

<https://doi.org/10.17116/sudmed20196202122>

## Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик. II. Особенности генотипирования<sup>1</sup>

К.м.н. В.Ю. АЛЕКСАНДРОВА, к.т.н. Е.А. БОГАТЫРЕВА, к.б.н. М.Ю. КУКЛЕВ, д.м.н. М.И. ЛАПЕНКОВ\*, н.с. Н.В. ПЛАХИНА

Институт криминалистики (нач. — к.х.н. К.Ю. Васильев) Центра специальной техники ФСБ России, Москва, Россия, 101000

**Цель исследования** — оптимизация генотипирования ядерной ДНК, содержащейся в волосах человека. Приводятся эффективные процедуры выделения и типирования в зависимости от фазы роста исследуемого волоса, состояния эпителиальных тканей и количества ядер в его корневом конце. Даны рекомендации по интерпретации результатов молекулярно-генетического исследования.

*Ключевые слова:* волосы человека, телоген, прогностический скрининг, выделение ДНК, генотипирование.

## The aspects of a molecular-genetic study of human hair depending on their morphological characteristics. II. The peculiarities of genotyping

V.YU. ALEKSANDROVA, E.A. BOGATYREVA, M.YU. KUKLEV, M.I. LAPENKOV\*, N.V. PLAKHINA

Institute of Criminal Law, the Centre of Special Techniques, Federal Security Service of the Russia, Moscow, Russia, 101000

**The objective of the present study was to optimize genotyping of nuclear DNA contained in human hair. The most efficient procedures for DNA isolation and typing are described taking into consideration the hair growth phase, the epithelial tissue conditions, and the number of nuclei in the near-root ends of the hair. The recommendations for the expert interpretation of the results of the molecular-genetic investigations are proposed.**

*Keywords:* human hair, telogen, prognostic screening, isolation of DNA, genotyping.

Первая часть данной работы [1] была посвящена разработке методики прогностического скрининга волос человека для определения перспективности образца и целесообразности его генотипирования.

Цель исследования — оптимизация процедуры генотипирования ядерной ДНК (ядНК), содержащейся в волосах человека.

Согласно нашим данным, исследование волос с содержанием в луковице ядер в количестве более 100, как правило, не представляет трудностей, так как концентрация ядНК в этом случае достаточна для проведения генотипирования по стандартному протоколу. Сложности возникают при исследовании «проблемных» волос, в луковицах которых менее 100 ядер, что типично для волос телогеновой фазы роста. Большая часть этого массива соотносима с объектами, содержащими предельно малые количества ядНК, т.е. LCN-объектами. В таких случаях применимы методы LCN-анализа. В литературе малое содержание ядНК в объекте — 0,02 нг/мкл и менее обозначают как LCN (Low Copy Number) [2]. Кроме того, при

выборе тактики генотипирования следует учитывать, что для волос в телогеновой фазе роста характерна деградация ядНК [3]. В работе [3—7] использовали следующие методические подходы, позволяющие повысить чувствительность определения: уменьшение объема элюата (элюирующий раствор) при выделении ядНК; изменение условий амплификации (время и температура циклирования, количество циклов); очистку амплификатов от низкомолекулярных компонентов, анализ параллельных проб, типирование мини-STR-локусов.

### Материал и методы

Исследовали волосы, отобранные на этапе скрининга по наличию эпителиальных тканей и количеству ядер, обнаруженных в корневом конце (см. таблицу).

Для выделения ДНК в соответствии с инструкциями производителей использовали следующие наборы: Tissue and Hair Extraction Kit и DNAIQ System («Promega Corporation», США); QIAamp DNA Investigator Kit и QIAamp DNA Micro

\*e-mail: lapenkov@rc-sme.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5700-7292>

<sup>1</sup>1-я часть комплексной работы по развитию и совершенствованию экспертного исследования волос человека опубликована в №1 2019 г.

## Количество генотипированных волос из каждой группы\*

Номер группы	Характеристика группы (фаза роста, количество эпителиальных тканей и ядер в корневом конце)	Количество генотипированных волос	
1	Волосы в анагеновой/катагеновой фазе с обильными просвечивающими влагалищными оболочками (более 100 ядер)	83	
3	Волосы в телогеновой фазе с обильными эпителиальными тканями (типа «мешочек») (более 100 ядер)	31	
5	Волосы в телогеновой фазе с полным отсутствием эпителиальных тканей	7	
2 и 4	Волосы в анагеновой/катагеновой фазе без оболочек и волосы в телогеновой фазе с небольшим количеством остаточных эпителиальных тканей	Более 100 ядер	35
		10—100 ядер	23
		Менее 10 ядер	2

Примечание. \* — Деление волос на группы описано ранее [1].

Kit (QIAGEN, Германия); PrepFiler Forensic DNA Extraction Kits и Arcturus PicoPure DNA Extraction Kit («Applied Biosystems», США); М-сорб для выделения ДНК из клинических образцов (ЗАО «Синтол», Москва); innuPREP Forensic Kit («Analytic Jena AG Life Science», Германия). Ионообменную смолу Chelex 100 Resin («Bio-Rad Laboratories», США) применяли в соответствии с методикой, представленной в Users guide AmpliType, («PerkinElmer», США).

Выделенную ДНК оценивали с помощью набора реагентов для определения количества фрагментов ДНК человека XY-Детект (ЗАО «Синтол», Москва) [8] и анализатора нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Санкт-Петербург).

Генотипирование выполняли с использованием наборов AmpF/STR Identifiler Plus PCR Amplification Kit и AmpF/STR Minifiler PCR Amplification Kit («Applied Biosystems», США). Реакцию амплификации проводили на ДНК-амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 Gold («Applied Biosystems», США), электрофорез — на генетическом анализаторе 3500xL Genetic Analyzer («Applied Biosystems/Hitachi», США) в среде полимера POP-4. Обработку результатов и идентификацию аллелей проводили с помощью программы GeneMapper ID-X («Applied Biosystems», США). Амплификацию выполняли с использованием протоколов, рекомендованных в инструкциях: стандартный и удлиненный протоколы для набора AmpF/STR Identifiler Plus PCR Amplification Kit («Applied Biosystems», США) и стандартный протокол для набора AmpF/STR Minifiler PCR Amplification Kit («Applied Biosystems», США), а также модифицированных протоколов амплификации по системе Identifiler Plus с увеличенным количеством циклов до 31 и 34 и температурой завершающего отжига 56 °С [4].

Для очистки продуктов амплификации пользовались набором MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Германия) и методикой, описанной в инструкции к набору.

Достоверность результатов проверяли путем сравнения с генотипами, установленными ранее по образцам буккального эпителия (далее — референсные генотипы).

## Результаты и обсуждение

**Выделение яДНК.** В ходе работы сравнили эффективность выделения различными методами для выявления

оптимального варианта при исследовании единичного волоса. Всего применили 8 методов выделения яДНК.

Действие 6 способов выделения яДНК основано на способности молекул яДНК селективно сорбироваться на различных носителях, а при изменении условий переходить обратно в раствор. Принципиально такие технологии отличаются этапом очистки высокомолекулярной яДНК от белков, красителей, солей и других примесей, в том числе пигментов волос, которые могут присутствовать в криминалистических образцах и впоследствии ингибировать ПЦР. Использовали следующие наборы реагентов:

— набор PrepFiler Forensic DNA Extraction Kits, комплекс наборов Tissue and Hair Extraction Kit и DNA IQ System, а также набор М-сорб. яДНК сорбируется на магнитных частицах;

— наборы QIAamp DNA Investigator Kit, QIAamp DNA MicroKit и innuPREP Forensic Kit. яДНК сорбируется на мембране колонок.

В составе лизирующего буфера из специализированного набора Tissue and Hair Extraction Kit содержится протеиназа К и дитиотрейтол, что позволяет разрушить кератинизированные ткани волоса. Длительность и температура инкубации составляют 1 ч и 56 °С соответственно.

Набор PrepFiler Forensic DNA Extraction Kits предназначен для работы с широким спектром объектов, лизис производится с добавлением дитиотрейтола. Рекомендуемые условия: температура от 50 до 80 °С, продолжительность от 10 до 90 мин. Основной режим: температура 70 °С, продолжительность 40 мин.

Реагенты фирм QIAGEN и «Analytic Jena AG Life Science» разработаны для получения препаратов яДНК из различного биоматериала, в том числе из волос. Набор QIAamp DNA MicroKit рекомендован для работы с микроколичествами биологического материала и содержит реагент для более эффективного связывания молекул яДНК. Лизис проходит при добавлении дитиотрейтола и протеиназы К. Инкубация по методикам фирмы QIAGEN: температура 56 °С, длительность 1 ч, фирмы «Analytic Jena AG Life Science» — соответственно 50 °С, до 2 ч.

Набор отечественного производства М-сорб, согласно инструкции, предназначен для выделения яДНК из клинических образцов (кровь и буккальный эпителий). Продолжительность лизиса составляет от 15 до 30 мин при температуре 60 °С.

Дополнительно опробовали набор Arcturus PicoPure DNA Extraction Kit, предназначенный для выделения яДНК из нескольких клеток после микродиссекции. Выделение яДНК происходит в одну стадию без очистки препарата. Лизис проводят в буферном растворе в присутствии протеиназы в течение 3 ч при температуре 65 °С. Положительным моментом такой методики является отсутствие неизбежных потерь яДНК при многоэтапном процессе. Очистку препарата яДНК не проводят, поэтому в растворе могут остаться ингибиторы яДНК-полимеразы.

Те же достоинства и недостатки имеет метод выделения яДНК с использованием ионообменной смолы Chellex 100 Resin («Bio-Rad Laboratories», США).

В ходе выделения всеми методами получили 50 мкл препарата ДНК.

На основании данных цитоморфологического исследования и количественной оценки препаратов яДНК сделали следующие рекомендации по выделению яДНК:

1. Волосы с количеством ядер в луковице до 10. Содержание яДНК в препарате составило менее 0,01 нг/мкл независимо от метода выделения яДНК. Объединение нескольких таких волос со сходными морфологическими признаками не приводит к возрастанию количества выделенной яДНК. Данные волосы полностью непригодны для молекулярно-генетического исследования.

2. Волосы с количеством ядер в луковице от 10 до 100. Более высокое содержание яДНК отметили для препаратов, полученных при использовании наборов Arcturus PicoPure DNA Extraction Kit, PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit, комплекса наборов Tissue and Hair Extraction Kit и DNA IQ System, наборов фирмы QIAGEN.

Для выделения яДНК из волос 2-й и 4-й групп не рекомендуется использовать наборы DNA IQ System (без дополнительных реагентов, входящих в состав Tissue and Hair Extraction Kit), innuPREP Forensic Kit, M-сорб и Chellex 100 Resin.

3. Если количество ядер в корневой части волоса около 100 и более, то пригоден любой из способов выделения яДНК. Экспериментально показано, что все препараты, полученные из таких волос, содержали более 0,05 нг/мкл яДНК.

**Генотипирование.** Выбор подходов к генотипированию волос зависит от результатов цитологического исследования и количественной оценки выделенной яДНК.

По итогам работы определили нижний предел содержания яДНК в препарате, при котором целесообразно продолжать исследование, — 0,01 нг/мкл.

Препараты, полученные из волос с количеством ядер 10—100, в зависимости от количества яДНК можно условно разделить на две группы: содержащие более 0,05 и менее 0,05 нг/мкл яДНК.

При содержании яДНК в препарате более 0,05 нг/мкл генотипирование следует проводить по стандартному протоколу Identifiler Plus. Полученные генетические профили характеризуются интенсивностью сигнала выше 500 RFU. При сравнении полученных данных с референсными генотипами отметили полное их соответствие. Такие результаты не нуждаются в особых рекомендациях по интерпретации.

Генотипирование препаратов с количеством яДНК менее 0,05 нг/мкл необходимо проводить по удлинённому протоколу Identifiler Plus 29 циклов. Рекомендуемый предел определения аллеля составляет 50 RFU, что обеспечивает, с одной стороны, более чем в три раза превышение

фонового сигнала, а с другой — минимизирует риск выпадения аллеля. В условиях недостаточного количества матричной яДНК необходимо всегда учитывать возможность появления стохастических эффектов. Дисбаланс интенсивности сигнала между короткими и длинными локусами указывает на частичную деградацию яДНК либо ее недостаточное количество. Несбалансированная амплификация длинных фрагментов (более 200 н.п.) может привести к выпадению аллеля, т.е. неполной амплификации. Сильный сигнал от статтора или неспецифическая амплификация, наоборот, внесут в генотип аллель-артефакт. Такие результаты не могут считаться достоверными при постановке единичной амплификации. В связи с этим следует повторить амплификацию по удлинённому протоколу Identifiler Plus 29 циклов и протоколу Minifiler. По нашим данным, в таких случаях оптимальной следует считать постановку трех параллельных амплификаций с последующим сравнением результатов (рис. 1, на цв. вклейке). Истинными считают аллели, которые проявились не менее чем в двух случаях. По итогам оценки полученных генетических профилей следует решить, пригодны ли результаты генотипирования для последующего сравнительного исследования.

В ходе работы установили, что типирование мини-STR-локусов позволяет значительно улучшить результаты. Система Minifiler, разработанная для исследования частично деградированной яДНК, продемонстрировала хорошие результаты при генотипировании образцов с недостаточным количеством яДНК, полученных из единичных волос (рис. 2, на цв. вклейке). Две системы: Minifiler и Identifiler Plus взаимно дополняют друг друга и позволяют получить полный генотип. Рекомендуется использовать этот подход в данной группе волос для повышения эффективности исследования.

Другие методы оптимизации генотипирования образцов с содержанием яДНК менее 0,05 нг/мкл, а именно увеличение количества циклов амплификации и очистка амплификатов, не привели к ожидаемому повышению эффективности генотипирования.

При использовании амплификации по модифицированным протоколам по панели Identifiler Plus отметили множественные стохастические эффекты. Корректно провести анализ и установить генотип оказалось невозможно.

Применение набора MinElute PCR Purification Kit для очистки амплификатов усилило общую интенсивность сигнала, однако достичь улучшения качества профиля не удалось. Происходило усиление «засветки». Выявить истинные аллели при неполной амплификации не удавалось, сохранился дисбаланс гетерозигот.

## Заключение

По итогам апробации можно сделать заключение, что использование данных модифицированных протоколов и очистка амплификатов нецелесообразны.

Следует особо отметить, что к оценке данных, полученных при генотипировании яДНК в количестве менее 0,02 нг/мкл, необходимо подходить с осторожностью, а результаты приводить с пояснениями, показывающими ограниченную пригодность таких генетических профилей для сравнительного исследования. На основании таких результатов правомерно делать следующие заключения: при несовпадении генетических характеристик — категорический отрицательный вывод; при

совпадении генетических характеристик — вероятный вывод о том, что происхождение образцов от одного и того же лица не исключается.

По итогам проведенной работы представлены методики прогностического скрининга и оптимизации молекулярно-генетического исследования волос человека. Информация о фазе роста исследуемого волоса, состоянии эпителиальных тканей и количестве ядер в корневом конце, соотношенная с данными количественного определения ДНК в препарате, позволяет спланировать

эффективную тактику генотипирования, предусмотреть возможные проблемы и пути их решения (рис. 3, на цв. вклейке).

Внедрение предложенного алгоритма исследования волос человека, по нашему мнению, будет способствовать получению достоверных результатов, исключению ложно-отрицательных выводов и в целом производству экспертиз на более высоком уровне.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Александрова В.Ю., Богатырева Е.А., Куклев М.Ю., Лапенков М.И., Плахина Н.В. Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик. I. Прогностический скрининг. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(1):13-16. [Aleksandrova VYu, Bogatyreva EA, Kuklev MYu, Lapenkov MI, Plakhina NV. Molecular genetic aspects of people hair studies according to their morphological characteristics. I. Prediction screening. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2019;62(1):13-16. (In Russ.)].
2. Gill P. Application of Low Copy Number DNA Profiling. *Croatian Medical Journal*. 2001;2(3):229-232.
3. Opel K, Fleishaker EL, Nicklas JA, Buel E, McCord BR. Evaluation and Quantification of Nuclear DNA from Human Telogen Hairs. *Journal of Forensic Sciences*. 2008;53(4):853-857. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00777>
4. Seo SB, Ge J, King JL, Budowle B. Reduction of stutter ratios in short tandem repeat loci typing of low copy number DNA samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2014;8:213-218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.004>
5. Smith PJ, Ballantyne J. Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification. *Journal of Forensic Sciences*. 2007;52(4):820-829. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00470.x>
6. Roeder AD, Elsmore P, Greenhalgh M, McDonald A. Maximizing DNA profiling success from sub-optimal quantities of DNA: A staged approach. *Forensic Science International: Genetics*. 2009;3:128-137. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.12.004>
7. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The Development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*. 2003;48(5):1054-1064.
8. Лапенков М.И., Плахина Н.В., Алексеев Я.И., Варламов Д.А. Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом ПЦР-РВ. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2011;54(2):34-38. [Lapenkov MI, Plakhina NV, Alekseev YaI, Varlamov DA. The development of a test-system for the quantitative and qualitative evaluation of DNA content in criminalistics objects by the real-time polymerase chain reaction. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2011;54(2):34-38. (In Russ.)].

Поступила 29.03.18

К статье *В.Ю. Александровой и соавт. «Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик. II. Особенности генотипирования»*

To the article by *Aleksandrova V.Yu. et al. «The aspects of a molecular-genetic study of human hair depending on their morphological characteristics. II. The peculiarities of genotyping»*

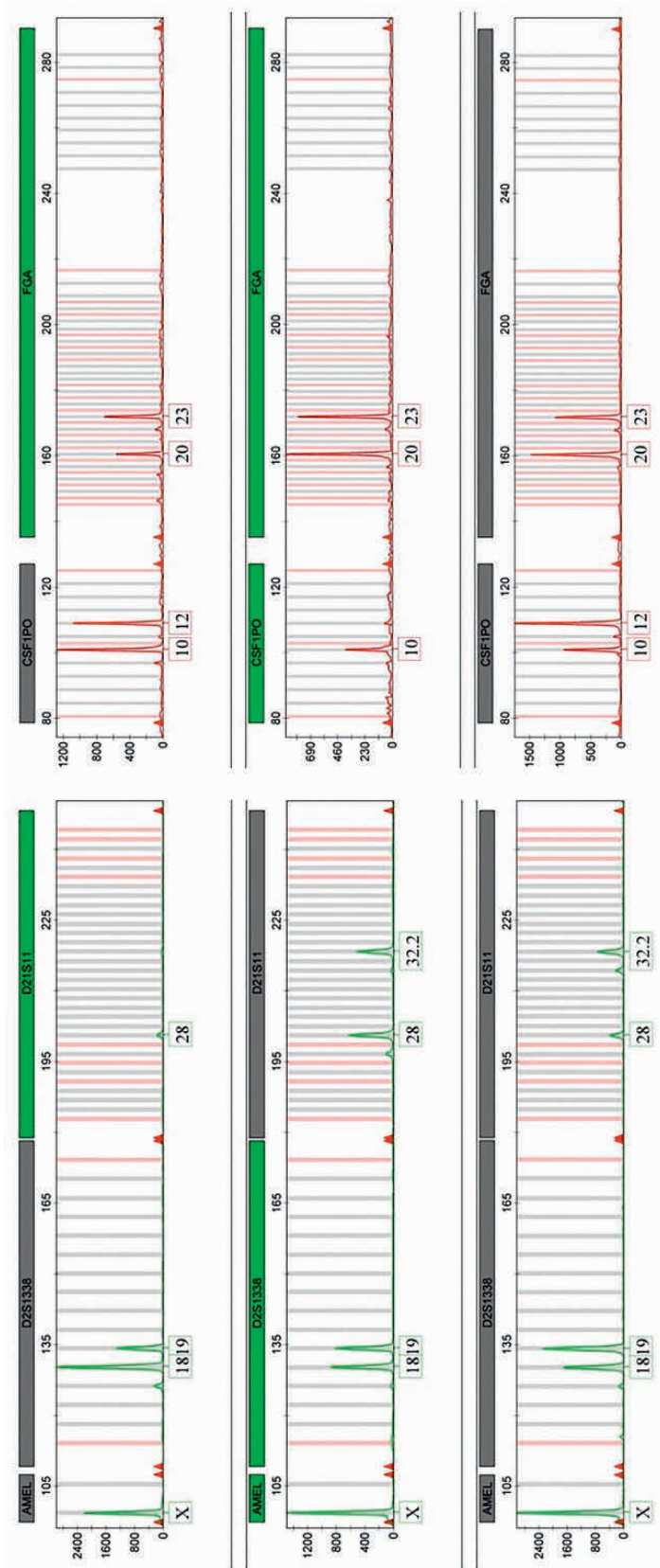


Рис. 1. Генотипирование образца по протоколу Minifiler в трех параллельных амплификациях.  
Fig. 1. Genotyping of the specimen in accordance with the Minifiler protocol in three parallel amplifications.

К статье В.Ю. Александровой и соавт. «Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик. II. Особенности генотипирования»

To the article by Aleksandrova V.Yu. et al. «The aspects of a molecular-genetic study of human hair depending on their morphological characteristics. II. The peculiarities of genotyping»

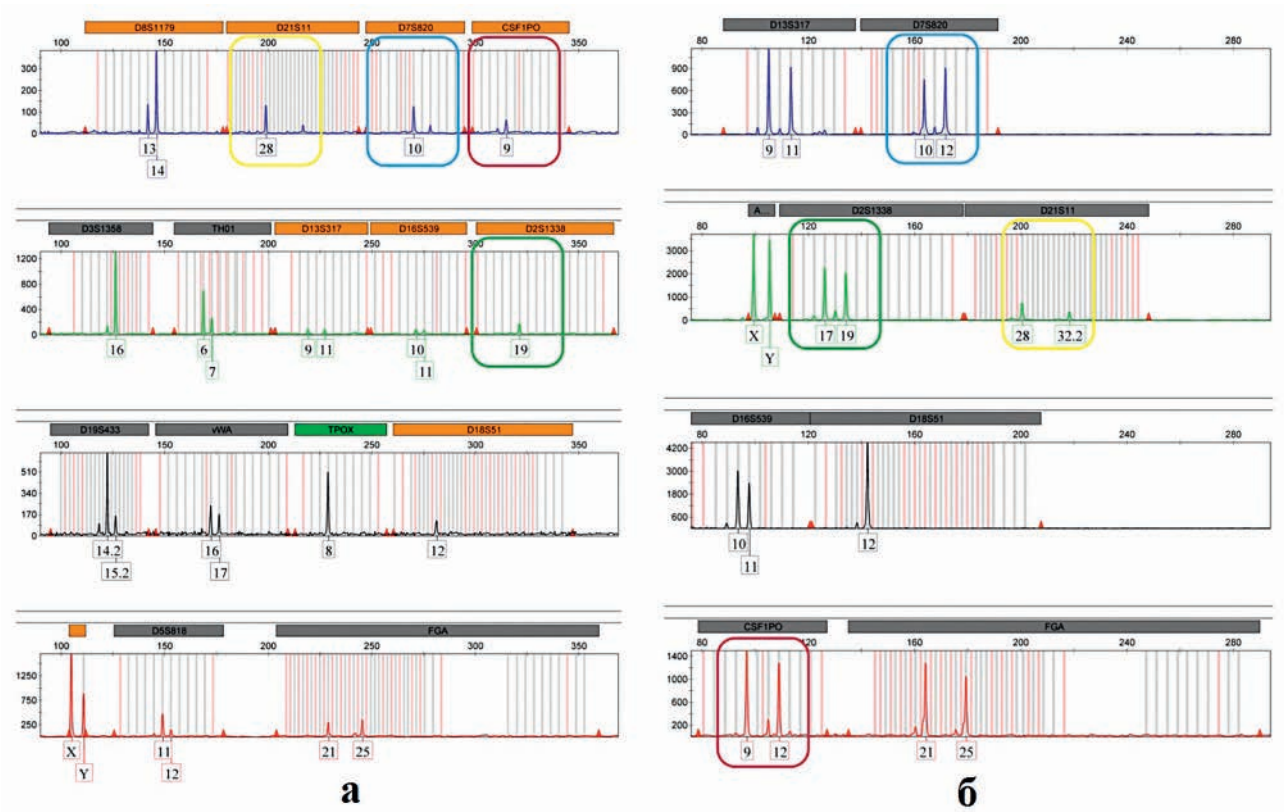


Рис. 2. Сравнение результатов генотипирования по протоколам Identifiler Plus 29 циклов и Minifiler образца с содержанием яДНК 0,04 нг/мкл.

Одинаковым цветом отмечены локусы, частично амплифицированные при генотипировании по протоколу Identifiler Plus 29 циклов (а), и те же локусы, полностью амплифицированные по протоколу Minifiler (б).

Fig. 2. The comparison of the results of genotyping of the specimen containing 0.04 ng/ml of nDNA in accordance with the Identifiler Plus 29 cycles and Minifiler protocols.

The loci partly amplified in genotyping in accordance with the Identifiler Plus 29 cycles (a) and the same loci totally amplified in accordance with the Minifiler protocol are shown in similar colouring (b).

К статье *В.Ю. Александровой и соавт.* «Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик. II. Особенности генотипирования»

To the article by *Aleksandrova V.Yu. et al.* «The aspects of a molecular-genetic study of human hair depending on their morphological characteristics. II. The peculiarities of genotyping»

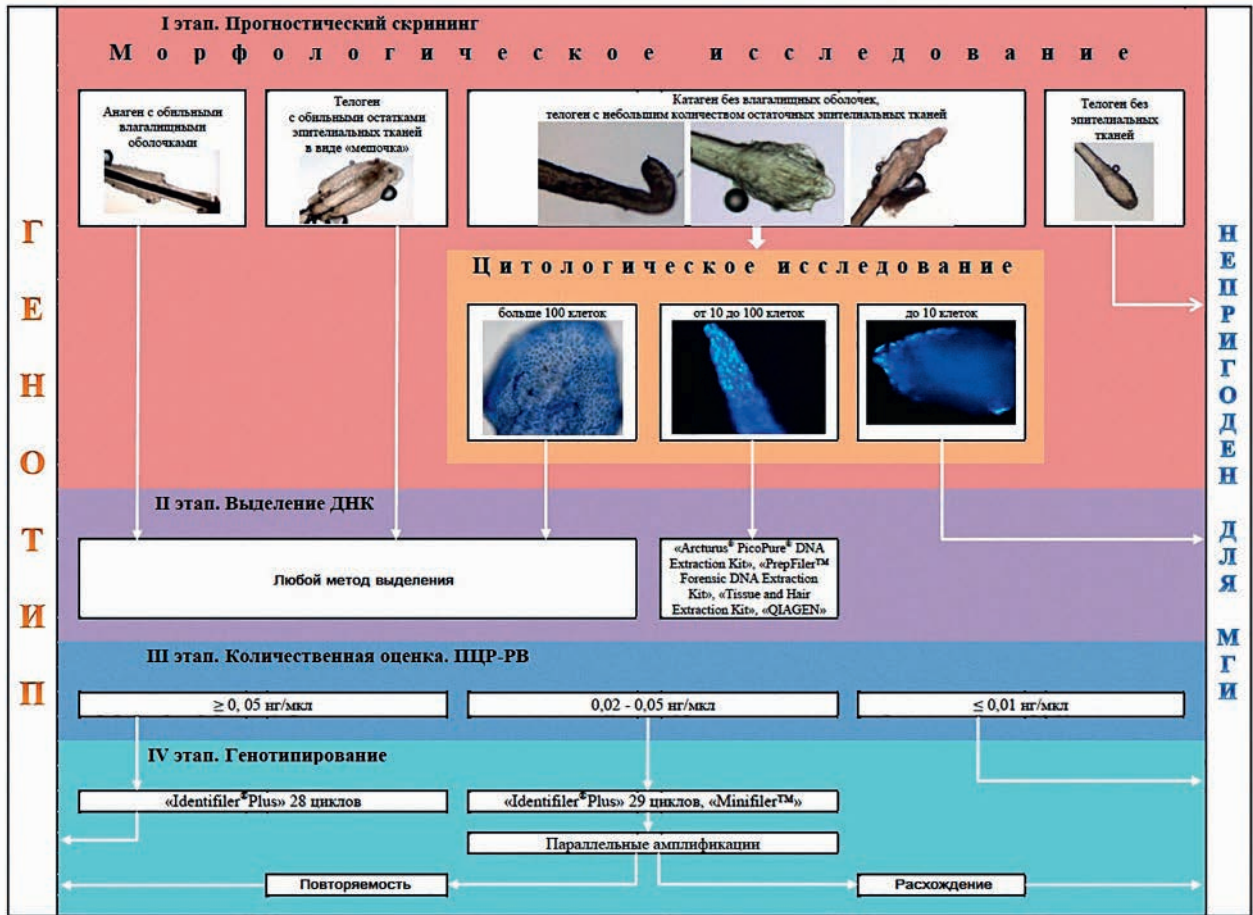


Рис. 3. Тактика молекулярно-генетического исследования волос человека.

Fig. 3. The strategy of the molecular-genetic investigation of human hair.