

**МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАРКЕР В
КРИМИНАЛИСТИКЕ: ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА
ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО СЕГМЕНТА 1 У ЭТНИЧЕСКИХ БЕЛОРУСОВ**

Г.В. Кожух¹, Т.Н. Дубинич-Федорова¹, А.И. Микулич², И.С. Цыбовский¹

¹ *НИИ проблем криминологии, криминалистики и судебной экспертизы Министерства
юстиции Республики Беларусь, Минск, Беларусь*

² *Институт искусствоведения, этнографии и фольклора НАН Республики Беларусь,
Минск, Беларусь*

В настоящее время, когда полностью известна нуклеотидная последовательность всего генома человека, особое значение приобретают исследования, связанные с изучением межиндивидуальных и межпопуляционных генетических различий человека, основанные на анализе полиморфизма ДНК маркеров. Подходы в изучении межиндивидуальных различий человека, основанные на исследовании ДНК маркеров, обладают существенно более высокой разрешающей способностью по сравнению с классическими методами, использующими изменчивость морфометрических и белковых маркеров.

Все эти факторы обусловили новый этап в молекулярно-генетическом изучении полиморфизма популяций человека во всем мире. На современном этапе решение идентификационных криминалистических задач так же немыслимо без использования молекулярно-генетических методов.

Имеется несколько причин, по которым молекула ДНК так привлекательна для использования в судебной идентификации: уникальность индивидуальной ДНК, генетическое постоянство организма, относительная стабильность молекул ДНК и, наконец, чрезвычайная чувствительность метода. Молекула ДНК обладает повышенной устойчивостью к воздействиям окружающей среды, что позволяет проводить идентификацию по прошествии даже очень большого срока давности, или же если останки человека не могут быть опознаны никакими другими методами.

В последнее время все более широкое распространение приобретает использование митохондриальной ДНК в целях индивидуализации личности. Ряд уникальных биологических свойств делают митохондриальную ДНК высокоинформативным, а, в некоторых случаях, и единственно применимым инструментом судебно-геномной экспертизы: она обладает быстрым темпом

мутирования, а, следовательно, высокой изменчивостью, большим числом копий в каждой соматической клетке (от 100 до 1000 копий), а также материнским характером наследования. Высокий уровень изменчивости обеспечивает широкий спектр индивидуализирующих характеристик, а, значит, и высокий дискриминирующий потенциал данного метода.

Фундаментальные и прикладные исследования изменчивости мтДНК взаимодополняют и обогащают друг друга. В результате криминалистических исследований накапливаются большие массивы данных, являющиеся ценным материалом для филогенетического анализа митохондриальных линий. С другой стороны, информация, накопленная в результате эволюционных исследований, позволяет развивать новые подходы анализа молекулярных данных в криминалистике. Необходимым условием корректного использования мтДНК для криминалистической индивидуализации личности является создание референтных баз данных, которые в Беларуси пока отсутствуют. Анализ изменчивости мтДНК белорусских популяций является важнейшей основой для использования полиморфизма мтДНК в отечественных судебно-экспертных исследованиях.

Митохондриальная ДНК человека (мтДНК) локализована в субклеточных органеллах - митохондриях - и представлена двухцепочечной кольцевой молекулой, содержащей 16569 пар нуклеотидов. МтДНК человека несет всего 37 генов, кодирующих 2 рРНК, 22тРНК и 13 полипептидов, участвующих в ферментативном комплексе окислительного фосфорилирования. Имеется также высокополиморфный некодирующий, так называемый контрольный регион, включающий приблизительно 1100 п.н. и состоящий из двух гипервариабельных сегментов – ГВС 1 и ГВС 2.

Типирование локусов мтДНК в целях молекулярно-генетической идентификации личности незаменимо в случаях, когда не работают традиционные методы типирования ядерных аутосомных полиморфных маркеров. Обычно это наблюдается при работе с ограниченным количеством исследуемого биологического материала (потожировые выделения, единичные безлуковичные волосы) или при сильной деградации его ДНК (костные останки). В настоящее время идентификационная значимость мтДНК-типирования определяется в основном полиморфной природой двух гипервариабельных регионов D-петли ГВС 1 (позиции 16024-16365) и ГВС 2 (позиции 73-340) [1]. Так как нуклеотидные последовательности мтДНК практически идентичны у всех матроклинных родственников, в методе мтДНК-типирования заложена не идентификация личности как таковой, а выяснение принадлежности испытуемой пробы к определенному митотипу или матрилинейному ряду.

Использование генетических маркеров мтДНК в целях идентификации личности может быть эффективным только при условии возможности оценки дискриминирующего потенциала настоящего метода. Последнее может произойти только при наличии баз данных полиморфизма мтДНК для конкретной этнической группы. К настоящему времени накоплены многочисленные данные о полиморфизме гипервариабельных сегментов контрольного региона мтДНК в различных этнических группах. В общем случае, отсутствие частот митотипов для данной этнической группы приводит только к качественной оценке мтДНК-идентификации кровного родства: "родство исключается полностью" и "родство не исключается".

Основной целью нашей работы было создание научных основ для введения мтДНК-типирования в практику экспертных учреждений Республики Беларусь. В рамках этой задачи проводилась апробация метода прямого секвенирования полиморфных сегментов ГВС 1 и ГВС 2 мтДНК биологических образцов, для которых методы генотипирования аутосомных полиморфных маркеров были неприменимы из-за ничтожного количества биологического материала в исследуемых образцах, а также в случаях высокого уровня деградации ДНК в биологических объектах. На данной стадии отработывались подходы, позволяющие получить максимально пригодный для дальнейшего анализа ДНК-содержащий материал. Кроме того, развернуто широкомасштабное исследование гетерогенности народонаселения Беларуси на уровне полиморфизма мтДНК, тем самым заложена основа для создания референтных баз данных.

Материалы и методы

В криминалистических исследованиях, как правило, секвенируются два гипервариабельных сегмента: ГВС 1 (позиции 16024-16400) и ГВС 2 (позиции 73-340). В данной работе было проведено исследование дискриминирующей способности ГВС 1 как наиболее полиморфной области мтДНК.

Для исследования полиморфизма мтДНК белорусов в работе использовалась ДНК полученная из крови 260 неродственных индивидуумов из 6 белорусских популяций (Полоцк – 43, Пинск – 46, Мядель – 43, Крупки – 40, Климовичи – 43, Молодечно - 45). Выделение тотальной ДНК из венозной крови осуществляли методом фенол-хлороформной экстракции [10]. Для оценки качества и количества выделенной ДНК проводился электрофорез в 0,8% агарозных гелях и детекция ДНК в УФ-свете после окрашивания гелей бромистым этидием. ПЦР- амплификация не кодирующего региона ГВС 1 проводилась с использованием прямого F15978 (5'–

CACCATTAGCACCCAAAGCT) и обратного R16445 (5'-AGAGTAGCACTCTTGTGCGG) праймеров. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе "GeneAmp PCR System 9700" (фирмы "Applied Biosystems", США) в 25 мкл смеси следующего состава: 67 mM трис-HCl pH 8.6; 50mM KCl; 0,01% Tween 20; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM каждого dNTP. Для амплификации использовали по 5 pmol каждого из праймеров. ДНК вносили в амплификационную смесь в количествах 5-10 нг, реакцию амплификации запускали добавлением *Taq* ДНК-полимеразы ("Бион", г. Москва) в количестве 0,75 ед.акт. Необходимое количество ДНК-полимеразы добавляли после начальной денатурации ДНК при 95°C в течение 2 мин. 36 циклов проводили в следующем режиме: 94°C - 30 сек, 53°C – 30 сек, 72°C – 1 мин 30 сек.

При работе с высокодеградированными биологическими объектами (костными останками, единичными волосами, потожировыми выделениями) использовали рекомендации американской лаборатории AFDIL (The Armed Forces DNA Identification Laboratory, USA) [2], основанными на использовании групп праймеров, рассчитанных на амплификацию более коротких фрагментов в составе ГВС 1 и ГВС 2.

ПЦР продукты были очищены на спин-колонках Helicon (Россия) и секвенированы, используя DYEnamic ET набор для секвенирования (Amersham Biosciences) согласно протокола фирмы-производителя. Секвенированный продукт был проанализирован на автоматическом капиллярном секвенаторе «MegaBACE 500» (Amersham Biosciences) с помощью прилагаемого пакета программ.

Полиморфизм ГВС 1 мтДНК в популяциях белорусов

В выборке из 260 белорусов из 6 различных регионов Беларуси были определены нуклеотидные последовательности ГВС 1 мтДНК. Длина секвенированного фрагмента составляла 376 п.н. (позиции 16024-6400). Данные по составу митотипов представлены в Таблице 1. Митотипы расположены в порядке возрастания номеров позиций, в которых произошли замены, и количества нуклеотидных замен.

В целом у 260 исследованных индивидуумов выявлен 171 митотип, причем значительная часть митотипов (84%) присутствовала в популяции только один раз. Для народов Европы этот показатель в среднем составляет 77% [3]. Из 376 исследованных нуклеотидных позиций 104 оказались полиморфными. Из них 101 нуклеотидная замена относится к типу транзиций и лишь 3 – к трансверсиям. Соотношение транзиций к трансверсиям составляет 33:1, что близко к данным, полученным для других популяций [4]. В 12 случаях была выявлена инсерция одного цитозина на участке 16184-16193, а в 5 случаях – двух цитозинов. Наиболее часто встречающимся (15,7%) оказался митотип,

соответствующий кембриджской референтной последовательности мтДНК [5], которая также широко распространена и среди европейцев (до 20%). Таким образом, генетическое нуклеотидное разнообразие белорусов находится в пределах значений, свойственных европейским популяциям, вместе с тем, в пределах исследованной выборки для белорусских популяций отмечается тенденция к несколько более высокой полиморфности по сравнению с таковой у других европейских народов.

Таблица 1. Митотипы ГВС 1 мтДНК, выявленные в белорусских популяциях

Митотип	ГВС 1 (минус 16000)	Популяция						
		Pl n=43	Pn n=46	Md n=43	Kr n=40	Kl n=43	MI n=45	всего n=260
1	CRS	5	3	5	3	3	8	27
2	86	0	0	0	1	0	0	1
3	93	0	0	0	0	0	1	1
4	126	1	0	0	0	0	0	1
5	129	3	0	0	0	1	0	4
6	162	0	0	0	0	0	1	1
7	192	0	0	0	0	0	1	1
8	209	0	0	1	0	0	0	1
9	259	0	0	0	0	1	0	1
10	266	0	0	0	1	0	0	1
11	270	0	1	0	0	0	0	1
12	278	0	1	0	0	0	0	1
13	286	0	0	1	0	0	0	1
14	288	1	0	0	0	0	0	1
15	291	0	0	1	0	0	0	1
16	292	1	0	0	0	0	0	1
17	294	0	1	0	0	0	0	1
18	298	0	1	0	0	1	0	2
19	304	0	3	2	2	3	2	12
20	311	0	1	2	1	0	2	6
21	318	0	0	0	1	0	0	1
22	327	0	0	1	0	0	0	1
23	342	0	0	0	0	1	0	1
24	343	1	1	1	0	0	0	3
25	354	0	0	1	0	0	0	1
26	362	1	1	1	1	0	0	4
27	390	0	0	0	0	0	1	1
28	69-126	1	3	1	1	0	0	6
29	93-304	0	0	0	0	1	0	1
30	93-311	0	0	0	1	0	0	1
31	126-362	0	1	0	0	0	0	1
32	146-342	0	0	0	0	1	0	1
33	153-298	1	1	0	1	1	0	4

34	154-354	1	0	0	0	0	0	1
35	162-311	0	0	0	0	0	1	1
36	169-298	0	1	0	0	0	0	1
37	176-256	0	0	0	0	0	1	1
38	179-356	1	0	0	1	0	0	2
39	183C-189	0	0	1	0	0	0	1
40	189-209	0	0	0	0	0	1	1
41	189-270	0	1	1	0	1	1	4
42	189-325	1	0	0	0	0	0	1
43	192-304	0	1	0	0	0	0	1
44	193-354	0	0	1	0	0	0	1
45	209-362	0	0	0	1	0	0	1
46	221-311	1	0	0	0	0	0	1
47	223-292	0	0	1	0	0	0	1
48	223-391	0	0	0	0	0	1	1
49	224-311	0	0	1	0	1	0	2
50	243-265	0	1	0	0	0	0	1
51	249-311	0	0	0	0	1	0	1
52	256-399	0	1	0	0	0	0	1
53	261-304	0	0	0	0	1	0	1
54	269-304	0	0	0	0	1	0	1
55	286-298	0	0	0	1	0	0	1
56	293-311	0	0	0	0	1	0	1
57	304-357	0	0	0	0	0	1	1
58	311-399	0	0	0	1	0	0	1
59	343-390	0	1	0	0	0	0	1
60	355-356	0	0	0	1	0	0	1
61	362-400	0	0	0	0	0	1	1
62	51-162-266	1	0	0	0	0	0	1
63	69-93-126	0	0	0	0	0	1	1
64	69-126-186	0	0	0	1	0	0	1
Митотип	ГВС 1 (минус 16000)	Популяция						
		Pl n=43	Pn n=46	Md n=43	Kr n=40	Kl n=43	MI n=45	всего n=260
65	69-126-230	0	0	0	0	0	1	1
66	69-126-260	0	0	0	0	0	1	1
67	69-126-270	0	0	1	0	0	0	1
68	69-126-274	0	0	1	0	0	0	1
69	69-126-290	0	0	1	0	0	0	1
70	69-126-311	1	0	0	0	0	0	1
71	93-289-304	0	1	0	0	0	0	1
72	113-172-311	0	0	1	0	0	0	1
73	126-294-296	1	0	0	0	0	2	3
74	126-311-362	0	0	0	0	1	0	1
75	129-172-189	0	0	0	0	0	1	1

76	129-189-256	0	0	0	0	1	0	1
77	129-192-270	0	1	0	0	0	0	1
78	129-224-311	0	0	0	1	0	1	2
79	134-356-362	0	0	1	0	0	0	1
80	153-209-298	0	0	0	1	0	0	1
81	154-189-193.1	1	0	0	0	0	0	1
82	183C-188-189	0	0	0	1	0	0	1
83	183C-189-193.1	0	0	0	1	0	0	1
84	183C-189-356	0	0	0	0	0	1	1
85	189-193.1-193.2	0	0	0	1	0	0	1
86	189-193.1-270	0	0	1	0	0	0	1
87	189-193.1-356	0	0	1	0	1	0	2
88	189-270-398	0	1	0	0	0	0	1
89	192-256-270	1	0	0	0	1	0	2
90	192-304-311	0	0	0	1	0	0	1
91	203-234-362	0	0	0	0	1	0	1
92	209-239-362	0	0	0	0	1	0	1
93	214-217-335	1	0	0	0	0	0	1
94	223-261-356	0	0	1	0	0	0	1
95	223-292-311	0	0	0	1	0	1	2
96	223-292-325	1	0	0	0	0	0	1
97	224-245-311	1	0	0	0	0	0	1
98	224-311-368	0	1	0	0	0	0	1
99	256-270-399	0	0	1	0	0	0	1
100	278-293-311	0	1	0	0	0	0	1
101	292-294-296	0	0	0	0	0	1	1
102	294-296-304	0	1	0	0	0	0	1
103	298-301-311	0	1	0	0	0	0	1
104	51-129-183C-189	1	0	0	0	0	0	1
105	51-129-189-256	0	0	0	1	0	0	1
106	69-93-126-299	0	1	0	0	0	0	1
107	69-124-126-290	0	0	0	0	0	1	1
108	69-126-193-278	0	0	1	0	0	0	1
109	69-126-261-274	0	0	0	0	1	0	1
110	69-126-261-399	0	1	0	0	0	0	1
111	93-126-231-361	0	0	1	0	0	0	1
112	93-183C-189-256	0	0	0	0	1	0	1
113	93-189-193.1-270	1	0	0	0	0	0	1
114	93-192-223-325	1	0	0	0	0	0	1
115	114A-192-256-294	0	0	0	1	0	0	1
116	126-148-309-318	1	0	0	0	0	0	1
117	126-163-186-189	0	0	1	0	0	0	1
118	126-186-189-294	1	0	0	0	0	0	1
119	126-256-294-296	0	0	0	1	0	0	1
120	126-294-296-304	1	4	0	1	1	1	7

121	126-294-296-324	0	1	0	0	0	0	1
122	129-145-223-391	0	1	0	0	0	0	1
123	153-233-248-298	0	0	0	0	1	0	1
124	145-176G-223-390	0	1	1	0	0	0	2
125	183C-189-193.1-391	0	0	0	0	0	1	1
126	189-193.1-193.2-356	0	0	0	1	0	0	1
127	189-193.1-390-391	0	1	0	0	0	0	1
128	189-223-278-365	0	0	1	0	0	0	1
129	192-223-292-325	0	1	0	0	1	0	2
Митотип	ГВС 1 (минус 16000)	Популяция						
		PI n=43	Pn n=46	Md n=43	Kr n=40	KI n=43	MI n=45	всего n=260
130	192-256-270-311	0	0	0	1	0	1	2
131	223-192-295-324	0	1	0	0	0	0	1
132	223-287-298-327	0	0	0	0	1	0	1
133	256-270-291-399	0	1	0	0	0	1	2
134	51-129-183C-189-193.1	0	0	0	0	1	0	1
135	69-126-324-366-390	0	0	0	1	0	0	1
136	86-192-256-270-294	0	0	0	1	0	0	1
137	92-140-265-293-311	0	0	1	0	2	1	4
138	93-126-294-296-304	0	0	0	0	0	1	1
139	93-180-224-249-311	0	0	0	1	0	0	1
140	93-256-270-294-399	0	0	0	0	1	0	1
141	114-192-256-270-294	0	0	0	0	1	0	1
142	126-129-294-296-304	0	0	0	0	0	1	1
143	126-144-209-294-296	0	0	1	0	0	0	1
144	126-147-294-297-362	0	0	0	0	0	1	1
145	126-163-186-189-294	1	0	1	0	1	0	3
146	126-294-296-304-368	0	0	0	0	0	1	1
147	129-172-223-311-319	1	0	0	0	0	0	1
148	129-172-223-311-391	0	1	0	0	0	1	2
149	140-169-265-293-311	1	0	0	0	0	0	1
150	140-171-209-223-390	0	0	0	0	0	1	1
151	144-183C-189-193.1-270	0	0	1	0	0	0	1
152	192-256-270-278-362	0	0	0	1	0	0	1
153	192-256-270-291-399	0	1	0	0	0	0	1
154	192-256-270-291-399	0	0	0	0	1	0	1
155	192-256-270-304-399	0	0	0	0	1	0	1
156	224-239-291-311-368	0	0	1	1	0	0	2
157	51-129-183C-186-193.1-362	0	0	0	0	1	0	1
158	69-126-145-172-222-261	2	0	0	0	1	0	3
159	92-93-183C-189-193.1-270	0	0	0	0	1	0	1
160	93-129-172-223-311-391-399	0	1	0	0	0	0	1
161	93-129-189-193.1-193.2-270	0	0	1	0	0	0	1

162	93-172-189-193.1-193.2-362	0	1	0	0	0	0	1
163	126-163-179-186-189-294	1	0	0	0	0	0	1
164	126-163-186-189-265-294	0	0	0	1	0	0	1
165	134-193-256-270-291-399	1	0	0	0	0	0	1
166	145-189-192-256-270-399	0	0	0	0	1	0	1
167	183C-189-193.1-223-255-278	0	0	0	1	0	0	1
168	51-92-129C-189-193.1-193.2-362	0	0	0	1	0	0	1
169	114A-189-192-256-270-294-311	1	0	0	0	0	0	1
170	172-184A-189-223-227-234-278	0	0	0	0	0	1	1
171	189-193.1-232-249-304-311-360	1	0	0	0	0	0	1

Популяции: Pl-Полоцк; Pn-Пинск; Md-Мядель; Kr-Крупки; Kl-Климовичи; Ml-Молодечно.

Полученные нуклеотидные последовательности ГВС 1 белорусов позволяют оценить его дискриминирующий потенциал в судебно-генетических исследованиях. Важную или, даже, решающую роль при этом играют частотные характеристики гаплотипов в популяции. В изученной нами выборке из выявленных 171 митотипа 144 встречались лишь однажды, а это означает что 144 из 260 типированных индивидов (55,4%) внутри данной выборки могут быть идентифицированы по последовательности одного лишь ГВС1.

30% индивидов формируют группы, содержащие от 2 до 7 человек, обладающих одинаковыми гаплотипами, частоты встречаемости которых колеблются от 0,8 до 2,7%. Такие небольшие группы несложно дискриминировать, используя дополнительное ДНК-типирование в 1-2 аутосомных локусах, либо секвенируя образцы по дополнительным полиморфным митохондриальным локусам (например, ГВС 2). Наиболее сложным случаем представляется дискриминация индивидов, обладающих структурой ГВС 1, аналогичной кембриджской референтной последовательности (CRS), частота встречаемости которой в исследованной выборке составляет 15,7%. Для дискриминации ее носителей возможно потребуется дополнительное детальное исследование ядерных полиморфных локусов.

Таким образом, на основании частот выявленных митотипов ГВС 1 в исследованных выборках белорусов можно условно выделить 3 группы индивидуумов. Первая, обычно самая массовая, объединяет уникальные митотипы, встречающиеся в выборке один раз. При необходимости их идентификации обнаружится однозначное соответствие с объектами сравнения. Однако, следует отметить, что вывод об уникальности гаплотипа в данном случае применим лишь для конкретной выборки и не будет таковым в случае исследования более широких выборок.

Индивидуумы из второй группы являются носителями более частых митотипов и формируют несколько групп. Для дискриминации объектов внутри каждой такой группы потребуется использование дополнительных полиморфных маркеров.

К третьей группе относятся индивидуумы, обладающие самым распространенным в Европе митотипом – аналогичным CRS. Для их дискриминации может потребоваться полномасштабная работа с использованием всех традиционных методов.

Одна из основных проблем мтДНК-идентификации заключается в наличии абсолютно идентичных митотипов у двух и более исследуемых проб, что является следствием невысокого потенциала дискриминации традиционно используемых митохондриальных маркеров (ГВС 1 и ГВС 2). До недавнего времени анализ первичной структуры мтДНК предоставлял возможность надежной идентификации лишь в пределах относительно небольшой замкнутой группы потенциальных претендентов (например, в ряду подозреваемых лиц). Однако в ряде случаев, как вытекает из вышесказанного, возникает необходимость идентификации двух и более индивидуумов с одинаковыми нуклеотидными последовательностями обоих гипервариабельных регионов (ГВС 1 и ГВС 2). И если два и более индивидуумов имеют идентичные митотипы по локусам ГВС 1 и ГВС 2, их дальнейшая дифференцировка в пределах данного подхода невозможна. Для повышения эффективности мтДНК-идентификации необходимо исследование дополнительных полиморфных генетических маркеров мтДНК. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей за пределами гипервариабельных локусов контрольного региона не используется в рутинной практике судебно-медицинской идентификации личности и установления кровного родства. Вместе с тем, имеются данные литературы, свидетельствующие о наличии полиморфных позиций за пределами локусов ГВС 1 и ГВС 2 [6]. Исследование полиморфных позиций за пределами контрольного региона D-петли может быть перспективным для получения ценной информации, которая могла бы увеличить потенциал индивидуализации ДНК-идентификации личности.

Таким образом, не вызывает сомнения необходимость использования полиморфизма ГВС 2 в качестве второго высокополиморфного митохондриального локуса при проведении криминалистических идентификационных исследований. Применение в анализе других полиморфных сайтов вне пределов контрольного региона, вплоть до полного секвенирования последовательности мтДНК, позволило бы увеличить дискриминирующий потенциал метода при идентификации индивидуумов, обладающих митотипом, аналогичным наиболее распространенной кембриджской последовательности. Создаваемая нами база данных полиморфизма белорусских популяций по

митохондриальным локусам ГВС 1 и ГВС2 станет основой для оценки достоверности криминалистической идентификации биологических объектов с использованием полиморфизма мтДНК.

мтДНК-типирование в криминалистических исследованиях

Объектом для генотипирования мтДНК может являться любой ДНК-содержащий образец. Воспроизводимость метода и эффективность типирования мтДНК была продемонстрирована различными исследователями на реальных биологических объектах: волосах луковицах, отдельных волосах без луковиц, костных фрагментах [7], фекалиях [8] и даже следах прикосновений пальцев рук [9].

Для нашей лаборатории наибольший интерес в плане генотипирования полиморфных фрагментов мтДНК представляют образцы, которые в силу ряда причин не могут быть генотипированы по аутосомным полиморфным маркерам. Таковыми являлись ряд образцов, полученных из различных источников: – костных останков, пролежавших в земле длительный срок (более 3 лет) и, соответственно, подвергнутых деструктивному воздействию различных факторов окружающей среды (образец 1); – единичных волос без луковиц (образец 2); – потожировых следов из смазанных отпечатков пальцев рук (образец 3). Предстояло оценить насколько качество и количество содержащейся в испытуемых образцах ДНК определяет эффективность амплификации полиморфных фрагментов ГВС 1 и ГВС 2 и дальнейшего их секвенирования.

Как видно из рис. 1 (дорожка 2), ДНК образца №1, несмотря на значительное ее содержание, глубоко деградирована до коротких фрагментов с длиной менее 400 п.н., в силу чего данный образец был непригоден для генотипирования STR локусов. Для сравнения на гель наносились образцы тотальной ДНК, выделенной из эпителиальных клеток соскобов щечного эпителия рта (дорожка 1). Однако попытки использования образца №1 в качестве матрицы для амплификации ГВС 1 оказались успешными. Полноразмерный ГВС 1 (~400 п.н.) успешно амплифицировался (дорожка 3) и в дальнейшем этот сегмент был успешно секвенирован.

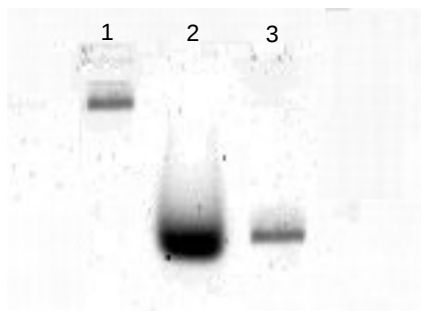


Рисунок 1 - Агарозный гель (0,8 %) в УФ-свете. Окрашенная бромистым этидием ДНК экстрагирована из:
1- эпителиальных клеток ротовой полости человека;
2 – костей погибшего, пролежавших более 3-х лет в земле;
3 – ампликон, соответствующий ГВС 1 (420 п.н.).

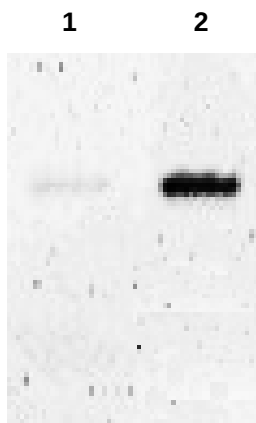


Рисунок 2 - Агарозный гель (2%) в УФ-свете. Окрашенные бромистым этидием ампликоны, соответствующие ГВС 1:
1 – первая амплификация ДНК, выделенной из следовых количеств потожировых выделений в отпечатке рук;
2 – переамплификация фрагмента ГВС 1, полученного при проведении первой амплификации.

Вместе с тем, в этом же образце попытки амплификации полноразмерного ГВС 2 (~400 п.н.), оказались безуспешными. Для установления структуры ГВС 2 в этом случае пришлось использовать амплификацию и секвенирование более коротких фрагментов в соответствии с рекомендациями военной лаборатории США (AFDIL) [2], специально разработанными для работы с сильно деградированными образцами. Данная стратегия подразумевает амплификацию коротких перекрывающихся фрагментов длиной всего 120-140 п.н., благодаря чему удастся в конечном итоге восстановить последовательность ГВС 2.

Идентификация образцов №2 и №3, содержащих исчезающе малое количество ДНК, также представляло определенные трудности. Количество амплификата ГВС 1 при использовании образца №3 в качестве матрицы было недостаточным для последующего его секвенирования (Рис. 2, дорожка 1). В этом случае последующая переамплификация ампликона ГВС 1, полученного в 1-й амплификации, позволила получить достаточно материала для проведения секвенирования (Рис. 2, дорожка 2). Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае идентификации образца №2.

Таким образом, были отработаны различные алгоритмы работы с деградированными и слабовыраженными ДНК, позволяющие определять нуклеотидную последовательность полиморфных сегментов мтДНК, что, в свою очередь, дало возможность получать криминалистически значимую информацию для биологических объектов, непригодных для генотипирования аутосомных полиморфных маркеров.

Литература

1. Budowle B., Allard M.W., Wilson M.R., and Chakraborty R. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, debates, and foundations. (2003) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **4**, 119-141
2. Edson S. M., Ross J. P., Coble M. D., Parsons T. J., and Barritt S. M. Naming the Dead — Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. (2004) *Forensic Science Review* **16**, 63-90
3. Richards M., Corte-Real H., Forster P., Macaulay V., et al. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. (1996) *Am J Hum Genet* **59**, 185-203
4. Vigilant L., Pennington R., Harpending H., Kocher T.D., and Wilson A.C. Mitochondrial DNA sequences in hairs from a southern African populations (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9350-4
5. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., deBruijn M.H., et.al Sequence and organization of the human mitochondrial genome (1981) *Nature* **290**, 457-465
6. Coble D.M., Vallone P.M., Just R.S., et al. Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region (2006) *Int J Leg Med* **120**, 27-32
7. Hopgood R., Sullivan K.M., Gill P. Strategies for automated sequencing of human mtDNA directly from PCR products (1992) *Biotechniques* **13**, 82-92
8. Hopwood A.J., Mannucci A., Sullivan K.M. DNA typing from human faeces (1996) *Int J Legal Med* **108**, 237-243
9. Szibor R., Michael M., Plate I., and Krause D., Efficiency of forensic mtDNA analysis (2000) *Forensic Sci Int* **113**, 71-78
10. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989