

## **АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ДНК ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ СУДЕБНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ**

**И.Л. Бадзюк,**  
доцент кафедры  
ИПД, ИЯиКР  
ФГКОУ ВПО ВСИ  
МВД России,  
кандидат химических наук,  
доцент

**Ю.Э. Голодков,**  
начальник кафедры  
ИПД, ИЯиКР  
ФГКОУ ВПО ВСИ  
МВД России,  
кандидат технических наук,  
доцент

**Е.Ю. Ларионова,**  
доцент кафедры  
ИПД, ИЯиКР  
ФГКОУ ВПО ВСИ  
МВД России,  
кандидат химических наук,  
доцент

*В работе проведен анализ современных методов извлечения молекул ДНК из биологического материала, оценена возможность использования их при проведении криминалистического ДНК-анализа.*

*This article contains data about the analysis of modern methods of extracting DNA from biological material. The possibility of using these methods for forensic DNA analysis was estimated.<sup>1</sup>*

В конце 80-х годов прошлого столетия в судебной экспертизе вещественных доказательств начинают внедряться методы молекулярной генетики, позволяющие проводить идентификационные исследования объектов биологического происхождения. Революционным достижением, которое принципиально, по-новому, позволило подойти к проблеме идентификации биологического следа, в этой области стало применение методов анализа молекул ДНК.

Индивидуальная специфичность молекул ДНК способствует тому, что при проведении одного исследования можно установить множество признаков, которые позволяют с большой долей вероятности устанавливать происхождение следа от конкретного лица, а также биологическое родство, половую принадлежность исследуемых объектов.

Развитие и совершенствование методов криминалистического ДНК-анализа способствует тому, что современная технология исследования ДНК позволяет успешно исследовать: практически все ткани и биожидкости организма человека, содержащие ДНК; микроколичества биоматериала; смешанные следы.

При проведении криминалистического ДНК-анализа одним из этапов является извлечение ДНК из материалов, представляемых на экспертизу. От качества исполнения данной процедуры зависит успех всех последующих этапов исследования ДНК. Неправильный выбор метода выделения ДНК или его неверное осуществление могут привести либо к получению загрязненной ДНК, непригодной для исследования, либо к ее потере. При выборе метода необходимо учитывать целый ряд факторов: вид объекта, его состояние,

---

<sup>1</sup> Badzyuk I., Golodkov Y., Larionova E. Analysis of the modern methods for extracting DNA from forensic biological specimens.

давность образования и условия хранения, поэтому особую актуальность приобретают исследование и анализ современных методов извлечения ДНК из различных биологических объектов, а также обзор приборного оформления данных подходов.

Основная цель работы – исследование литературных данных о методах, подходах и о приборном оформлении процессов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы.

Основные задачи работы – обзор, анализ, сравнение современных методов извлечения ДНК из биологических объектов, оценка применимости существующих методов в криминалистическом ДНК-анализе.

В современной криминалистике по извлечению ДНК из биотканей наиболее часто используют два метода: фенольный [1-4] и с помощью ионообменной смолы Chelex 100 [1,2,3,5]. Данные методы за годы применения зарекомендовали себя как наиболее надежные методы получения незагрязненных и неповрежденных образцов ДНК.

Фенольный метод является универсальным и пригоден для выделения ДНК практически из любых объектов, содержащих ДНК, в частности, из крови, спермы, волос, костей. При использовании этого метода происходит наиболее полное удаление белков и различных клеточных компонентов, в результате чего можно получить ДНК высокой степени очистки, пригодную для длительного хранения. К недостаткам метода относятся необходимость применения высокотоксичных реактивов и длительность процедуры выделения ДНК. Кроме того, при использовании фенольного метода часть ДНК, содержащейся в исследуемом объекте, может теряться. Поэтому этот метод особенно эффективен, когда объект содержит относительно большое количество ДНК [4].

Метод выделения ДНК с использованием ионообменной смолы Chelex 100 можно применять только, когда исследуемый объект не содержит больших количеств белков, его клетки легко лизируются и объект не подвергался длительному хранению. По сравнению с фенольным методом данный метод не требует применения токсичных реактивов и проводится в течение более короткого времени [5], как правило, используется для выделения нуклеиновых кислот из крови, спермы, слюны, волос.

В медицине одним из популярных в настоящее время является метод выделения ДНК, предложенный Р. Бумом и его коллегами [6-7]. Этот метод основан на использовании для лизиса клеток сильного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Поэтому при использовании этого метода очень

важен правильный выбор сорбента и тщательное соблюдение технологических нюансов [6].

При исследованиях, когда важно получить статистические данные, возможно использование простых методов с применением детергентов или обработки биологического материала щелочами с последующей их нейтрализацией. В тоже время, использование подобных методов пробоподготовки для клинической диагностики может приводить к ложноотрицательным результатам, вследствие использования в реакционной смеси некачественного препарата ДНК.

На данный момент при проведении ДНК-анализа больше всего трудностей вызывают процессы извлечения ДНК из костных тканей. Часто возникает необходимость извлекать ДНК остатков скелетов, пролежавших в химически агрессивной природной среде продолжительное время. Причем сложность состоит не только во временном факторе при проведении процедур по извлечению нуклеиновых кислот из костной ткани, но и в вопросе о сохранности структуры (т.е. сохранность генетической информации) в данных тканях по происшествию времени их хранения даже в «музейных» условиях.

В кругах, связанных с проведением исследований ДНК, ведутся споры о пригодности некоторых методов извлечения ДНК из костных тканей. В частности, данный вопрос обсуждается при анализе исследований по идентификации останков царской семьи [9,15]; при рассмотрении глобальной проблемы - эволюция человеческого рода: идентификация останков древних людей [10-12]; при изучении возможностей клонировать древних живых организмов [13-14].

Активным поиском новых подходов и методик, а также «модернизацией» уже существующих занимаются палеонтологи и археологи, которые, по сути, проводят тот же криминалистический ДНК-анализ. Поэтому их работы по извлечению ДНК могут представлять интерес для совершенствования методик ДНК-анализа в судебной экспертизе.

Особый интерес вызывает опыт ученых по извлечению ДНК из останков древних людей. Так, биологи-криминалисты из Университета в Нью-Хейвене, штат Массачусетс, предложили новый способ обработки костной ткани для извлечения ДНК [16]. Эта технология, считают авторы, должна значительно упростить и ускорить их повседневную работу по ДНК-типированию. Исследователь Хитер Койл дополнила стандартную процедуру извлечения ДНК из костной ткани - замораживание и измельчение образца кости - предварительным запеканием образца кости в жаровом шкафу в течение 72 часов.

Продуктивными являются исследования по совершенствованию методики извлечения ДНК из зуба древних останков, возрастом 18 тысяч лет, найденных на острове Флорес (Индонезия) в 2003 году, послужившие основой для описания нового вида гоминид - *Homo floresiensis*. Команда ученых, под руководством К. Адлер, генетиком из Австралийского центра древней ДНК (ACAD) при Университете Аделаиды, пришли к выводу, что

причина предыдущих неудач по извлечению ДНК из древних зубов - в несовершенстве стандартных процедур извлечения ДНК [11]. В частности, исследовав 42 древних образца со всего мира (останков людей и животных, возрастом до 7500 лет), выяснили, что зубной цемент, или корешковая кора (т.е. ткань, покрывающая корни зуба), содержит в 5 раз больше митохондриальной ДНК, чем дентин. А так же, что бы извлечь ДНК из зубного цемента, сверлить древний зуб необходимо на низкой скорости.

При работе с мягкими тканями и биожидкостями опыт биологов Лимнологического института СО РАН г. Иркутска по разработке и усовершенствованию методов извлечения ДНК может быть полезен для судебных экспертов при возникновении определенных трудностей. Так, в работе [17] авторы предлагают усовершенствовать «цетавлоновый метод», с целью получения очищенных ДНК, без ингибирующих ПЦР-реакцию примесей, растворяя в спирте осажденные цетавлоновые соли нуклеиновых кислот.

Успех выполнения ДНК-анализа на высоком уровне зависит от «лабораторного оформления» процедуры извлечения нуклеиновых кислот из биологических объектов. При проведении ДНК-анализа широко используются стандартные тест-наборы и приборы фирм производителей Promega [1,15,17], Applied Biosistem [2], реактивы фирм Sigma [14,17,18], Bio-Red [14,18,22].

Кроме того, на российском рынке предлагается широкий ряд сорбентов для выделения ДНК после этапа лизинга клеточных структур.

Существующие в настоящее время коммерческие наборы для выделения ДНК на основе обратимой сорбции молекул ДНК на мелкодисперсных частицах стекла в буферах содержат высокие концентрации йодистого натрия, перхлората натрия и солей гуанидина [19-20].

В целом, предлагаемые наборы для выделения ДНК по составу практически идентичны, различие может заключаться только в концентрациях активных веществ, элюирующих растворов, типах и структуре сорбентов [21-24]. Наборы, позволяющие выделять ДНК из биологических объектов с высоким выходом и высокой степенью чистоты и используемые в медицинской практике для диагностических целей, содержат в качестве отмывочного буфера 80%-ный этиловый спирт и в качестве сорбента – силикагель [25-26].

Ряд реагентов, используемых в медицине для исследований ДНК, и производящих их фирм может быть продолжен, используемые наборы реагентов и приборов для ДНК-анализа в судебной экспертизе ограничиваются, как правило, уже упоминавшимся списком [1-2,14-15, 17-18, 22].

Усовершенствование методов извлечения и анализа ДНК идет по направлению модернизации аппаратного оформления. Так, организациям, осуществляющим ДНК-анализ, компания «Thermo Fisher Scientific» предлагает уникальные автоматизированные системы «KingFisher», отвечающие запросам исследовательских и клинических лабораторий.

Благодаря использованию революционной запатентованной технологии магнитной сепарации системы «KingFisher» позволяют обрабатывать любые образцы – белки, нуклеиновые кислоты и клетки, отобранные практически из любой среды, включая кровь, клеточные культуры, тканевые лизаты, почву и фекалии, с гарантированной сохранностью образцов. Невероятно высокая скорость - обработка 96 образцов занимает менее 15 минут [27].

Поль Ли и его коллеги из Университета Саймона Фрейзера в Барнаби (Канада) объединили ДНК-микрочип с микрожидкостным устройством, которое используется для сверхточного контроля жидкости на наноуровне. Новое комбинированное устройство может использоваться для обнаружения и исследования ДНК. В процессе наночастицы золота, взвешенные в жидкости с ДНК, как мини-магниты притягивают соответствующие нити цепочки ДНК. После нагрева раствора наночастицы золота "тащат" нити в разные стороны и разделяют ДНК на фрагменты, пригодные для изучения оборудованием. ДНК-чип размером с ладонь и толщиной приблизительно с монету.

Новый метод позволяет определить наличие и принадлежность ДНК за один час при комнатной температуре и без использования сложного нагревательного оборудования.

ДНК-микрочипы сегодня являются одним из наиболее мощных инструментов в области молекулярной биологии. Они могут использоваться для исследования биологических образцов, выявления определенных генов или генетических последовательностей и применяются во многих областях: от судебно-медицинской экспертизы до диагностики заболеваний и разработки лекарств. Устройство канадского ученого максимально реализует их возможности и позволяет значительно облегчить работу с ДНК [18].

Таким образом, в современной криминалистике по извлечению ДНК из биотканей наиболее часто используют два метода: фенольный и с помощью ионообменной смолы Chelex 100. Данные методы за годы применения зарекомендовали себя как наиболее надежные методы получения незагрязненных и неповрежденных образцов ДНК.

Более широкий ряд методов извлечения ДНК из биологических объектов используется в медицине. В областях науки, связанных с проведением исследований «древних» ДНК, в частности, при идентификации останков древних людей, при изучении возможностей клонировать древних живых организмов, в основном используются стандартные методы, но в связи со специфичностью исследуемых материалов, однако, часто ставится вопрос, о пригодности некоторых методов извлечения ДНК из костных тканей и зубов.

В нашей стране представлен широкий ряд российских и зарубежных фирм, предлагающих стандартные наборы и оборудование для проведения каждого этапа ДНК-анализа. Усовершенствование приборного оформления ДНК-анализа, как для медицинских целей, так и для судебной экспертизы, основывается на достижениях в сферах развития компьютерных и физико-химических технологий.

Современный уровень развития науки не снижает значимости вопросов, связанных с исследованием молекулярных носителей генетической информации, решение которых требуют поиск и создание новых более эффективных методов извлечения ДНК, позволяющих с наименьшими временными затратами извлекать чистые, неповрежденные экземпляры даже из материалов, представленных следовыми количествами.

## ПРИМЕЧАНИЯ

1. Пименов М.Г. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие / М.Г. Пименов, А.Ю. Культин, С.А. Кондрашов. – ГУ ЭКЦ МВД России. – 2001. – 144 с.
2. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел / И.В. Корниенко, Д.И. Водолажский, В.П. Вейко [и др.]. – Ростов-на-Дону: ООО «Росиздат». – 2001. – 256 с.
3. DNA Analyst Training. – <http://www.nfstc.org/pdi/>
4. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984.
5. Walsh P.S. Chelex100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques*. – 1991. – V.10., N 4. – P. 506-513.
6. Rasmussen T.B. Boom-silica RNA extraction / T.B. Rasmussen – 2008. – <http://www.molmeth.org/protocols/L4XNQ1>
7. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans [et al.]. – 1990. – <http://www.molmeth.org/>.
8. Stewart T.L. Extraction of nucleic acids from bone / T.L. Stewart, V. Mann. // *Bone Research Protocols: Methods in Molecular Medicine*. – 2003. – V.80. – P. 425-432.
9. Разводовская М. Всё ли мы знаем о судьбе царской семьи Николая II Романова? / М. Разводовская – Copyleft, Marinais. – 1998. – <http://cyberhome.j3.gfn.net/oth/marinais/romanov.shtm>.
10. Cheryl J. Researchers to drill for hobbit history / J. Cheryl. // *Nature*. Published online 5 January, 2011. – <http://www.nature.com/news/2011/110105/full/news.2011.702.html>.
11. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. / C.J. Adler [et al.] // *Journal of Archaeological Science*. – 2010. – <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>.
12. Paleo-Eskimo mtDNA Genome Reveals Matrilineal Discontinuity in Greenland. / M.T.P. Gilbert [et al.] // *Science*. Published Online May 29, 2008. – DOI: 10.1126/science.1159750.
13. Amplification and sequencing of DNA from a 120–135-million-year-old weevil. / R.J. Cano, H.N. Poinar, N.J. Pieniazek [et al.] // *Nature*, 363. – 1993. – P. 536-538. – doi:10.1038/363536a0.
14. Fossil avian eggshell preserves ancient DNA / C.L. Oskam, J. Haile, E. McLay [et al.] // *The Royal Society*. Published Online February 19, 2010. – <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2010/03/09/rspb.2009.2019>.
15. Иванов П.Л. Индивидуализация человека и идентификация личности: молекулярная биология в судебной экспертизе / П.Л. Иванов // *Вестник Российской Академии Наук*. – 2003. – Т. 73, № 12. – С. 1085-1097.
16. Маркина М. Мумия подсказала, как извлечь ДНК из кости / М. Маркина // 02 декабря 2008. – <http://www.infox.ru/science/lab/2008/12/02/mummy.phtml>.
17. Грачев М.А., Кузнецова С.Ю., Щербакова Т.А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции. (A Method

- for the Isolation of Pure DNA for PCR) / М.А. Грачев, С.Ю. Кузнецова, Т.А. Щербакова // Молекулярная биология. – 2006. – V. 40, № 1. – С. 180-183.
18. Wang L., Li P.C.H. Gold nanoparticle-assisted single base-pair mismatch discrimination on a microfluidic microarray device / L. Wang, P.C.H. Li // Biomicrofluidics. – 2010. – V. 4. – P. 032209 (9 pages). – doi:10.1063/1.3463720.
  19. Vogelstein B., Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1979. – V.76. – P. 615-619.
  20. Extraction of cellular DNA from crude cell lysate with glass / J.D. Thompson, K.K. Cuddy [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1990. – V. 18. –P. 1074.
  21. The GENE CLEAN Kit. – <http://www.bio101.com/cat/4141/822/geneclean-for-ancient-dna>.
  22. Prep-A-Gene DNA Purification Kit. 1990. Bio-Rad Laboratories. –<http://www3.bio-rad.com>.
  23. Life Technologies. – <http://www.beta.invitrogen.com/site/us/en/home.html>.
  24. S&S Elu-Quik DNA Purification Kit. 1991. – <http://www.schleicher-schuell.com>.
  25. Набор для выделения ДНК / В.И. Евтушенко. – № 2116795. – заявл. 10.07.1996, опубл. 10.08.1998. – <http://ru-patent.info/21/15-19/2116795.html>.
  26. Biokom. – <http://www.biokom.ru/cont/set.html>
  27. Автоматизированные процессоры магнитных частиц KingFisher // <http://www.ld.ru/catalog/ilist-3943.html>.