

ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА НА ЭТАПЕ ИЗВЛЕЧЕНИЯ МОЛЕКУЛ ДНК ИЗ КОСТНЫХ ТКАНЕЙ ОСТАНКОВ ЧЕЛОВЕКА

WAYS OF IMPROVING CRIMINALISTIC DNA ANALYSIS AT THE STAGE OF EXTRACTING DNA MOLECULES FROM BONE TISSUES OF HUMAN REMAINS

**I. Badzyuk
E. Larionova
Yu. Golodkov**

Summary. When conducting forensic DNA analysis, one of the steps is to extract DNA from materials submitted for examination. The success of all subsequent stages of DNA research depends on the quality of the execution of this procedure. When choosing a method, it is necessary to take into account a number of factors: the type of object, its state, the duration of its formation and storage conditions, therefore, research and analysis of modern methods for extracting DNA from various biological objects are of particular relevance. The paper presents an analysis and comparison of modern methods for extracting DNA from human bone tissue of human remains and the possibility of their use in forensic DNA analysis.

Keywords: DNA analysis, nucleic acids, extraction methods, bone tissue, forensic examination..

Бадзюк Ирина Леонидовна

*К.х.н., доцент, ФГКОУ ВО «Восточно-Сибирский институт МВД РФ» (г. Иркутск)
demy@bk.ru*

Ларионова Елена Юрьевна

*Д.х.н., профессор, ФГКОУ ВО «Восточно-Сибирский институт МВД РФ» (г. Иркутск)
lari555@mail.ru*

Голодков Юрий Эдуардович

*К.т.н., Иркутский национальный исследовательский технический университет (г. Иркутск)
yrg27@mail.ru*

Аннотация. 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. При выборе метода необходимо учитывать целый ряд факторов: вид объекта, его состояние, давность образования и условия хранения, поэтому особую актуальность приобретают исследование и анализ современных методов извлечения ДНК из различных биологических объектов. В работе приведен анализ, сравнение современных методов извлечения ДНК из костных тканей останков человека и возможность их применения в криминалистическом ДНК-анализе.

Ключевые слова: ДНК-анализ, нуклеиновые кислоты, методы извлечения, костная ткань, судебная экспертиза.

Современные технологии исследования ДНК позволяют успешно исследовать практически все ткани и биожидкости организма человека, содержащие ДНК, что способствует развитию и совершенствованию методов криминалистического ДНК-анализа [1]. В частности, на сегодняшний день возможно изучение и извлечение ДНК при работе с микроколичеством биоматериала и со смешанными следами.

Методики извлечения ДНК из биологических тканей при производстве судебных экспертиз во всем мире одинаковы и эффективность их применения подтверждена несколькими десятилетиями. Известно, что в судебно-экспертной практике доказательной базой могут быть результаты экспертиз, выполненных только по утвержденным и апробированным методикам. Поэтому разработка и внедрение новых методов и методик в проведении любых экспертиз очень сложный и длительный процесс. Тем не менее, в практике су-

дебной экспертизы известны примеры применения новых нетрадиционных и неутвержденных методик, в частности, в работе экспертов П. Иванова и П. Гилла [2], проводивших идентификацию царских останков семьи Романовых, заявлено об использовании новой методики извлечения ДНК из существенно «поврежденных» биологических тканей. Однако, из-за отсутствия в опубликованных результатах конкретного описания использованной методики и ссылок на ее апробацию, многие исследователи данного направления ставят под сомнение достоверность результатов упомянутого метода проведения ДНК-анализа. Так или иначе, со временем любая утвержденная и зарекомендовавшая себя за десятилетия методика требует внесения изменений и усовершенствований в соответствии с требованиями современных технологий и запросов общества.

Значительно большими возможностями по усовершенствованию методик извлечения ДНК из биотканей

обладают палеонтологи и археологи в отличие от экспертов. Исследования ДНК останков древних живых организмов, в том числе, человека, являются по сути криминалистическим ДНК-анализом. Несмотря на то, что методики извлечения ДНК из запечатанных в янтарь останков древних живых организмов и из яичной скорлупы динозавров и древних птиц [3–4] «в чистом виде» не пригодны для проведения криминалистического ДНК-анализа человека, однако, из указанных работ эксперты могут извлечь полезные моменты для усовершенствования методик ДНК-анализа в судебной экспертизе.

Практический характер в сфере биологических судебных экспертиз может иметь опыт ученых по извлечению ДНК из останков древних людей. В результате исследований [5], мумия «научила» биологов-криминалистов из Университета в Нью-Хейвене (University of New Haven), штат Массачусетс новому способу обработки костной ткани для извлечения ДНК. Эта технология, считают авторы, позволяет упростить и ускорить их повседневную работу по ДНК-типированию. Из мумифицированных костных останков, найденных в пустыне Гоби, доктор Хитер Кул (Dr. Heather Coyle) на редкость быстро и успешно извлекла ДНК. По стандартной процедуре перед экстракцией ДНК образец кости замораживают и измельчают. В случае с мумией исследователи потерпели неудачу, применив тот же метод при изучении костей неопознанного скелетированного трупа. Причина неудач была выяснена позже. Кости мумии в пустыне Гоби подвергались естественному спеканию в раскаленном песке, что делало костную ткань более хрупкой, поэтому ее было легче разрушить и получить доступ к клеткам с содержащейся в них ДНК. В лаборатории были воспроизведены природные условия. Вместо раскаленного песка образец кости запекали в жаровом шкафу в течение 72 часов. Затем образец в специальном аппарате подвергали измельчению с жидким азотом, в результате кость преобразовалась в порошок, из которого легко извлекалась ДНК.

Полезными являются исследования по совершенствованию методики извлечения ДНК из зуба древних останков, возрастом 18 тысяч лет, найденных в пещере Ляг Буа на острове Флорес (Индонезия) в 2003 году, послужившие основой для описания нового вида гоминид — *Homo floresiensis*. Коллектив ученых, под руководством Кристины Адлер, генетиком из Австралийского центра древней ДНК (ACAD) при Университете Аделаиды, пришел к выводу, что причиной предыдущих неудач по извлечению ДНК из древних зубов является несовершенство стандартных процедур извлечения ДНК [6].

Адлер и ее коллеги сравнили, какое воздействие оказывают на образец различные методы извлечения митохондриальной ДНК (мтДНК). С этой целью было исследо-

вано 42 древних образца со всего мира (останков людей и животных, возрастом до 7 500 лет). Результаты этого исследования опубликованы в *Journal of Archaeological Science* в ноябре 2010 г. На данном этапе ученые смогли сделать следующие выводы. Во-первых, при извлечении мтДНК из древних зубов целесообразно добраться до дентина, внутренней ткани зуба. Но, по мнению авторов, зубной цемент, или корешковая кора (т.е. ткань, покрывающая корни зуба), содержит в 5 раз больше мтДНК, чем дентин.

Во-вторых, чтобы извлечь ДНК, часто использовалось сверление на высокой скорости (считается, что такой метод сводит повреждения образца к минимуму). Исследование показало, что на высоких скоростях (более 1000 оборотов в минуту) выделяемое тепло разрушает ДНК, приводя к снижению результативности в 30 раз. Для сохранения структуры ДНК в корешковой коре ученые рекомендуют осуществлять сверление зуба на меньшей скорости, например, 100 оборотов в минуту.

Адлер считает, что новая методика позволит добыть ДНК из многих древних образцов, с которыми раньше результат не был получен. Однако некоторые ученые не разделяют ее оптимизма. Так, Мэтью Коллинз, специалист из Йоркского университета (Великобритания), считает, что температура на месте раскопок всё-таки слишком велика, и молекулы ДНК в зубе мумии-«хоббита», должны быть подвергнуты разрушению. Исследователи же не теряли надежды. С помощью новой методики они смогли извлечь мтДНК из зуба свиньи возрастом в 6000 лет, найденной на Флоресе в 2007 году [6]. Однако, с 2010 г. новые данные об этом исследовании отсутствуют.

Также интересен опыт ученых по извлечению ДНК из скорлупы древних динозавров и птиц. Так, палеонтологи из Австралии и Новой Зеландии смогли получить ДНК из скорлупы птичьих яиц, пролежавших в земле от нескольких столетий до нескольких сотен тысяч лет [4]. Исследователям удалось выделить как митохондриальную, так и ядерную ДНК из ископаемой скорлупы птиц различных видов, среди которых преобладали представители надотряда бескилевых — крупных нелетающих птиц.

Для того чтобы экстрагировать ДНК из скорлупы, ученые применили стандартную методику, использующуюся и для извлечения ДНК из костей, но с некоторыми изменениями. Если обычно большую часть извлеченного из образца карбоната кальция выбрасывают, то в данном случае ученые использовали в дальнейших исследованиях и его, предположив, что внутри плотных известковых слоев ДНК сохранилась лучше всего. Их предположения оправдались.

Значительный опыт по разработке и усовершенствованию методов извлечения ДНК накоплен биологами Лимнологического института СО РАН г. Иркутска при работе с мягкими тканями и биожидкостями обитателей озера Байкал. В частности, авторы работы [7] предлагают усовершенствовать «цетавлоновый метод», с целью получения очищенных ДНК, без примесей ингибирующих ПЦР-реакцию.

«Цетавлоновый метод» основан на осаждении в водных растворах цетавлоновых солей нуклеиновых кислот (цетавлон — коммерческое название бромистого гексадецилтриметиламмида). В результате стандартной процедуры осуществления данного метода, получают образцы ДНК, которые сильно загрязнены белковыми молекулами и полисахаридами. Для получения чистой ДНК исследователи вынуждены использовать дополнительное фракционирование (экстракция фенолом в сочетании с другими растворителями или хроматография). Иркутские ученые в своих исследованиях [7] предлагают для получения пригодного для амплификации материал

более простой способ фракционирования, основанный на свойстве цетавлоновых солей растворяться в спирте.

Анализ существующих методов извлечения ДНК, применяемых в различных научных областях, демонстрирует необходимость индивидуального подхода к каждому исследуемому объекту в зависимости от его специфических свойств. В данной работе основной акцент сделан на методики и их усовершенствование извлечения ДНК из костных тканей, так как данный вид биоматериала обладает лучшими защитными свойствами от агрессивной окружающей среды носителей наследственной информации живых существ. Каждая рассмотренная методика в данной работе является практическим подтверждением эффективности и состоятельности используемых новшеств, вносимых в традиционные методики при работе с ДНК. Приведенные современные подходы для извлечения молекул ДНК являются частными этапами апробации методик и впоследствии становятся доказательными фактами результативности их применения в качестве методик ДНК-анализа в судебной экспертизе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бадзюк И. Л., Голодков Ю. Э., Ларионова Е. Ю. Анализ современных методов извлечения ДНК из биологических объектов судебной экспертизы // Вестник Восточно-Сибирского института Министерства внутренних дел России. — 2012. — № 1 (60). — С. 81–89.
2. Разводовская М. Всё ли мы знаем о судьбе царской семьи Николая II Романова? — Copyleft, Marinais. — 1998. — <http://cyberhome.j3.gfn.net/oth/marinais/romanov.shtml>.
3. 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.
4. 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>.
5. Маркина М. Мумия подсказала, как извлечь ДНК из кости. // 02 декабря 2008. — <http://www.infox.ru/science/lab/2008/12/02/mummy.phtml>.
6. 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>.
7. Грачев М. А., Кузнецова С. Ю., Щербакова Т. А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакцию. (A Method for the Isolation of Pure DNA for PCR). // Молекулярная биология. — 2006. — V. 40, № 1. — С. 180–183.

© Бадзюк Ирина Леонидовна (demy@bk.ru),

Ларионова Елена Юрьевна (lari555@mail.ru), Голодков Юрий Эдуардович (yrg27@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»