

Молекулярно-генетический анализ митохондриальной ДНК в обожженных костях: еще раз о пределах возможного

К.м.н. Е.Ю. ЗЕМСКОВА¹, к.м.н. М.М. БОРДЮКОВ¹, д.м.н., проф. А.В. КОВАЛЕВ^{1,2}, д.б.н., проф. П.Л. ИВАНОВ¹

¹Отдел молекулярно-генетических экспертиз (исследований) Российского центра судебно-медицинской экспертизы (дир. — д.м.н. А.В. Ковалев) Минздрава России, Москва, Россия, 125284; ²кафедра судебной медицины (зав. — к.м.н., доц. А.Ф. Кинле) Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Россия, 125993

Представлено иллюстративное исследование, продолжающее дискуссионный цикл о возможности получения достоверной генетической информации из обожженных костных объектов. Изучали аналитическую пригодность экспериментальных обожженных костных объектов для генотипирования митохондриальной (мт)ДНК с применением стандартной судебно-экспертной методики анализа полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ППАФ) мтДНК путем секвенирования с флуоресцентной детекцией. Показано, что приемлемое для генотипирования состояние мтДНК наблюдается в препаратах, полученных из костной ткани, подвергшейся только достаточно «мягкой» термической обработке, когда кость по внешнему виду почти не отличается от нативной. В случаях более «жесткого» температурного воздействия, когда кость демонстрирует выраженные внешние признаки термического воздействия, костную ткань следует признать заведомо непригодной для генотипирования мтДНК. Установили, что хромосомная ДНК уступает в аналитической устойчивости мтДНК. Это соответствует устоявшимся представлениям, однако, с точки зрения эффективности генотипирования, это преимущество мтДНК относительно невелико.

Ключевые слова: судебная молекулярно-генетическая экспертиза, генетическая идентификация, анализ митохондриальной ДНК в обгоревших костных останках.

The molecular-genetic analysis of mitochondrial DNA from the burnt bones: «the limits of the possible» problem revisited

E.YU. ZEMSKOVA¹, M.M. BORDYUKOV¹, A.V. KOVALEV^{1,2}, P.L. IVANOV¹

¹Department of Molecular-Genetic Expertise, Russian Federal Centre of Forensic Medical Expertise, Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia, 125284; ²Department of Forensic Medicine, Russian State Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of the Russia, Moscow, Russia, 125993

The authors report the results of the demonstrative study continuing the cycle of interactive discussions pertinent to the possibility of obtaining reliable genetic information from the analysis of burnt bone fragments. Special emphasis is placed on the worthiness of these materials for genotyping of mitochondrial DNA (mtDNA) with the use of the standard analytical methods employed for the purpose of forensic medical expertise to investigate into the length polymorphism of the amplified mtDNA fragments (PAF) by means of sequencing with fluorescent detection. The study has demonstrated that the mtDNA fragments in the state suitable for genotyping can be found only in the preparations from the bone tissue exposed to the «mild» thermal impact after which the affected bone is virtually indistinguishable from the native one as far as the outward appearance is concerned. In the cases of a more rigorous thermal impact when the bone tissue exhibits well pronounced signs of heat destruction, it should be considered as inherently unsuitable for genotyping of mtDNA. It was shown that chromosomal DNA is inferior to mtDNA in terms of heat resistance. This finding agrees with the currently adopted view, however this advantage of mtDNA is relatively insignificant from the standpoint of genotyping efficiency.

Keywords: forensic molecular-genetic expertise, genetic identification, analysis of mitochondrial DNA in burn bone fragments.

Опубликованная ранее работа [1] посвящена дискуссионному вопросу о возможности получения достоверной генетической информации из обожженных костных объектов. Приведенные в ней данные заставили усомниться в возможности типирования полиморфизма хромосомной ДНК в реально обожженных костях (по крайней мере, при использовании типовых судебно-экспертных методик).

Настоящая работа была выполнена с целью дополнить эти исследования изучением митохондриальной (мт) ДНК в обожженных костных объектах.

МтДНК отличаются моноклональной природой, высокой копийностью в клетке и матрицей наследованием. Этими свойствами обусловлены специфика и особая ценность генотипирования мтДНК как судебно-экспертного методического подхода. Это позволяет решать идентифи-

¹e-mail: zemskova@rc-sme.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2669-0877>

^{1,2}e-mail: mail@rc-sme.ru;
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6740-9861>

кационные задачи в случае, если оказываются недостаточно информативными индивидуализирующие признаки, определяемые на уровне хромосомной ДНК: при очень малом количестве анализируемого генетического материала или если генетическая дистанция, разделяющая устанавливаемых родственников, оказывается больше, чем одно поколение.

По этим показателям молекулярно-генетическое исследование в формате генотипирования мтДНК в ряде случаев рассматривается как потенциально более успешная альтернатива генотипированию хромосомной ДНК. Например, при идентификации жертв чрезвычайных ситуаций с массовыми жертвами, когда имеется возможность только не прямой молекулярно-генетической идентификации путем использования в качестве референтных объектов биологических образцов от родственников устанавливаемых лиц. Нередко в подобных случаях идентифицируемые биологические объекты представляют собой обгоревшие костные останки.

Авторы ознакомились с экспертизой, выполненной в рамках расследования крупной авиакатастрофы. В ней утверждалось, что экспертам удалось установить локальный генотип мтДНК в сильно обожженных костных фрагментах (в состоянии черного каления!). Поверить в такое трудно. Кроме того, представленные в этой экспертизе данные, призванные свидетельствовать об истинности результата, не выглядят убедительными. Эти сомнения не должны остаться без внимания, так как ошибочные представления по поводу возможности или невозможности добыть достоверную генетическую информацию из обожженных костных останков могут спровоцировать крайне негативные последствия.

Чтобы прояснить данный вопрос (прежде всего в прикладном аспекте), было предпринято демонстрационное исследование. Как и в работе о хромосомной ДНК [1], эксперимент планировали таким образом, чтобы максимально приблизиться к экспертной практике. Эксперту-генетику не известно, при какой температуре и сколько времени обгорали останки, а есть конкретные кости, которые имеют те или иные характерные внешние признаки термического воздействия, и хотелось бы знать, какому результату при их генотипировании можно доверять.

Материал и методы

Объектом исследования послужила правая бедренная кость от эксгумированных останков мужчины из которой изъяти фрагмент проксимального отдела. Давность захоронения 8 лет. Кость в хорошем состоянии (**рис. 1 на цв. вклейке**). Наиболее вероятный биологический возраст (30—39 лет), диагностированный по состоянию возрастных изменений при визуальном и рентгенологическом исследовании.

Предварительно костный фрагмент очистили от поверхностных наложений, из отделенного фрагмента диафизной части сделали выпилы примерно равной массы около 0,6—1,0 г (**рис. 2 на цв. вклейке**). Несколько фрагментов оставили интактными, остальные подвергли прокаливанию в электропечи СНОЛ 6/11-В,000 («Техно-терм», Россия) при разных температуре и времени для моделирования того или иного заданного эффекта внешнего вида.

Затем костные фрагменты измельчили с помощью вибромельницы Tissue Lyser II («Qiagen», Германия) в ре-

жиме 30 Гц/20 с; полученный костный порошок лизировали в течение 2 ч при температуре 56 °С в присутствии PrepFiler® BTA Lysis Buffer («Applied Biosystems», США), дитиотрейтола и протеиназы К («Qiagen», Германия).

Далее выделили суммарную ДНК с применением сорбентной технологии на роботизированной станции Automate Express DNA Extraction System («Applied Biosystems», США) штатным набором реактивов PrepFiler Express Forensic DNA Extraction Kit («Applied Biosystems», США). Полученные препараты использовали в качестве матричных препаратов ДНК для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Матричную активность мтДНК в препаратах и генотипирование двух полиморфных локусов ГВС-1 и ГВС-2 в области D-петли мтДНК проводили путем энзиматической амплификации указанных локусов с использованием набора реагентов MitoPlex (ООО «Гордиз», Россия) и последующего прямого секвенирования флюоресцентно меченных амплификационных продуктов с помощью набора реагентов Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Продуктивность ПЦР регистрировали в режиме реального времени с использованием специализированного амплификатора ABI 7500 Real Time PCR System («Applied Biosystems», США) и программного обеспечения MitoPlex (ООО «Гордиз», Россия). Продукты секвенирующих реакций фракционировали электрофоретически с помощью системы капиллярного электрофореза ABI 3500 («Applied Biosystems», США).

Результаты и обсуждение

С учетом изучения аналитической пригодности обожженных костных объектов для генотипирования хромосомной ДНК подобрали режимы прокаливания фрагментов исходной кости в муфельной печи. Подбор температурно-временных параметров осуществляли исходя из общих представлений о возможном минимальном времени обгорания при реальном происшествии (не менее 1 ч) и из желаемого визуального эффекта: смоделировать внешний вид обгоревших костей, который соответствовал бы типичной картине при различной степени термического повреждения.

Таким образом, путем контролируемой термической обработки подготовили фрагменты кости с характерными узнаваемыми внешними признаками озоления различной степени вплоть до состояния обугливания, серого и белого каления.

Для эксперимента отобрали 5 объектов (**см. таблицу**). На основании результатов ранее выполненного исследования [1] отобрали объекты, которые прошли относительно мягкую термическую обработку, при которой внешне кость мало отличается от нативной. Более жесткое воздействие: обугливание, черное, серое и белое каление — для начального этапа данного исследования признано нецелесообразным).

На **рис. 2** показаны костные фрагменты до и после термообработки.

Из экспериментальных фрагментов получили препараты суммарной клеточной ДНК и выполнили генотипирование мтДНК в форме анализа полиморфизма последовательности амплифицированных фрагментов (ППАФ) двух полиморфных локусов ГВС-1 и ГВС-2 в области D-петли мтДНК.

Параметры термической обработки костных образцов

№ объекта	Масса до воздействия, г	Масса после воздействия, г	Зольность, %	Воздействие	t max, °C	Общее время термического воздействия, ч	Внешний вид кости после воздействия
1	0,4669	—	—	Нет воздействия	—	—	Нативная кость, светло-светло-желтая
13	0,5666	0,5396	95,30	Нагрев 25—150 °C 30 мин Инкубация при 150 °C 2 ч	150	2,5	По виду нативная, светло-желтая
14	0,4948	0,4645	93,88	Нагрев 25—200 °C 30 мин Инкубация при 200 °C 1 ч	200	1,5	По виду нативная, светло-желто-коричневая
4	1,4303	1,2914	90,29	Нагрев 25—250 °C 30 мин Инкубация при 250 °C 1 ч	250	1,5	В средней части светло-коричневая, сверху и снизу темно-коричневая
7	1,5538	1,0887	70,07	Нагрев 25—400 °C 30 мин Инкубация при 400 °C 1 ч	400	1,5	Равномерно черная, поверхность слегка сероватая

Генотипирование выполняли по обычной двухэтапной схеме: I этап — энзиматическая амплификация указанных локусов с использованием флюоресцентно меченых праймеров; II этап — прямое секвенирование флюоресцентно меченых амплификационных продуктов.

I этап — энзиматическую амплификацию полиморфных локусов ГВС-1 и ГВС-2 мтДНК (область карты 15990—16431 и 00029—00408 соответственно) осуществляли в формате ПЦР в реальном времени (RT-PCR) с применением специализированного амплификатора ABI 7500 Real Time PCR System («Applied Biosystems», США) и реагентов и программного обеспечения MitoPlex (ООО «Гордиз», Россия). Результаты (рис. 3 на цв. вклейке) представлены на графиках кинетики энзиматической амплификации в RT-PCR полиморфного участка мтДНК ГВС-2 в 5 препаратах, полученных из всех пяти экспериментальных объектов. Для сравнения представлены также результаты контрольных экспериментов.

Для каждой реакции амплификации определены значения Ct — так называемый пороговый цикл, или цикл, в котором регистрируется начало лог-фазы полимеразной реакции (см. на рис. 3, соответствующие значения показаны стрелками). Следует отметить, что в аналитической системе RT-PCR именно на основании определения величины Ct осуществляется оценка матричной активности ДНК (опосредованно оценка эффективной концентрации ДНК, т.е. содержания ПЦР-активных ДНК-матриц). На рис. 3, а приведен график продуктивности ПЦР на матрице мтДНК для препарата, полученного из интактной кости. Кинетика наработки амплификационного продукта (матричная активность мтДНК) практически не отличается от таковой контрольной высокомолекулярной ДНК (см. рис. 3, б): Ct @22.

После нагревания при температуре 150 °C в течение 2,5 ч (объект 13) матричная активность мтДНК заметно снижается: Ct около 28. Теоретически такое увеличение значения Ct соответствует снижению продуктивности ПЦР примерно в 60 раз.

С возрастанием температуры и длительности термического воздействия матричная активность мтДНК резко падает (см. рис. 3, г—е): при прогреве до температуры 200 °C в течение 1,5 ч (объект 14) Ct — 32, а для кости с начальными визуальными признаками термического воздействия (объект 4: 250 °C/1,5 ч), значение Ct составляет уже 35 (см. рис. 3, д). Если сравнивать с препаратом ДНК интактной кости, то теоретически это значит, что вследствие указанных температурных воздействий эффективная концентрация мтДНК (содержание ПЦР-активных ДНК-матриц) в объектах 14 и 4 заметно уменьшилась — по расчету более чем в 1000 и в 8000 раз соответственно.

Для кости в состоянии выраженного обгорания (начальная стадия обугливания — объект 7: 400 °C/1,5 ч) Ct достоверно не определяется, и кинетика наработки амплификационного продукта мтДНК практически не отличается от контрольного препарата, в котором заведомо не содержится ДНК (см. рис. 3, е, ж). Такой результат косвенным образом указывает на то, что в этом препарате пригодная для анализа мтДНК не сохранилась.

Чтобы непосредственно оценить, насколько критичным является снижение продуктивности ПЦР, с точки зрения пригодности полученного амплифицированного продукта мтДНК для генотипирования, на II этапе выполнили секвенирование всех экспериментальных препаратов.

Полученные результаты представлены на **рис. 4 (см. на цв. вклейке)**: для каждого исследованного костного объекта показан небольшой участок (позиции 16130—16390) расшифрованной нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК в области полиморфного сегмента ГВС-1 в том виде, в котором он визуализируется на секвенсограмме.

Секвенсограмма объекта 13 визуально очень похожа на секвенсограмму нативной кости (**см. рис. 4, а, б**). Генотипы (в данном случае митотипы) этих объектов идентичны. Это означает, что прогрев при температуре 150 °С в течение 2,5 ч в принципе не является критичным для успешного генотипирования мтДНК в костной ткани. Следует отметить, что такое воздействие в несколько раз снижает чувствительность и качество анализа, которые напрямую коррелируют со снижением продуктивности ПЦР. Разница в качестве секвенирования наглядно показана на **рис. 5 (см. на цв. вклейке)**, где в отличие от **рис. 4** соблюден масштаб интенсивности сигнала.

При увеличении температуры до 200 °С и ее воздействии на кость на протяжении 1,5 ч (объект 14) (**см. рис. 4, в**) качество секвенирования заметно ухудшается: визуально это воспринимается как множественные неупорядоченные наложения сигналов отдельных нуклеотидов. Такая картина отражает термическую деградацию матричной ДНК (в данном случае это мтДНК) и потерю ею нативной структуры. В результате обширные участки нуклеотидной последовательности становятся на секвенсограмме проблемными, условно говоря «трудночитаемыми» или даже «нечитаемыми».

Дальнейшее увеличение температуры еще на 50 °С (объект 4: 250 С/1,5 ч) (**см. рис. 4, г**) приводит к тому, что качество секвенирования становится неприемлемо низким. Генетическая информация утрачена до такой степени, что установить генотипические признаки мтДНК (митотип) в таком препарате невозможно, при этом сама кость внешне лишь незначительно изменилась по сравнению с нативной (**см. рис. 2**).

В объекте 7 (**см. рис. 4, д**) генетическая информация мтДНК утрачена полностью (этот костный фрагмент подвергся термическому воздействию 400 °С/2 ч и представляет начальную стадию обугливания (**см. рис. 2**)). Такая кость совершенно непригодна для генотипирования мтДНК.

Результаты генотипирования мтДНК в объектах 4 и 7 хорошо согласуются с результатами определения в них матричной активности мтДНК; это независимо подтверждает достоверность всех полученных данных.

Заключение

Таким образом, в эксперименте приемлемое для генотипирования состояние мтДНК наблюдалось только в препаратах, полученных из костной ткани, подвергшейся достаточно «мягкой» термической обработке — 150 С/2,5 ч (объект 13).

В кости, прогретой при температуре 200 °С, на протяжении даже относительно небольшого времени (1,5 ч), мтДНК демонстрирует уже настолько высокую степень деградации, что установить ее достоверный генетический профиль (митотип) практически невозможно, причем сама кость по внешнему виду почти не отличается от нативной (объект 14).

В судебно-экспертном аспекте эту область термического воздействия на кость следует рассматривать как потенциально опасную. При генотипировании такой дегра-

дированной мтДНК с применением стандартных судебно-экспертных методик анализа ППАФ [3] участки нуклеотидной последовательности часто оказываются не просто «нечитаемыми», но, что гораздо хуже, «ложночитаемыми»: митотип определяется неправильно, с ошибками. Наглядный пример ошибки генотипирования приведен на **рис. 6 (см. на цв. вклейке)**. Детально показаны 2 варианта «прочтения» одного и того же участка мтДНК в препаратах нативной кости и кости, прогретой при температуре 200 °С в течение 1,5 ч. Во втором случае митотип формально установлен, но фактически являет собой ложно определенный признак, недостоверный и несвойственный анализируемой мтДНК.

Еще раз следует подчеркнуть, что эта опасность скрытая: такое термическое воздействие визуально может быть малозаметным. Если кость демонстрирует хотя бы минимальные внешние признаки термического воздействия, такой объект экспертизы требует к себе повышенного внимания.

Можно утверждать, что результатом любого более «жесткого» температурного воздействия на костную ткань (свыше 200 °С/1,5 ч) будет ее заведомо полная непригодность для генотипирования мтДНК (это иллюстрирует секвенсограмма объекта 4: 250 °С/1,5 ч) (**см. рис. 4, г**). Как уже отмечалось, в костных фрагментах, находящихся на стадии обугливания (тем более в состоянии серого и белого каления), генотипировать мтДНК, равно как и хромосомную ДНК, бессмысленно [1]. Такие объекты следует признавать заведомо непригодными для анализа, поскольку установить их достоверный генетический профиль практически невозможно.

Интересно отметить, что, согласно полученным данным, в плане генотипирования хромосомная ДНК уступает в аналитической устойчивости мтДНК. Это соответствует устоявшимся представлениям.

Так, при генотипировании хромосомной ДНК полный и достоверный 24-локусный STR-профиль продемонстрировал только костный фрагмент, прогретый при температуре 150 °С в течение 1 ч. При увеличении времени действия температуры 150 °С до 3 ч наблюдали потерю истинных аллелей и появление ложных аллелей, искажение генотипа. Установить достоверно полный генетический профиль в таком объекте оказалось невозможным (устойчивые результаты дали только 8 из 24 локусов). Эти результаты, полученные в предыдущей работе [1], относятся к объекту 13.

В данной работе тот же самый объект 13, напротив, продемонстрировал свою пригодность для достоверного генотипирования мтДНК.

Можно предположить, что эта разница объясняется более высокой копийностью (и обусловленной ею более высокой статистической сохранностью) молекул мтДНК по сравнению с хромосомной ДНК.

Надо признать, что, с практической точки зрения, в случае анализа обгоревших костей преимущество мтДНК оказывается совсем невелико: уже следующая ступень жесткости воздействия недоступна для обеих методик анализа. Так, при воздействии температуры 200 °С в течение 1,5 ч (объект 14) кость стала полностью непригодной для генотипирования как хромосомной ДНК, так и мтДНК.

Следует оговориться, что в настоящей работе речь идет о генотипировании мтДНК с применением методики классического секвенирования в варианте флюорес-

центной детекции [4, 5] относительно больших ампликонов (@ 380—440 п.н.). Полученные выводы в целом можно отнести и к секвенированию тем же способом малых ампликонов мтДНК на том основании, что их размер (на практике это @ 150—250 п.н.) вполне сравним с размером малых ампликонов, анализируемых при генотипировании STR-локусов хромосомной ДНК, для которых в предыдущей работе были получены отрицательные результаты [1].

Теоретически можно предположить, что в какой-то степени продвинуться в сторону возможности генотипирования высокодеградированной мтДНК, в том числе в обожженных костях, в будущем удастся с помощью мето-

дик NGS (Next Generation Sequencing) [6]. Этот подход в настоящее время еще только разрабатывается, и его реальные возможности и ограничения — тема отдельных исследований.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику отдела медико-криминалистической идентификации Российского центра судебно-медицинской экспертизы Минздрава России Н.В. Нариной и лаборанту отдела молекулярно-генетических экспертиз (исследований) М.Н. Лизуну за помощь в выполнении отдельных экспериментов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Земскова Е.Ю., Бордюков М.М., Нарина Н.В., Ковалев А.В., Иванов П.Л. Молекулярно-генетический анализ хромосомной ДНК в обожженных костях: миф или реальность? *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016;6(59):4-9. [Zemskova EYu, Borydukov MM, Narina NV, Kovalev AV, Ivanov PL. The molecular genetic analysis of chromosomal DNA in burned bones: myth or reality? *Sudebno-meditsinskaja jekspertiza*. 2016;6(59):4-9. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/sudmed20165964-9>
2. Инструкция пользователя к набору реагентов MitoPlex для анализа последовательности контрольного региона митохондриальной ДНК человека методом секвенирования. ООО «Гордиз». Россия. [Instrukcija pol'zovatelja k naboru reagentov MitoPlex dlja analiza posledovatel'nosti kontrol'nogo regiona mitohondrial'noj DNK cheloveka metodom sekvenirovanija. ООО «Gordiz». Rossiya. (In Russ.)]. <http://gordiz.ru/index.php/produkty/kriminalistika/mtdna>
3. Экспертное применение анализа полиморфизма последовательностей митохондриальной ДНК в судебно-медицинской практике. Новая медицинская технология. Регистрационное удостоверение Росздравнадзора №ФС-2006-305 от 31.10.06. М. 2006. [Jekspertnoe primenenie analiza polimorfizma posledovatel'nostej mitohondrial'noj DNK v sudebno-meditsinskoj praktike. Novaja medicinskaja tehnologija. Registracionnoe udostoverenie Roszdravnadzora № FS-2006-305 ot 31.10.06. M. 2006. (In Russ.)].
4. Sanger F, Niclein S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5463-5467.
5. Applied Biosystems DNA Sequencing Analysis Software v5.4 User Guide (№4401738). Applied Biosystems. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_064539.pdf
6. Parson W. Advancing Forensic Mitochondrial DNA Sequencing with Ion Torrent NGS technology. Proceedings of the HIDS-2016. Barcelona (Spain). 2016 May 10. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/12-Walther-Parson.pdf>

Поступила 12.10.17

К статье *Е.Ю. Земсковой и соавт.* «Молекулярно-генетический анализ митохондриальной ДНК в обожженных костях: еще раз о пределах возможного»



Рис. 1. Фрагмент проксимального отдела правой бедренной кости от эксгумированных останков мужчины. а — общий вид, задняя поверхность; б — отделенный участок диафизной части, из которого сделаны выпилы для последующей термической обработки.

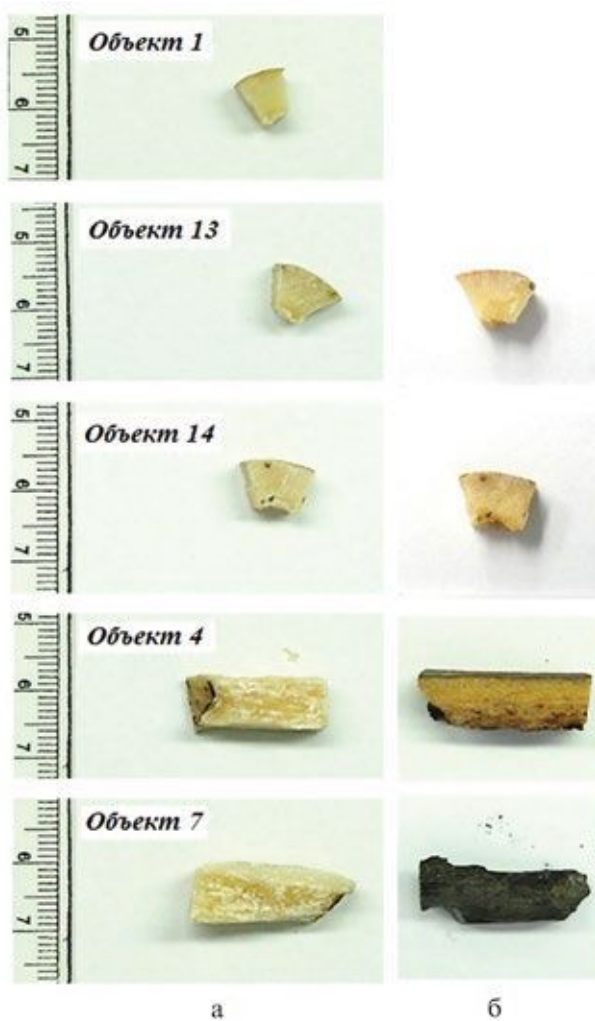


Рис. 2. Внешний вид объектов исследования — фрагментов костной ткани в интактном состоянии (а) и прошедших термообработку (б).

Экспериментальный ряд: объект 1 — интактная кость; объект 13 (150 °С/2,5 ч); объект 14 (200 °С/1,5 ч); объект 4 (250 °С/1,5 ч), объект 7 (400 °С/1,5 ч).



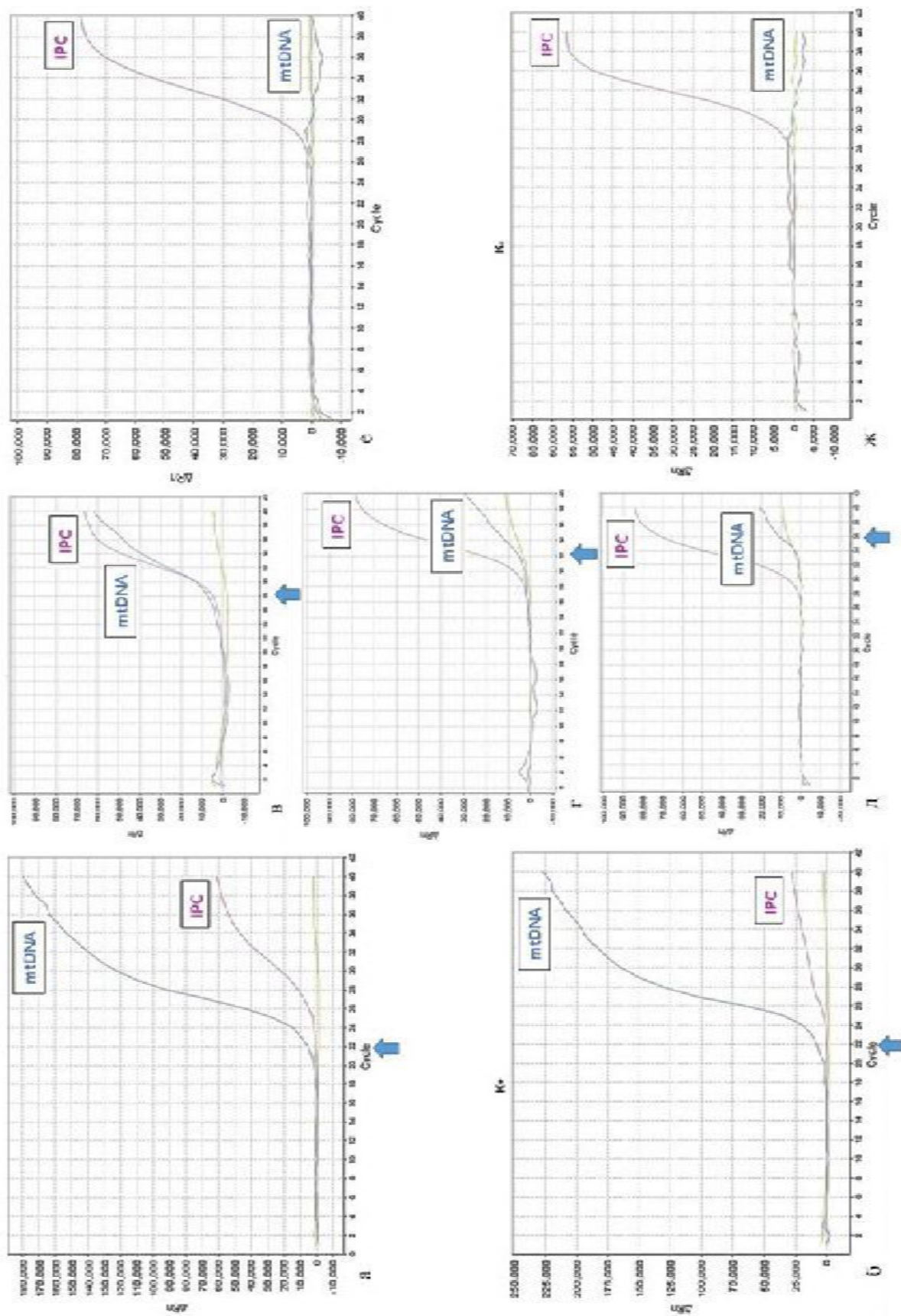


Рис. 3. Кинетика энзиматической амплификации в ПЦР (RT-PCR) полиморфного участка ГВС-2 мтДНК в препаратах, полученных из экспериментальных объектов: а — интактная кость (объект 1); б — препарат высокомолекулярной ДНК (положительный контроль); в — объект 13 (200 °С/1,5 ч), г — объект 4 (250 °С/1,5 ч), д — объект 7 (400 °С/1,5 ч); ж — препарат, не содержащий ДНК (отрицательный контроль).



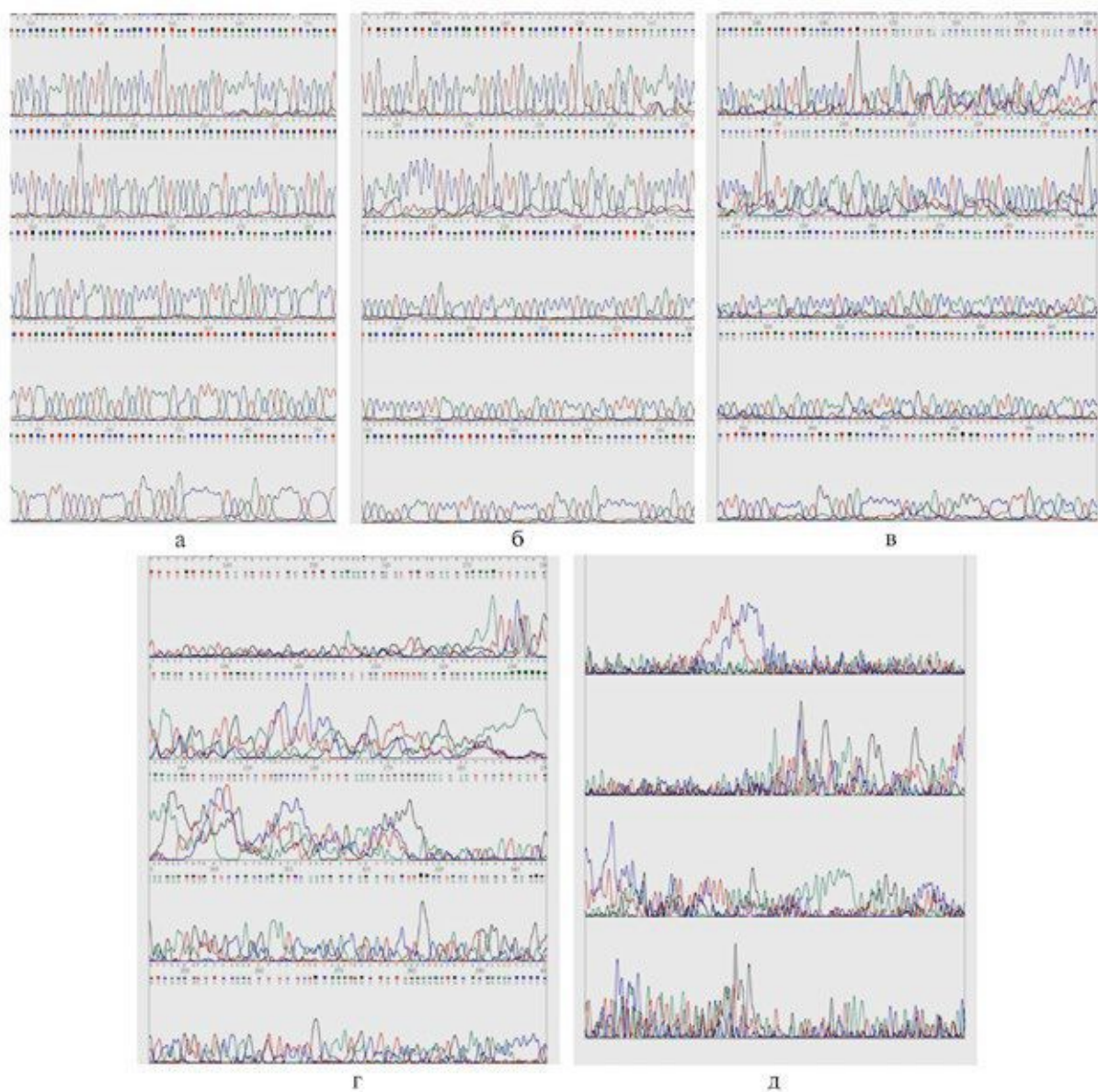


Рис. 4. Результаты генотипирования (иллюстративно): электрофореграммы продуктов секвенирующих реакций амплифицированных фрагментов мтДНК в препаратах, полученных из экспериментальных объектов: а — интактная кость (объект 1); б — объект 13 (150 °С/2,5 ч), в — объект 14 (200 °С/1,5 ч), г — объект 4 (250 °С/1,5 ч), д — объект 7 (400 °С/1,5 ч).



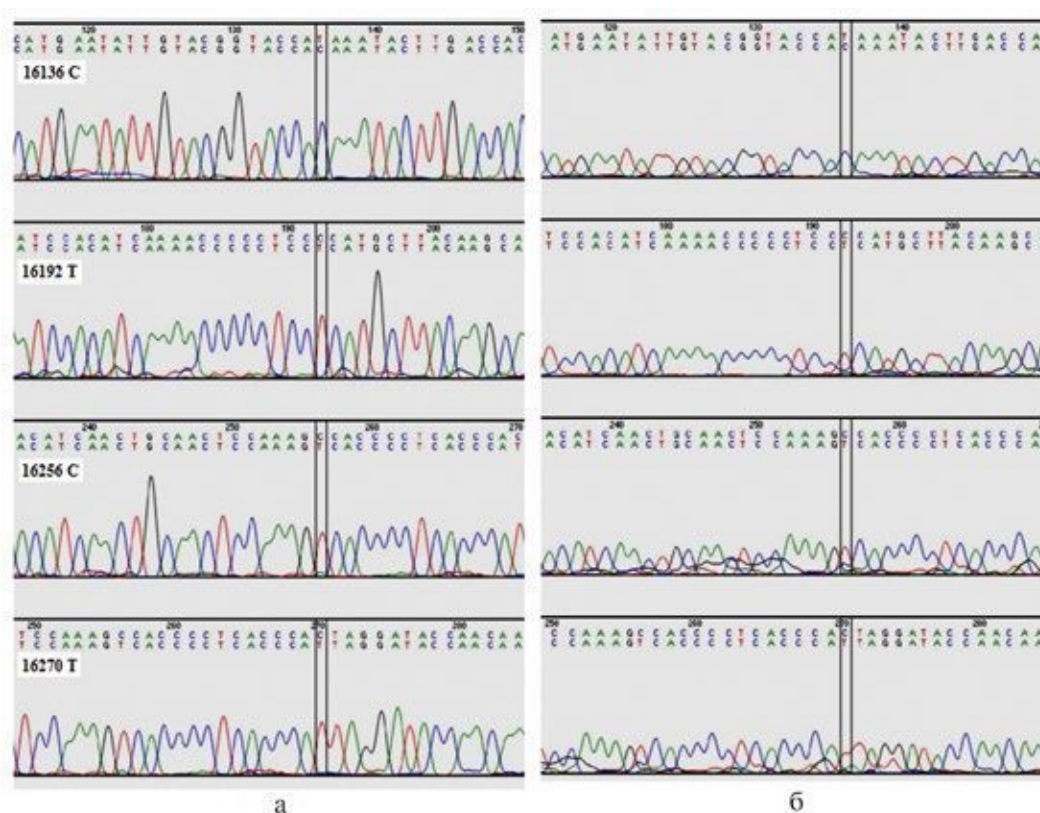


Рис. 5. Секвенсограммы препарата нативной кости (а) и кости, прогретой при температуре 150 °С в течение 1,5 ч (б). Показаны (в одинаковом масштабе интенсивности сигнала) 4 участка нуклеотидной последовательности ГВС-1 мтДНК, определяющие митотип исследованного объекта. Митотипы объектов идентичны, но обращает на себя внимание, что даже относительно мягкое термическое воздействие существенно снижает чувствительность и качество анализа.

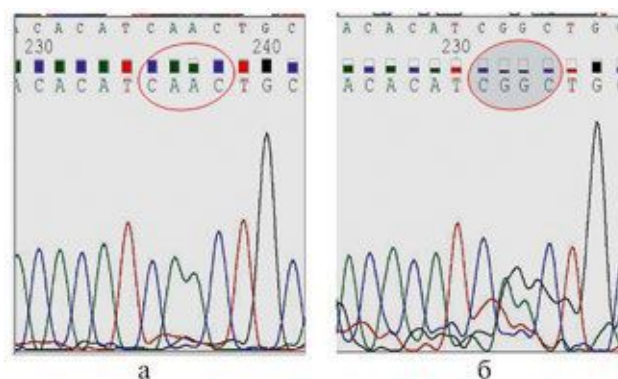


Рис. 6. Секвенсограмма: пример ошибки генотипирования мтДНК, обусловленной термической деградацией исходной ДНК-матрицы.

Два варианта «прочтения» одного и того же участка нуклеотидной последовательности в препаратах нативной кости (а) и кости, прогретой при температуре 200 °С в течение 1,5 ч (б). Показана область разночтений (во втором случае установленная последовательность CGG- ложно определенный признак).