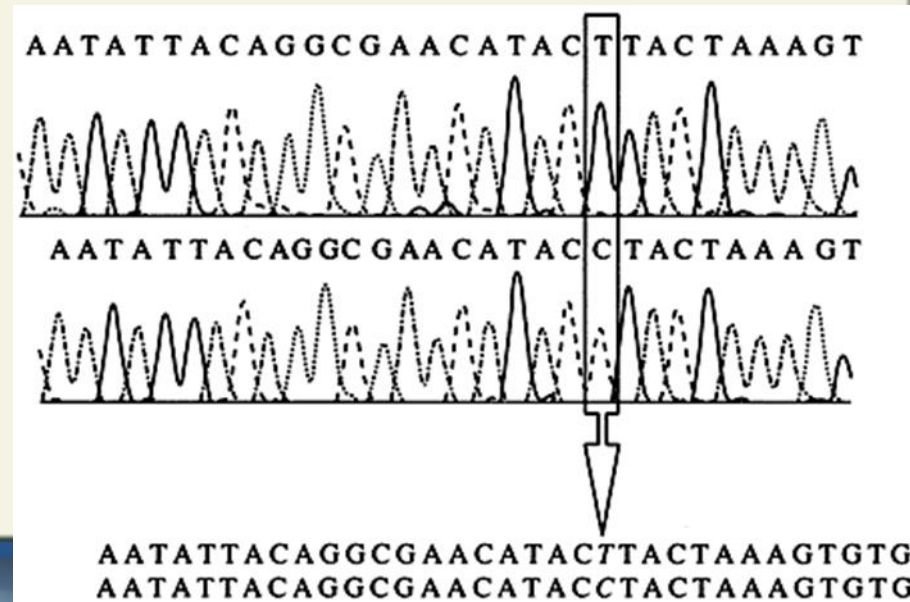
**Поскольку мтДНК не подвержена рекомбинации, она должна рассматриваться как единый локус. Количество вариантов последовательности контрольного региона мтДНК существенно превышает количество аллелей любого, даже самого полиморфного хромосомного маркера. Полиморфизм мтДНК столь высок, что иногда один лишь его анализ может обеспечить достаточно надежное подтверждение родства.**

# Анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей ДНК

Вариации в полинуклеотидных цепях мтДНК обусловлены в основном точечными нуклеотидными заменами - типичный полиморфизм последовательности ДНК. При типировании мтДНК в судебно-экспертных идентификационных исследованиях используются анализ полиморфизма длины рестрикционных и амплифицированных фрагментов (ПДРФ, ПДАФ), анализ полиморфизма нуклеотидных последовательностей (ППАФ, SSO, гибридизационные микроматрицы) и анализ конформационного полиморфизма (SSCP, DGGE).

Следует отметить, практическое значение имеет только индивидуализирующая система ППАФ-типа, в основе которой лежит

секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК, синтезированных на матрице мтДНК. Такой анализ, предусматривающий прямое секвенирование амплифицированного продукта, дает полную информацию о первичной структуре исследуемого фрагмента.



# Области применения: филогеография

Термин «филогеография» (phylogeography) был введен Авайсом и соавторами в 1987 г. В начале изучения мтДНК сложные и громоздкие фразы и термины использовались для объяснения очень простого наблюдения: кластеры на внутривидовых деревьях (построенных по сходству нуклеотидного состава отдельных мт генов) довольно часто демонстрируют четкую географическую ориентацию.

Таким образом, **филогеография** объединяет генные генеалогии (филогенетические деревья) и пространственные паттерны.

**Филогеография** изучает пространственное распределение генеалогических групп. Различные взаимоотношения между генеалогией генов и географией стали обозначаться как филогеографический паттерн.

Данные по внутривидовой изменчивости мтДНК подвергаются анализу с двух позиций:

- а) генеалогических взаимоотношений между молекулами мтДНК;
- б) географического распределения филогенетических групп.

Взятые вместе эти два элемента составляют, по определению Авайса, **внутривидовую филогеографию**.

Такие же исследования проводятся по **Y-хромосоме**.



## Области применения: филогеография

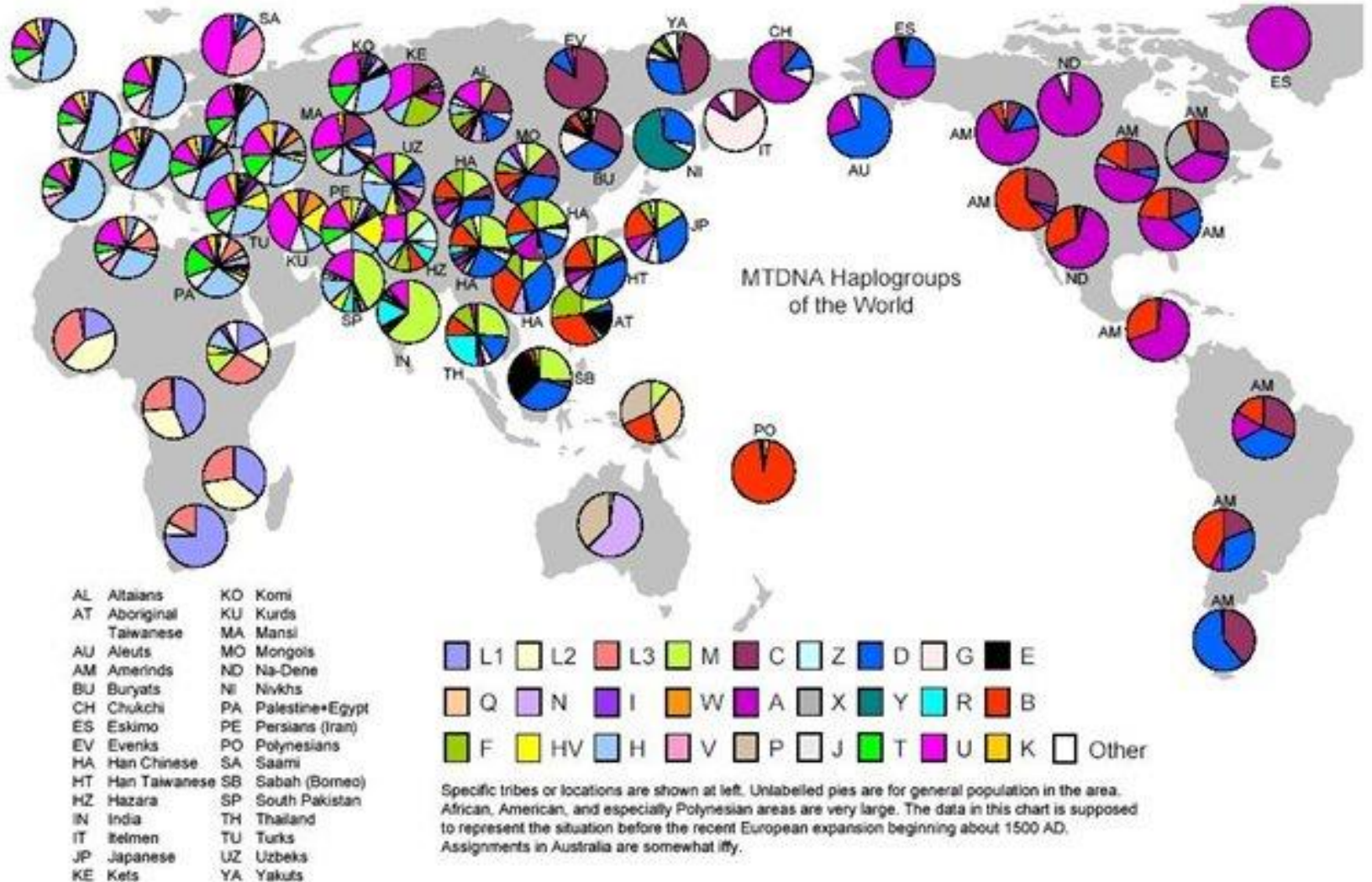
Существует около 20 основных типов мтДНК, которые называются гаплогруппы. Они возникли в процессе эволюции человека в результате накопления изменений – мутаций – при передаче мтДНК по наследству. Гаплогруппы делятся на подгруппы, которые делятся на под-подгруппы. Имея представление о скорости накопления мутаций в мтДНК можно с высокой точностью установить время происхождения конкретной гаплогруппы, а сравнивая степень родства гаплогрупп между собой – географическое место происхождения.

Разные этнические группы различаются как по наличию у их представителей определенных гаплогрупп мтДНК, так и по соотношению различных гаплогрупп внутри этих групп. Анализ на этническое происхождение даст информацию о гаплогруппе мтДНК и о том, к какой этнической группе принадлежит человек по материнской линии.

В отличие от мтДНК, **Y хромосома** передается только по мужской линии - от отца к сыну. Гены, находящиеся на этой хромосоме, отвечают за формирования мужского пола у ребёнка, поэтому эта хромосома присутствует только у мужчин. Изменения в Y хромосоме происходят исключительно за счет накопления мутаций. Существует около 30 основных гаплогрупп по Y хромосоме, которые подразделяются на подгруппы и под-подгруппы.

Разные народы и этнические группы отличаются друг от друга по гаплогруппам Y хромосомы, а также по соотношению гаплогрупп среди представителей этих народов и этнических групп. Результаты теста на этническое происхождение по Y хромосоме дадут информацию о гаплогруппе человека, на основании которой можно легко сделать заключение к какой этнической группе принадлежит он и его предки по мужской линии.

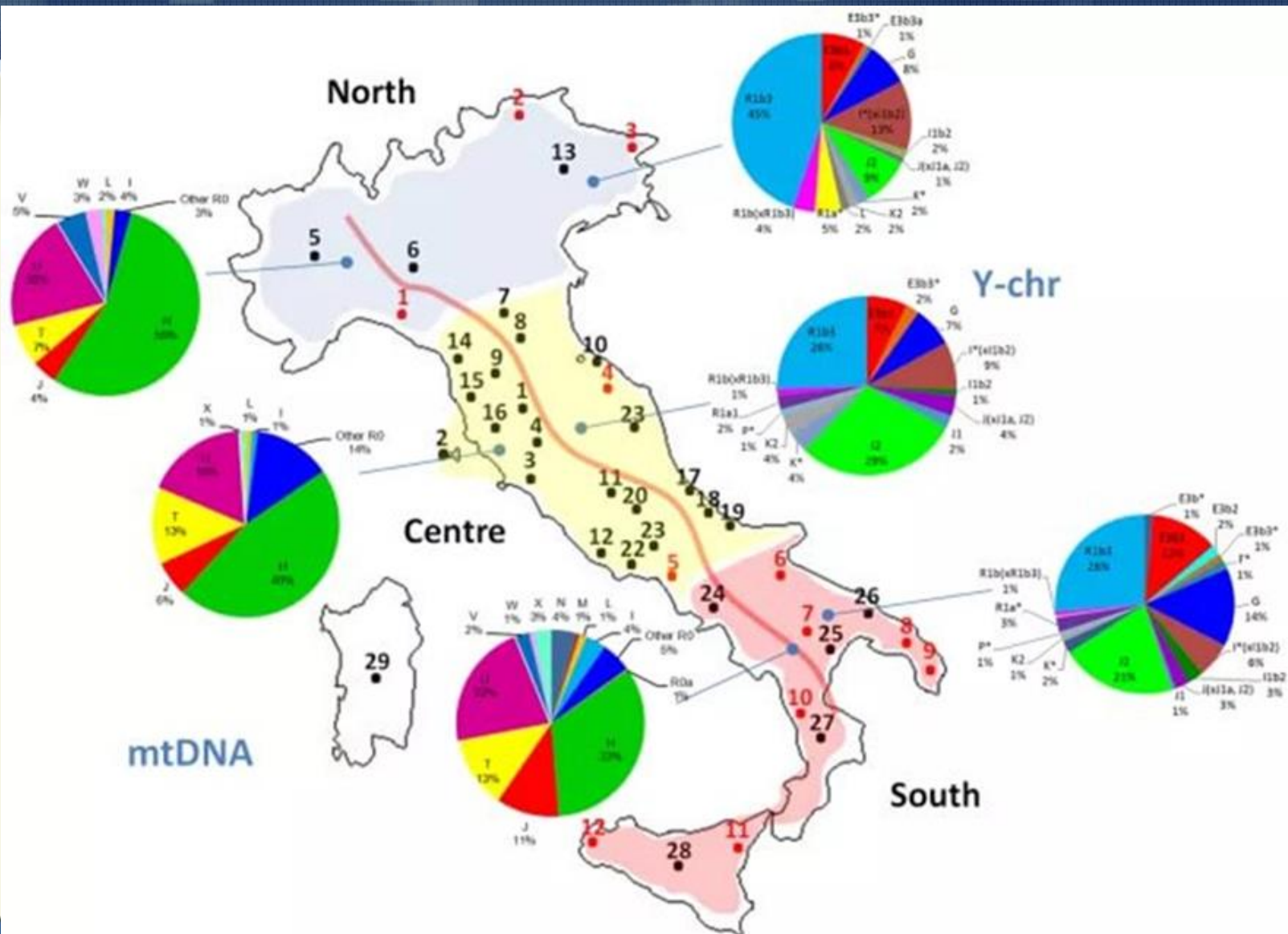
# Области применения: филогеография



Copyright © 2005 J. D. McDonald



# Области применения: филогеография



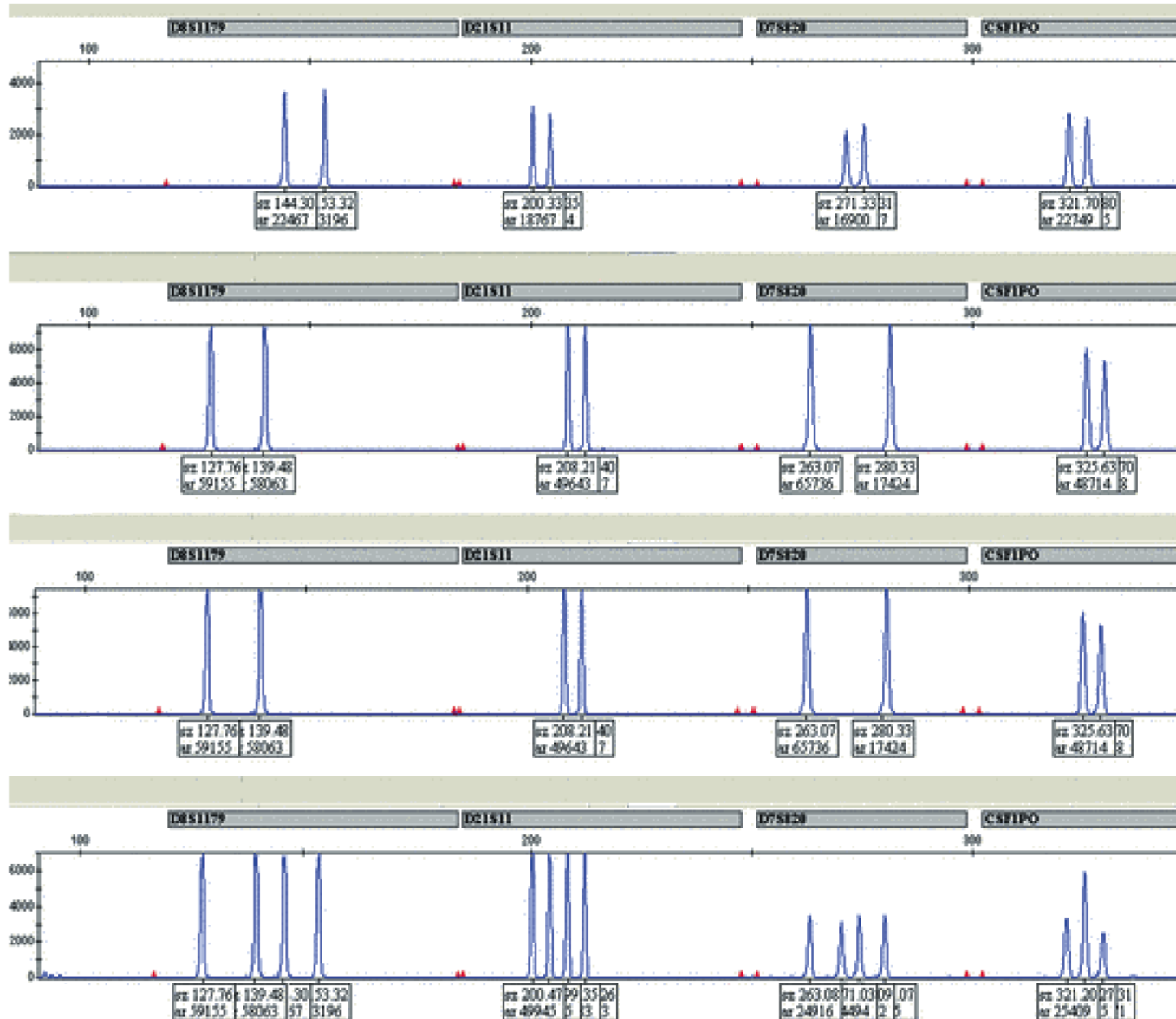
## Области применения: контроль лечения

Одним из важных применений метода исследования полиморфных локусов ДНК является **отслеживание приживления стволовых кроветворных клеток донора** у больного (реципиента) при трансплантации костного мозга.

Явление сосуществования в организме реципиента собственных кроветворных клеток и кроветворных клеток донора носит название **химеризм**. Перед трансплантацией у реципиента и донора проводится исследование 10-12 локусов ДНК и определяются такие локусы, по которым ДНК реципиента и донора различается, так называемые «метки». После трансплантации по таким геномным меткам можно отследить приживление костного мозга донора, при полном успешном приживлении костного мозга у реципиента исчезают его собственные характерные маркеры ДНК и остаются только характерные маркеры донора.

Исследование химеризма проводится в течение 5 лет после трансплантации. Появление у реципиента через какой-то промежуток времени его собственных маркеров ДНК свидетельствует о возникновении рецидива заболевания. Таким молекулярно-генетическим методом рецидив можно выявить на ранней стадии, что позволит принять своевременные врачебные меры для предотвращения развития болезни.

# Области применения: контроль лечения



**Количественный анализ химеризма с помощью STR-фрагментов ДНК, выполненный на генетическом анализаторе ABI 310: А — пациент до трансплантации; Б — донор; В — пациент после трансплантации имеет только донорский тип; Г — пациент после трансплантации: смешанный химеризм с содержанием донорских клеток 50 % свидетельствует о рецидиве заболевания.**

# Области применения: судебно-медицинская экспертиза

Использование метода генотипоскопии может позволить решить многие проблемы, возникающие при раскрытии и расследовании преступлений. По данным лаборатории генотипоскопии Экспертно-криминалистического центра МВД России с его помощью возможно следующее:

1. Устанавливать происхождение крови, спермы и некоторых других объектов от конкретного лица.
2. Объединять преступления, если их совершило одно и то же лицо и оставило следы биологического происхождения, например сперму.
3. Определять, наступила ли беременность от лица, подозреваемого в совершении изнасилования.
4. Устанавливать конкретных участников событий в случаях обнаружения смешанных следов биологического происхождения (эксперт при необходимости может сказать, что данное конкретное пятно крови образовано кровью нескольких лиц и указать каких конкретно).
5. Определять, относятся ли части трупа, обнаруженные отчлененными, к одному или разным телам.
6. Устанавливать, могут ли конкретные мужчина и женщина быть родителями ребенка.

# Области применения: судебно-медицинская экспертиза

**По результатам исследования «отпечатков» ДНК возможны следующие варианты выводов эксперта:**

- 1. Происхождение исследованного объекта от конкретного лица исключается.**
- 2. Установлена идентичность молекул ДНК в исследуемом объекте и образце, взятом от лица А. Следовательно, исследованный объект X произошел от лица А.**

**При установлении родителей ребенка возможны несколько вариантов ответа:**

- 1. Исключается происхождение ребенка от одного из предполагаемых родителей.**
- 2. Исключается происхождение ребенка от обоих предполагаемых родителей.**
- 3. Биологическими родителями ребенка являются конкретные мужчина и женщина.**



## Области применения: установление родства

Для подтверждения отцовства (материнства, родства) необходимо исследование как минимум 10-15 независимых локусов ДНК, с возрастанием числа исследуемых локусов ДНК увеличивается вероятность подтверждения отцовства. Максимальная вероятность подтверждения отцовства составляет 99, 99 %.

Для исключения отцовства достаточно провести исследование 4-6 локусов ДНК, вероятность исключения составляет 100 %.

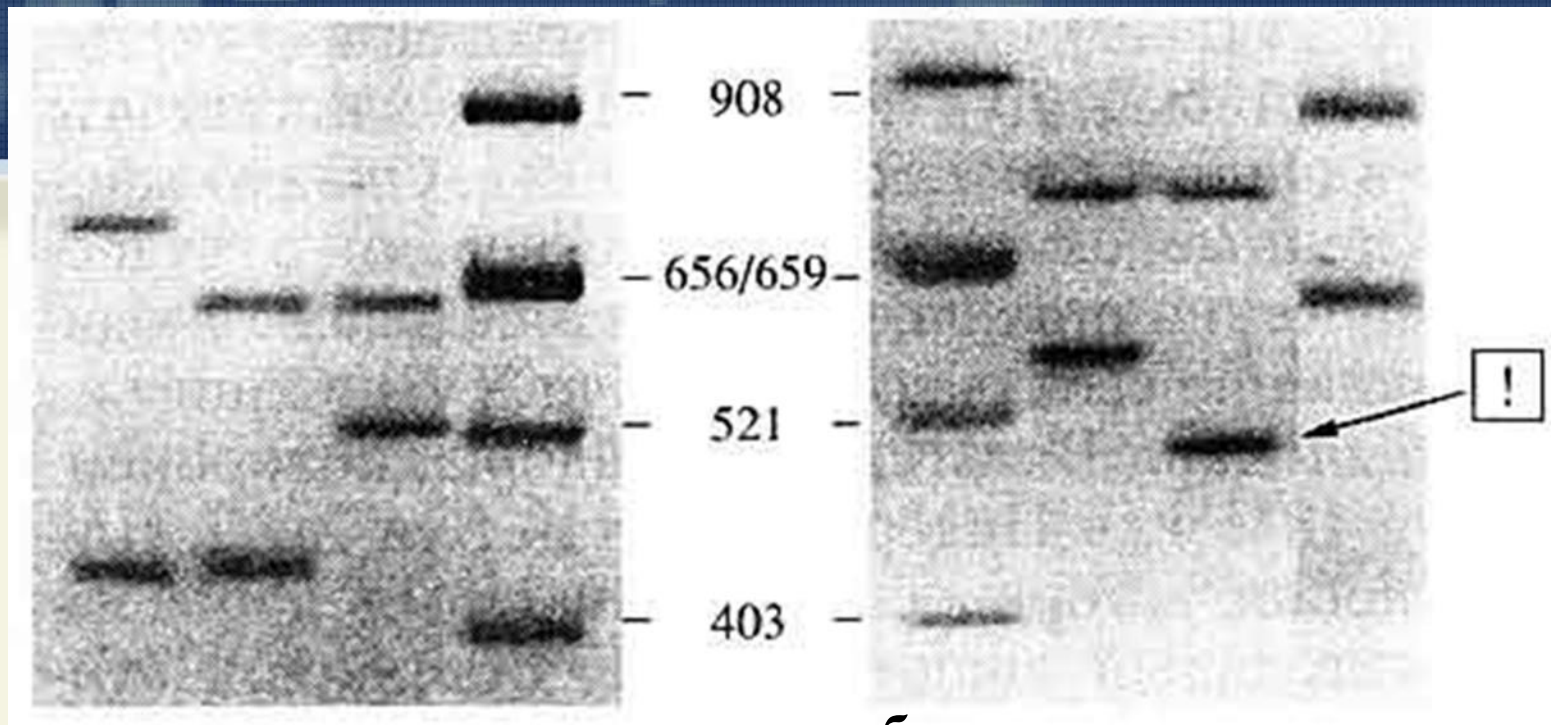


## Области применения: установление родства

**Наследование аллельных вариантов каждого полиморфного локуса происходит по ядерному типу, то есть примерно половина всех маркерных элементов, составляющих локальный геномный профиль каждого человека, ведет начало от его отца, а другая половина - от матери. Такой характер наследования обусловлен аутомсомной локализацией гипервариабельных локусов: каждый аллельный вариант наследуется как простой менделевский кодоминантный признак.**

**Идентификационный тест, направленный на разрешение случаев оспариваемого отцовства, предполагает сравнительный анализ геномных профилей ребенка, матери и предполагаемого отца. При этом сначала регистрируют те полосы в геномном отпечатке ребенка, позиции которых совпадают с материнскими полосами, а оставшиеся полосы у ребенка сопоставляют с геномным профилем мужчины. Если исследуемое трио представляет собой истинную биологическую семью, все нематеринские полосы ребенка обнаружатся в геномном профиле отца. В противном же случае часть полос в локальных геномных профилях ребенка окажется «лишними», то есть не найдет соответствия в геномных профилях заявленных родителей.**

## Области применения: установление родства



**а**

**1 2 3 М**

**б**

**М 1 2 3**

Электрофореграмма (окрашивание серебром) амплифицированных фрагментов ДНК - аллелей хромосомного VNTR-локуса DIS80 (1p36-p35) трех индивидуумов:

**а** - истинная семейная группа - мать, ребенок и отец (1, 2 и 3, соответственно);

**б** - ложная семейная группа - мать, ребенок и лжеотец; стрелкой отмечен отцовский аллель ребенка, который отсутствует в ДНК неродственного мужчины; **М** - стандарт молекулярных масс *AluI*-гидролизат ДНК плазмиды pBR322, приведены размеры в парах нуклеотидов

## Области применения: установление родства

Когда генетическая дистанция, разделяющая родственников по вертикали («родители-дети», «дед/бабка-внук» или «дядя/тетка-племянник»), превышает одно поколение, или анализируются горизонтальные схемы родства («брат-сестра»), верификация родственных связей с помощью анализа одной лишь хромосомной ДНК оказывается проблематичной.

Кроме того, если для экспертизы недоступны идентифицирующие объекты, которые позволили бы прямо установить индивидуализирующие признаки погибших на уровне их хромосомной ДНК, остается только возможность косвенной идентификации путем использования в качестве идентифицирующих объектов биологических образцов, полученных от родственников погибших.

В этих случаях типирование митохондриальной ДНК позволяет выявлять родственные связи с помощью не близкородственных, а так сказать, трассирующих родословных маркеров.

Одним из первых и наиболее ярких примеров использования митохондриальной ДНК в экспертном исследовании стала идентификация останков членов российской императорской семьи.

## Области применения: установление родства



Императрица Александра Федоровна была внучкой королевы Виктории. От неё она унаследовала свою мтДНК. Потомки принцессы Виктории Гессен-Дармштадской, родной сестры императрицы Александры, и их тётки принцессы Беатрисы, предоставили образцы для анализа. Все особенности мтДНК и по линии сестры, и по линии тётки полностью совпали с выявленными у матери и детей екатеринбургских останков.

Родственные связи были исследованы и по мужской линии. Для этого провели анализ Y-хромосомы, которая наследуется от отца к сыну и определяет мужской пол. Мальчик из второго захоронения (Алексей) соответствовал отцу семьи из первого (Николаю II). Их родство с линией Романовых установили при сравнении с потомками по мужской линии Николая I, прадеда Николая II.

## **Области применения: судебно-медицинская экспертиза**

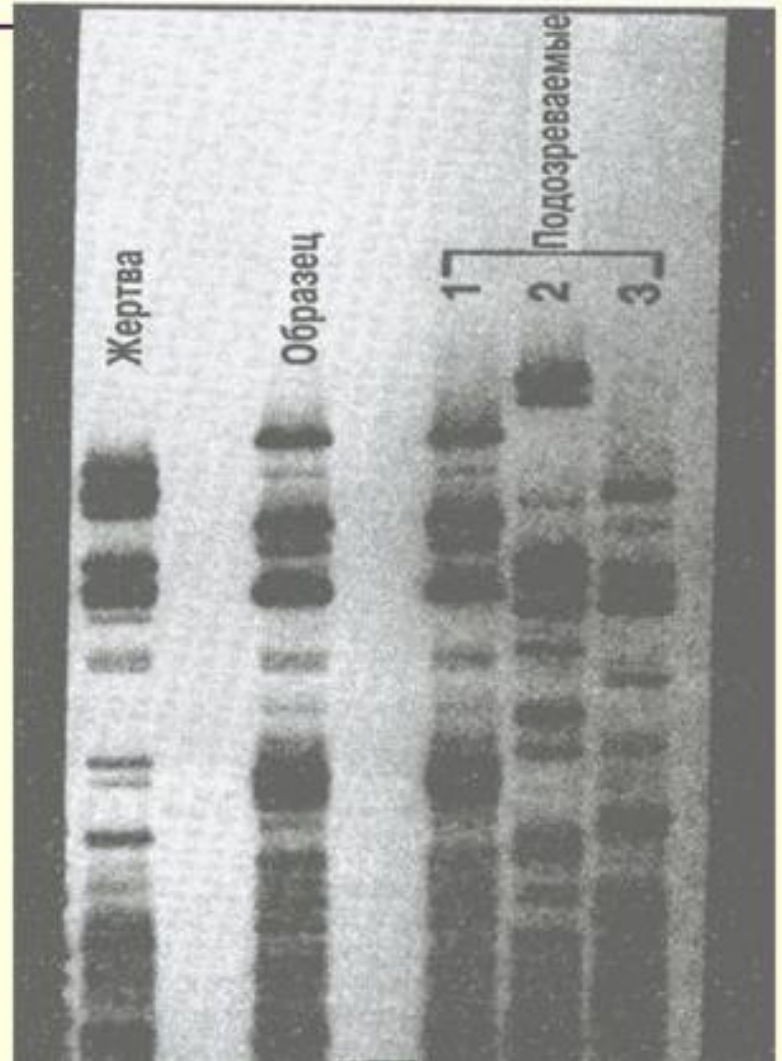
**Молекулярно-генетический метод также применяется при установлении принадлежности крови, спермы одному и тому же лицу, частей трупа одному человеку.**

**Важно отметить, что основной проблемой при молекулярно-генетическом исследовании считается отсутствие в большинстве случаев образцов ДНК родственников умершего или пропавшего без вести, то есть отсутствие материала для проведения исследования.**

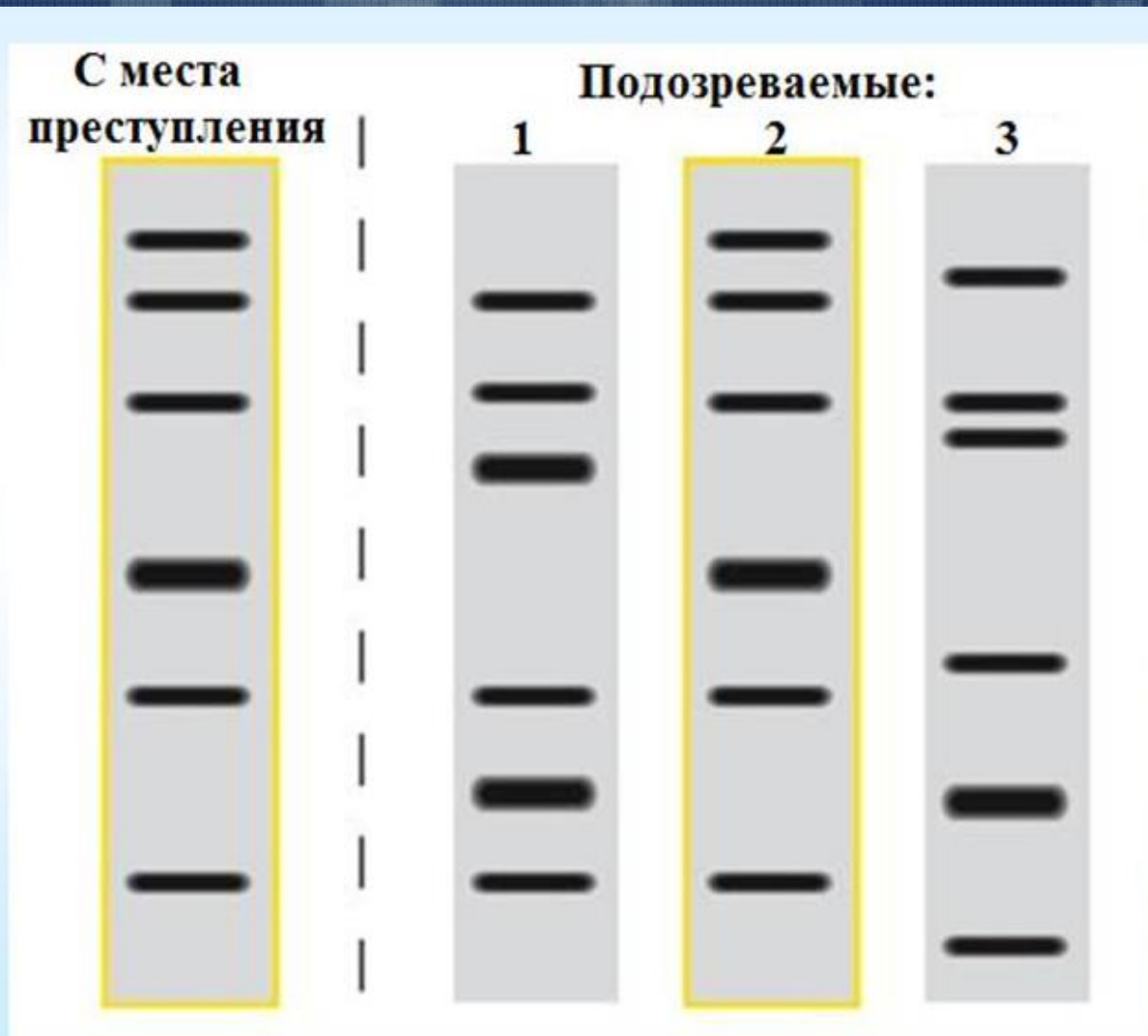
**В данных случаях, генетическим методом можно установить только лишь расовую и половую принадлежность лица.**

# Области применения: судебно-медицинская экспертиза

- Жертва – кровь
- Образец – сперма
- 1,2,3 – кровь подозреваемых



# Области применения: судебно-медицинская экспертиза





## **Области применения: судебно-медицинская экспертиза**

**С течением времени молекулярно-генетическая экспертиза становится все более распространенным и все менее дорогим методом криминалистики. При этом эффективность ее крайне высока.**

**С 1990-х годов в США, Германии, Великобритании действуют законы о геномной регистрации. Согласно этим нормативным актам исследуется и заносится в базу данных биологический материал, оставленный на месте преступления не установленными лицами. В эту же базу заносится генный «паспорт» людей, отбывающих наказание за особо тяжкие преступления. Такая база оказалась весьма эффективным средством раскрытия преступлений, в которых нет ни подозреваемых, ни свидетелей, так как в большом количестве случаев неопознанный генетический материал рано или поздно находил посредством базы своего хозяина или показывал связь с другими совершенными преступлениями. Такой закон принят в 2009 году и в России, однако финансирование его началось лишь недавно, и говорить о серьезном эффекте для нашей страны пока преждевременно.**

**Экспертный идентификационный анализ продолжает свое развитие уже не только как область молекулярно-генетических исследований, но и как элемент комплексного криминалистического знания, направленного на расследование и раскрытие преступлений.**

**Благодарю за  
внимание!**

