



---

## ТАПОТИЛИ

**Наборы реагентов для определения количества tandemных  
повторов в полиморфных локусах  
и пола в геномной ДНК человека**

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

---

### Оглавление

<i>Назначение .....</i>	<i>3</i>
<i>Коды продукции .....</i>	<i>3</i>
<i>Панель высокополиморфных локусов генома человека .....</i>	<i>4</i>
<i>Важные предупреждения, напоминания и советы .....</i>	<i>5</i>
<i>Меры предосторожности .....</i>	<i>6</i>
<i>Принцип метода и характеристика наборов .....</i>	<i>6</i>
<i>Общие сведения .....</i>	<i>7</i>
<i>Транспортировка, хранение, срок годности и состав наборов .....</i>	<i>8</i>
<i>Состав и условия хранения компонентов наборов .....</i>	<i>8</i>
<i>Характеристика отдельных компонентов наборов .....</i>	<i>9</i>
<i>Высокомолекулярные стандарты ДНК .....</i>	<i>11</i>
<i>Забор биологического материала и выделение ДНК .....</i>	<i>13</i>
<i>Качественный и количественный контроль при выделении ДНК .....</i>	<i>13</i>
<i>Важные предуведомления .....</i>	<i>14</i>
<i>Проведение ПЦР .....</i>	<i>14</i>
<i>Регистрация результатов .....</i>	<i>16</i>
<i>Учёт результатов .....</i>	<i>17</i>
<i>Эталонные частоты аллелей и вероятностные расчеты .....</i>	<i>19</i>
<i>Техническое содействие / информация .....</i>	<i>19</i>
<i>Референтные генотипы различных контрольных ДНК .....</i>	<i>20</i>
<i>TPOX .....</i>	<i>22</i>
<i>D3S1358 .....</i>	<i>24</i>
<i>CSF1PO .....</i>	<i>26</i>
<i>D7S820 .....</i>	<i>28</i>
<i>LPL .....</i>	<i>30</i>
<i>D10S1248 .....</i>	<i>32</i>
<i>TH01 .....</i>	<i>34</i>
<i>vWFII .....</i>	<i>36</i>

---

<i>РАН</i> .....	37
<i>D13S317</i> .....	38
<i>D19S433</i> .....	40
<i>D22S1045</i> .....	42
<i>Список литературы</i> .....	44
<i>Забор биологического материала</i> .....	50
<i>Выделение ДНК из крови (ткани) с использованием протеиназы К и последующей фенол / хлороформной очисткой</i> .....	51
<i>Выделение ДНК с использованием ионообменной смолы Челекс-100 (Chelex®-100)</i> .....	54
<i>Приготовление основных растворов</i> .....	56
<i>Приготовление 2%-го агарозного геля</i> .....	59
<i>Приготовление растворов акриламид-бисакриламид (общие сведения)</i> .....	60
<i>Электрофорез в неденатурирующих ПАГ (микросателлитные локусы)</i> .....	61
<i>Окончание электрофореза в неденатурирующих ПАГ</i> .....	62
<i>Окраска ПАГ бромистым этидием</i> .....	62
<i>Окраска ПАГ нитратом серебра</i> .....	63
<i>Амплификационная карта</i> .....	65
<i>Электрофорезная карта</i> .....	66
<i>Карта генотипов</i> .....	67
<i>Таблица возможного неравновесия по сцеплению между полиморфными локусами, используемыми для идентификации личности и установления родства</i> .....	68

## Назначение

Наборы реагентов **ТАПОТИЛИ** (**ТА**ндемные **ПО**вторы для **ТИ**пирования **ЛИ**чности) предназначены для использования в диагностических, молекулярно-генетических, судебных, криминалистических, биологических и химических лабораториях при решении задач, связанных с идентификацией личности, определением половой принадлежности объектов, установлением родственных связей, в том числе при исследовании случаев спорного отцовства, материнства и родства. Наборы позволяют исследовать биологический материал человеческого происхождения различной природы.

Наборы предназначены для определения количества тандемных повторов в независимых полиморфных локусах геномной ДНК человека, а также пола человека посредством метода *полимеразной цепной реакции (ПЦР)*.

Первоначально проводится амплификация геномной ДНК в монолокусном формате со специфическими праймерами на каждый из локусов. Затем продукты ПЦР разделяют в агарозных или полиакриламидных гелях (ПАГ) и сопоставляют с соответствующими аллельными «лестницами» и / или нелокусными высокомолекулярными стандартами ДНК.

Один набор рассчитан на проведение 100 ПЦР с последующим анализом по одному (любому) из полиморфных локусов, перечисленных в таблице 2 (на стр. 4 настоящей инструкции).

## Коды продукции

По классификатору продукции, используемому на территории РФ, наборы реагентов **ТАПОТИЛИ**, а также отдельные компоненты наборов относятся к кодам, перечисленным в таблице 1.

Таблица 1.

Классификатор	Код продукции	Расшифровка кода	Примечания
ОКПД2 (ОК 034-2014, КПЕС 2008)	20.14.52.120	Кислоты нуклеиновые и их соли	Действующий классификатор, дата введения: 01.02.2014
	20.14.64.000	Ферменты и прочие органические соединения, не включенные в другие группировки	
	20.59.52.190	Реагенты сложные диагностические или лабораторные, не включенные в другие группировки	
	20.59.52.199	Реагенты сложные диагностические или лабораторные прочие, не включенные в другие группировки	

Таблица 2.

**Панель высокополиморфных локусов генома человека**

Локус	Хромосомная Локализация	Длина повторяющейся единицы, п.н. (*)	Число аллелей (**)	Диапазон длин амплифицируемых аллелей, п.н. (*)
<b>Аутосомные микросателлиты</b>				
<i>TPOX</i>	2p25.3	4	6	110 – 130
<i>UGT1A1-STR</i>	2q37.1	2	4	95 – 101
<i>D3S1358</i>	3p21.31	4	8	111 – 147
<i>FGA</i>	4q31.3	4	13	143 – 179
<i>CSF1PO</i>	5q32	4	8	172 – 212
<i>D7S820</i>	7q21.11	4	8	128 – 156
<i>LPL</i>	8p21.3	4	6	105 – 133
<i>D8S1179</i>	8q24.13	4	11	90 – 130
<i>D10S1248</i>	10q26.3	4	9	86 – 122
<i>TH01</i>	11p15.5	4	7	128 – 152
<i>vWFII</i>	12p13.31	4	9	150 – 182
<i>PAH</i>	12q23.2	4	11	216 – 260
<i>D13S317</i>	13q31.1	4	8	100 – 128
<i>D16S539</i>	16q24.1	4	9	98 – 134
<i>D18S51</i>	18q21.33	4	14	125 – 177
<i>D19S253</i>	19p13.12	4	10	115 – 151
<i>D19S433</i>	19q12	4	14	120 – 170
<i>D20S482</i>	20p13	4	11	89 – 129
<i>D21S11</i>	21q21.1	4	16	154 – 194
<i>D22S1045</i>	22q12.3	3	13	79 – 115
<b>Локусы для определения половой принадлежности</b>				
<i>Амелогенин</i>	Xp22.2	пол-специфические варианты		X: 106
	Yp11.2	диморфного гена		Y: 112
<i>ZFX / ZFY</i>	Xp22.11	SNP		X: 1131
	Yp11.2	(прямое секвенирование или ПДРФ)		Y: 1131
<i>DXZI / DYZ3</i>	Xp11.1-Xq11.1	мультикопийные альфоидные		X: 130
	Yp11.2-Yq11.21	повторы		Y: 172
<b>Аутосомные минисателлиты</b>				
<i>DIS80</i>	1p36.32	16	>25	402 – > 800
<i>DIS111</i>	1q24.2	37	>18	383 – > 1000
<i>ApoB-3'VNTR</i>	2p24.1	15 (2x15)	>18	522 – > 900
<i>IL1RN-VNTR</i>	2q14.1	86	5	154 – 584
<i>DAT-3'VNTR</i>	5p15.33	40	6	203 – > 600
<i>NOS3-VNTR</i>	7q36.1	27	5	340 – 450
<i>DRD4-VNTR</i>	11p15.5	48	>10	330 – > 800
<i>IgH-VNTR</i>	14q32.33	50	12	420 – > 1500
<i>D17S5</i>	17p13.3	70	>19	168 – > 1400
<i>5-HTT-LPR</i>	17q11.2	20-23	>3	485 – > 650

**Микросателлиты, расположенные на Y хромосоме****Набор реагентов для секвенирования участков ГВС1, ГВС2, ГВС3 мт-ДНК человека**

(\*) п.н. – пар нуклеотидов

(\*\*) для европеоидного населения России, по результатам анализа различных литературных данных.

## Важные предупреждения, напоминания и советы

- Наборы **ТАПОТИЛИ** предназначены для исследовательских работ *in vitro* (то есть дословно – в пробирке, вне живого организма).
- Наборы не подлежат обязательной сертификации и декларированию соответствия в Системе сертификации ГОСТ Р.
- Наборы **ТАПОТИЛИ** не являются изделием медицинского назначения, не предназначены для использования в целях медицинской диагностики, для диагностических процедур, для профилактики и лечения заболеваний. По этим причинам наборы **ТАПОТИЛИ** не подлежат государственной регистрации на территории РФ (в том числе в Росздравнадзоре) в качестве медицинского изделия, изделия медицинского назначения и т.п.
- Изделия, не предназначенные для использования в медицинских целях, имеют соответствующую маркировку на упаковке.
- The *Tapotili Kit* is intended for molecular biology applications, including forensic or paternity usage. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.
- Молекулярно-генетические исследования (МГИ) по установлению генотипов отдельных лиц, в том числе по идентификации личности и установлению спорного родства методом анализа полиморфных локусов генома человека не являются медицинской деятельностью: устанавливаются именно биологические факты (генотипы обследуемых лиц).
- По Общероссийскому классификатору продукции по видам экономической деятельности (ОКПД2) эти исследования относятся к коду **72.11.1** (Услуги, связанные с научными исследованиями и экспериментальными разработками в области биотехнологии, в области здоровья, окружающей среды, сельского хозяйства и прочей биотехнологии). Эта группировка включает услуги, связанные с научными исследованиями и экспериментальными разработками в области ДНК (кодирования): геномика, фармакогенетика, генные зонды, секвенирование, синтез и амплификация ДНК.
- Результаты МГИ мы рекомендуем оформлять в виде Заключения специалиста, отчёта о НИР и аналогичных документов, не являющихся медицинскими документами.
- Интерпретация медицинской значимости полученных данных и принятие клинического решения относится к компетенции врача.
- Перед использованием наборов рекомендуем Вам внимательно ознакомиться с настоящей инструкцией.
- Инструкция подготовлена с целью обеспечения безопасной работы и воспроизводимости результатов при использовании наборов.
- Важно, чтобы эта инструкция хранилась в надёжном, но доступном для пользователей месте, чтобы в случае необходимости они всегда могли к ней обратиться. Если наборы будут переданы другому лицу, необходимо приложить к наборам и эту инструкцию, чтобы новый владелец мог с ней ознакомиться.
- Актуальная электронная версия инструкции доступна на сайте: <https://tapotili.ru/doc/tapotili.pdf> (файл формата *Adobe Acrobat*, размер около **3 Мб**). Информация в инструкции периодически изменяется. Не забывайте ознакомиться с обновлённой версией при повторных заказах.
- Для отдельных локусов инструкция вынесена в отдельные файлы небольшого размера, по соответствующим гиперссылкам в таблице на сайте: <https://tapotili.ru/tapotili-kits>.
- Наборы предназначены для использования только взрослыми. Следите за тем, чтобы дети не приближались к наборам и не играли с пробирками.
- Мы постоянно совершенствуем реагентное обеспечение, поэтому в продукт могут быть внесены изменения и улучшения, не описанные в прилагаемой документации.
- Данное изделие (уже пустые или ещё полные пробирки) не следует выбрасывать вместе с бытовыми отходами. Правильная утилизация способствует сохранению природных ресурсов, охране здоровья и окружающей среды.
- Написанию сего раздела способствовало чтение многочисленных руководств по эксплуатации самых разных бытовых приборов.

## Меры предосторожности

- ✚ Все компоненты наборов в используемых концентрациях являются нетоксичными, неядовитыми, не-пожароопасными и не-взрывоопасными.
- ✚ Все исследуемые биологические образцы следует рассматривать как инфекционно-опасные, способные длительное время сохранять и передавать вирусы иммунодефицита человека, гепатитов В и С, других возбудителей.
- ✚ Манипуляции по выделению ДНК следует проводить в отдельном помещении в специальной лабораторной одежде и одноразовых резиновых перчатках. Для очистки рабочих поверхностей необходимо использовать дезинфицирующие растворы после каждого раунда выделения ДНК.
- ✚ При работе с бромистым этидием и акриламидом необходимо надевать резиновые перчатки.
- ✚ Не снимайте крышку с подключенной к источнику питания электрофоретической камеры, так как высокое напряжение опасно для жизни.
- ✚ При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться специальным защитным экраном или защитной маской, поскольку ультрафиолетовый свет может вызывать ожоги лица и слизистой оболочки глаз.

Чувствительность метода ПЦР позволяет исследовать минимальные количества ДНК, поэтому опасность случайного загрязнения образцов чужеродной ДНК вызывает серьезные опасения. Во избежание контаминации исследуемых образцов и компонентов наборов на различных стадиях анализа соблюдайте следующие меры предосторожности:

- ✚ Основные три этапа работ – (i) подготовка исследуемых образцов, включая выделение ДНК; (ii) подготовка образцов для ПЦР; (iii) проведение ПЦР и последующий электрофоретический анализ, – должны быть физически изолированы, то есть размещены в трех разных помещениях.
- ✚ Всё лабораторное оборудование (в том числе пипетки, штативы, посуда, пластик, рабочие растворы) должно быть строго стационарным и промаркировано по принадлежности к соответствующей рабочей зоне. Запрещается перемещение оборудования из одной рабочей зоны в другую, особенно из комнаты для электрофореза в другие помещения.
- ✚ Исследуемые образцы ДНК, а также контрольная ДНК должны храниться отдельно от остальных компонентов наборов, в зоне для обработки клинического материала.
- ✚ Подготовку образцов для ПЦР следует проводить в ламинарном боксе, с использованием специального комплекта пипеток и наконечников с аэрозольными фильтрами. Поверхности рабочих столов, на которых производится постановка ПЦР, должны обязательно облучаться ультрафиолетовым светом в течение 20-30 минут до начала и после окончания работ.
- ✚ При подготовке ПЦР необходимо работать в перчатках, все наконечники и пробирки на этой стадии используются только однократно.
- ✚ Анализ и хранение продуктов ПЦР должен осуществляться в отдельном изолированном помещении. Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофореза.
- ✚ Компоненты наборов, используемые на стадии электрофореза, должны храниться в помещении для электрофореза.

## Принцип метода и характеристика наборов

Принцип полимеразной цепной реакции состоит в многократно повторяющихся циклах синтеза (амплификации) специфической области ДНК-мишени в солевом буфере в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозидтрифосфатов (*dNTPs*) и пары олигонуклеотидных праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка и служащих затравками для синтеза цепей ДНК.

На первой стадии каждого цикла при 90-96°C происходит разделение цепей ДНК, затем при 50-70°C (в зависимости от используемой пары праймеров) - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени. Синтез новых цепей ДНК осуществляется ДНК-полимеразой из свободных *dNTPs* путем достраивания присоединившихся праймеров в направлении 5'→3', как правило, при температуре 70-72°C. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25-40 циклов наработать целевую ДНК в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза.

Амплификация аллелей каждого из полиморфных локусов проводится в отдельных реакционных смесях в присутствии специфической для каждого локуса пары праймеров (монолокусный формат).

Условия проведения ПЦР совпадают для большинства локусов, что предопределяет возможность использования общей программы амплификации, а также мультилокусного формата ПЦР для некоторых маркеров.

## Общие сведения

Исследование ДНК является важнейшей составной частью и одним из наиболее мощных методов анализа биологического материала в судебно-медицинских и криминалистических исследованиях. Эффективность расследования судебно-медицинских случаев и ряда преступлений может быть существенно повышена при применении комплекса методик исследования специфических свойств ДНК, выделенной из различных тканей и биологических жидкостей (крови, спермы, слюны, мочи, кожи, волосяного покрова и др.).

Геном человека содержит большое число полиморфных локусов, значительная часть из которых представлена так называемыми *тандемными повторами с изменяющимся числом копий*. Вследствие высокого уровня полиморфизма, локусы этого типа нашли широкое применение в качестве генетических маркеров при изучении генома человека, в том числе при решении задач, относящихся к идентификации личности и установлению родственных связей. Эти полиморфные локусы условно разбиты на два подкласса. Первый из них – *минисателлиты* – характеризуется длиной повтора более семи нуклеотидов и часто называется собственными тандемными повторами с изменяющимся числом копий (*variable number of tandem repeats, VNTRs*). Для второго подкласса – *микросателлитов* – длина повторяющейся единицы составляет от 1 до 6 нуклеотидов, их также называют короткими тандемными повторами (*short tandem repeat, STRs*).

Аллельный полиморфизм микро- и минисателлитов в первую очередь основан на различиях в числе тандемных повторов, содержащихся в разных аллелях, то есть на полиморфизме "длины", нежели "последовательности". Число тандемных повторов в конкретном аллеле может изменяться от одного до нескольких десятков. Обычно в популяции обнаруживается определенный спектр аллелей, отличающихся друг от друга по числу повторяющихся единиц, а у каждого человека имеется строго по два аллеля каждого полиморфного локуса равной (гомозиготный генотип) или разной (гетерозиготный генотип) длины. Таким образом, аллельный полиморфизм мини- и микросателлитов может быть эффективно использован для идентификации личности, поскольку профиль генотипов по нескольким полиморфным локусам является уникальным для каждого человека (исключая однояйцевых близнецов).

Методам типирования переменных локусов генома человека, основанным на гибридизации препаратов ДНК с мульти- и монолокусными ДНК-зондами, присущ ряд ограничений, обойти которые позволяет использование метода ПЦР (англ. *polymerase chain reaction, PCR*). ПЦР является в настоящее время стандартом лабораторного анализа *де-факто*, а к его главным достоинствам следует отнести:

- ✚ высокую и регулируемую специфичность, задаваемую лишь нуклеотидной последовательностью используемых праймеров;
- ✚ высокую чувствительность, позволяющую анализировать образцы, содержащие минимальные количества ДНК различной степени сохранности, вплоть до случаев анализа препаратов ДНК из единичных клеток;
- ✚ возможность быстрого, в течение 1-3 дней, анализа образцов по универсальной процедуре без необходимости использования радиоизотопов.

В литературе можно встретить следующие названия ПЦР-анализа полиморфных микро- и минисателлитных локусов: *Полиморфизм Длины Амплифицированных Фрагментов (ПДАФ), AMPlified Fragment Length Polymorphism (AMP-FLP method)*.

В настоящее время метод ПДАФ практически повсеместно используется в прикладных судебно-медицинских и криминалистических исследованиях, особенно в условиях дефицита биологического материала. Он позволяет точно идентифицировать аллели, различающиеся между собой на один повтор (и даже на один нуклеотид), точно определять размеры аллелей. Дискретность спектра распределения аллелей позволяет оперировать конкретными генотипами, используя стандартную унифицированную номенклатуру.

## Транспортировка, хранение, срок годности и состав наборов

Наборы выдерживают транспортировку в течение семи суток в термосе со льдом или в термоконтейнере с хладагентами, а также в течение четырёх суток при температуре окружающей среды – в том числе при доставке экспресс-почтой.

После получения все компоненты наборов следует хранить при соответствующей температуре в условиях, предохраняющих от перекрестного загрязнения. При соблюдении температурного режима хранения срок годности составляет не менее 12 месяцев с момента внутри-лабораторной проверки (указывается на упаковке).

Один набор включает все необходимые реагенты для постановки 100 реакций в **25 мкл** реакционной смеси по одному (любому) локусу. В состав набора также входят все необходимые реагенты для последующего анализа продуктов амплификации в агарозных или полиакриламидных гелях.

Реагенты для пробоподготовки (выделения ДНК), а также агарозные и полиакриламидные гели в стандартную комплектацию наборов не входят.

Базовая комплектация одного набора и условия хранения каждого компонента указаны в таблице 3.

Таблица 3.

### Состав наборов и условия хранения компонентов

Реагент	Условия хранения	Количество
<b>Реакционные компоненты (хранить в зоне для постановки ПЦР)</b>		
Деионизованная вода <sup>1</sup> (Deionized water)	При комнатной температуре (также допустимо при -20°C)	1 пробирка (из расчёта 2,5 мл на 100 реакций)
10X ПЦР-буфер <sup>2</sup> (10X PCR Buffer)	-20°C	<b>1 пробирка на 2 набора</b> (500 мкл, на 200 реакций)
Taq-полимераза <sup>3</sup> (Taq-polymerase)	-20°C	1 пробирка (из расчёта 25 мкл на 100 реакций)
Смарт Taq-полимераза <sup>4</sup> (Smart Taq-polymerase)	-20°C	1 пробирка (из расчёта 20 мкл на 100 реакций)
Смарт 10X ПЦР-буфер <sup>5</sup> (Smart 10X PCR Buffer)	-20°C	1 пробирка на 1 набор (250 мкл, на 100 реакций)
12,5X Смесь праймеров <sup>6</sup> (12,5X Set of primers)	-20°C	1 пробирка на 1 набор на 1 локус (200 мкл, на 100 реакций)
Вазелиновое масло <sup>7</sup> (Paraffinic Oil)	При комнатной температуре	1 флакон, при необходимости (из расчёта 4,0 мл на 100 реакций)
Контрольная ДНК <sup>8</sup> (Control DNA)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 30 мкл на 100 реакций)
<b>Пост-реакционные компоненты (хранить в электрофоретической зоне)</b>		
6X Буфер для нанесения на гель <sup>9</sup> (6X Loading Solution)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 500 мкл на 1 набор)
Аллельные «лестницы» <sup>10</sup> (Allelic Ladders) Для микросателлитных локусов	-20°C	1 пробирка на 1 набор на 1 локус (300 мкл, на 50 постановок)
Псевдоаллельные «лестницы» <sup>11</sup> (Pseudoallelic Ladders) Для минисателлитных локусов	-20°C	1 пробирка на 1 набор на 1 локус (40 мкл, на 20 постановок)
Высокомолекулярные стандарты ДНК <sup>12</sup> (DNA Markers)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (из расчёта 30 постановок на 1 набор)
Инструкция по применению	При комнатной температуре	1 (при необходимости)

По желанию заказчиков полная комплектация наборов для конкретной поставки указывается в отдельном сопроводительном листе («Лист комплектации наборов для текущей поставки», предоставляется по электронной почте по запросу).



## Характеристика отдельных компонентов наборов

- <sup>1</sup> **Деионизованная вода.** Получена на установке «Супер-Кью» («Millipore», США). Вода реagentного качества (тип I согласно ASTM, NCCLS, ISO и USP, соответствует требованиям ГОСТ 11 029.003-80). Вода с сопротивлением 18,02 МОм\*см (при 25°C) и содержанием общего органического углерода (*total organic carbons, TOC*) менее 20 мкг/л. Очищена от взвешенных частиц, микроорганизмов, органических веществ и некоторых неорганических загрязнителей. Все остальные компоненты наборов приготовлены с использованием воды этого типа.
- <sup>2</sup> **10X ПЦР-буфер. Универсальный десятикратный буфер для всех локусов, уже содержит смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов.** Состав: 166mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20; 20mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM каждый dNTP. Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C.

### Дополнительная информация.

При длительном хранении и большом числе циклов замораживания-оттаивания 10X ПЦР-буфера возможно выпадение нерастворимого осадка белого цвета. Это обусловлено тем, что в присутствии Трис-HCl при определенных условиях dGTP (дезоксигуанозинтрифосфат) при замораживании выпадает в осадок. Это достаточно сложным образом зависит от концентрации dGTP, способа его получения, солевого состава буфера, микропримесей металлов, pH раствора. В этом случае 10X ПЦР-буфер сохраняет работоспособность, но перед использованием его следует тщательно перемешать и быстро отобрать нужный объем для ПЦР. **Не фильтровать!**

- <sup>3</sup> **Taq-полимераза.** Поставляется в виде раствора фермента с концентрацией 5 ед./мкл в буфере следующего состава: 20mM Tris-HCl (pH 8,0); 100mM KCl; 0,1mM EDTA; 1mM DTT; 50% глицерин, 0,5% Nonidet P-40; 0,5% Tween-20. Фермент устойчив на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Термостабильный рекомбинантный фермент ДНК-полимераза с молекулярной массой 94 кДа. Выделен из рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген полимеразы *Thermus aquaticus YTI*. В присутствии ионов [Mg<sup>++</sup>] фермент катализирует полимеризацию нуклеотидов в дуплексную ДНК в 5'→3' направлении. Фермент обладает 5'→3' экзонуклеазной активностью и аденилтрансферазной активностью. Трансферазная активность приводит к добавлению единичного А (аденилата) на 3'-конце синтезируемого двухцепочечного продукта. Одна единица активности *Taq-полимеразы* соответствует количеству фермента, необходимого для включения 10 нмоль dNTP в кислотно-нерастворимую фракцию за 30 минут при +74°C. Неспецифические эндо- и экзонуклеазные активности не обнаруживаются после инкубации в течение двух и одного часов (соответственно) 1 мкг ДНК фага λ и 0,22 мкг ДНК фага λ, гидролизованной рестриктазой *EcoR I*, при 72°C в присутствии 15-20 единиц активности *Taq* ДНК-полимеразы.

### Дополнительная информация.

Фермент сохраняет активность на протяжении не менее 65 циклов амплификации (94°C 1 мин., 56°C 1 мин., 72°C 1 мин.). Позволяет успешно амплифицировать фрагменты ДНК размером до 10 тысяч п.н. Продукты ПЦР можно использовать для А/Т клонирования.  
**Химическая характеристика:** Deoxynucleosidetriphosphate: DNA Deoxynucleosidyltransferase E.C. 2.7.7.7.

- <sup>4</sup> **Смарт Taq-полимераза.** Поставляется в виде раствора фермента с концентрацией 5 ед./мкл. Фермент устойчив на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. *Смарт Taq-полимераза* представляет собой смесь *Taq-полимеразы* и двух клонов специфических моноклональных антител. Основные характеристики фермента соответствуют характеристикам, приведённым выше для *Taq-полимеразы*. Поскольку активность фермента исходно заблокирована моноклональными антителами, то это позволяет осуществлять ПЦР автоматически в режиме «горячего старта»: в условиях приготовления реакционной смеси (при +4°C или при комнатной температуре) ДНК-полимераза не обладает активностью. Диссоциация комплекса *фермент-антитела* (активация ДНК-полимеразы) происходит в первом цикле ПЦР (при температуре выше 70°C). *Смарт Taq-полимераза* демонстрирует более высокую специфичность по сравнению со стандартной *Taq-полимеразой*. *Смарт Taq-полимераза* эффективна при работе с «проблемными» образцами ДНК (деградированный материал, микроколичества), а также в мультиплексных ПЦР.

- <sup>5</sup> **Смарт 10X ПЦР-буфер.** Универсальный десятикратный буфер для всех локусов, уже содержит смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов и *Смарт Таq-полимеразу*. Состав: 166mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 670mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 0.1% Tween-20; 20mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM каждый dNTP; 0,5 ед./мкл *Смарт Таq-полимеразы*; стабилизатор.  
Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C.  
При использовании Смарт 10X ПЦР-буфера все реакции автоматически начинаются в режиме «горячего старта». *Стабилизатор* обеспечивает воспроизводимость результатов после большого количества циклов замораживания-оттаивания (более 100) без снижения активности *Смарт Таq-полимеразы*.

Возможна комплектация всех наборов исключительно в формате «Смарт»: *Смарт 10X ПЦР-буфером* и / или *Смарт Таq-полимеразой* (по согласованию с заказчиком, оговаривается дополнительно).

- <sup>6</sup> **12,5X Смесь праймеров.** Для каждого локуса оптимальные рабочие концентрации праймеров подобраны индивидуально и могут быть изменены производителем без уведомления пользователей. Растворы стабильны на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C.  
Работоспособность каждой пары праймеров проверяется в лаборатории на различных разведениях контрольных ДНК. В реакционную смесь следует вносить по **2,0 мкл** поставляемых растворов.

#### Дополнительная информация.

При длительном хранении (или после большого количества замораживаний - оттаиваний) смесь праймеров в отдельных исключительных случаях может «портиться» - выход целевых продуктов ПЦР становится существенно ниже. Причиной этого, вероятнее всего, является частичная апуринизация праймеров в водных растворах при pH ~ 5,5. В этом случае следует прокипятить пробирку со смесью праймеров в течение трёх минут на водяной бане (или в твердотельном термостате). В результате все «испорченные» праймеры деградируют, и смесь праймеров пригодна для использования.

- <sup>7</sup> **Вазелиновое масло** (*Oleum Vaselini, P.71.273.2*). Используется только при работе с амплификаторами без нагреваемой крышки. *Хранить в защищенном от света месте, не подвергать воздействию ультрафиолетового излучения.*
- <sup>8</sup> **Контрольная ДНК.** Поставляется в виде водного раствора высокомолекулярной очищенной геномной ДНК человека с концентрацией 10 нг / мкл.  
Раствор стабилен на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Допустимо хранение при +4°C при регулярном использовании.  
Используется при стартовых постановках ПЦР для подтверждения работоспособности наборов после транспортировки, а также в качестве «положительных контролей амплификации».  
В реакционную смесь достаточно вносить по **1,0 мкл** (10 нг) поставляемых растворов. Генотипы различных контрольных ДНК по отдельным локусам указаны в таблице «*Референтные генотипы для различных контрольных ДНК*».
- <sup>9</sup> **6X Буфер для нанесения на гель.** Используется для нанесения образцов после ПЦР на гели.  
Состав: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0,03% бромфеноловый синий (*bromophenol blue*), 0,03% ксиленицианол (*xylene cyanol FF*), 60% глицерин, 60 mM ЭДТА.  
Хранить в электрофоретической зоне при +4°C при регулярном использовании. Более длительное хранение осуществляется при -20°C.
- <sup>10</sup> **Аллельные «лестницы»** для микросателлитных локусов. Содержат продукты амплификации соответствующих локусов, поставляются в смеси с буфером для нанесения на гель.  
Хранить в электрофоретической зоне. Растворы стабильны на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Допустимо хранение при +4°C при регулярном использовании.  
Растворы готовы для использования: после полного размораживания и перемешивания следует наносить по 5-7 мкл поставляемых растворов на дорожку в ПАГ (при условии окраски гелей бромистым этидием).
- <sup>11</sup> **Псевдоаллельные «лестницы»** для ряда минисателлитных локусов. Не содержат продуктов амплификации соответствующих локусов, поставляются в смеси с буфером для нанесения на гель.  
Хранить в электрофоретической зоне. Растворы стабильны на протяжении не менее 12 месяцев при хранении при -20°C. Допустимо хранение при +4°C при регулярном использовании.  
Растворы готовы для использования: после полного размораживания и перемешивания следует наносить по 2,0 мкл поставляемых растворов на дорожку в агарозных гелях, на ПАГ – по 1,5 мкл на дорожку.

**Внимание!** По согласованию с заказчиком возможна дополнительная поставка **псевдоаллельных лестниц** в любых количествах для следующих минисателлитных локусов: *DIS80* (№1, №2), *DIS111*, *ApoB-3'VNTR*, *IgH-VNTR*, *D17S5*.

Стандартно один набор для перечисленных локусов комплектуется **40 мкл** соответствующего раствора, на 20 постановок. Для локуса *DIS80* каждый набор комплектуется двумя пробирками: псевдоаллельные лестницы №1 и №2 (по 40 мкл каждого раствора).

- <sup>12</sup> **Высокомолекулярные стандарты ДНК** (нелокусные маркёры молекулярного веса).  
Поставляются в буфере следующего состава: 8,33 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 0,83 мМ ЭДТА, 1X буфер для нанесения на гель. Концентрация 100-170 нг/мкл.  
Хранить в электрофоретической зоне: при регулярном использовании при +4°C, более длительное хранение при -20°C.

Высокомолекулярные стандарты ДНК готовы для использования: после полного размораживания и перемешивания в лунку геля наносится по 1,5-2,0 мкл (агароза) или 1,0 мкл (ПАГ) поставляемых растворов.

В **таблице 4** приведён перечень поставляемых маркёров, с указанием всех фрагментов ДНК. Для маркёров, полученных с использованием эндонуклеаз рестрикции, размеры фрагментов рассчитаны по сайтам рестрикции. **Подчёркнуты** фрагменты, которые обычно не видны в агарозных гелях. **Жирным шрифтом** выделены фрагменты, визуальнее более интенсивные в гелях.

Таблица 4.

### Высокомолекулярные стандарты ДНК

Высокомолекулярные стандарты ДНК	Общее число фрагментов ДНК	Длины фрагментов ДНК, в парах нуклеотидов	Использование в ПАГ (*)
<i>pUC19 DNA / MspI</i>	13	501; 489; 404; 331; 242; 190; 147; 111; 110; <u>67; 34; 34; 26</u>	+
<i>50 – 1000 bp DNA Ladder</i>	11	1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 50	+
<i>100 bp DNA Ladder</i>	10	1000; 900; 800; 700; 600; <b>500</b> ; 400; 300; 200; 100	-
<i>50 – 500 bp DNA Ladder</i>	10	500; 450; 400; 350; 300; 250; 200; 150; 100; 50	+
<i>50 – 700 bp DNA Ladder</i>	10	<b>700; 500</b> ; 400; 350; <b>300</b> ; 250; 200; 150; 100; 50	+/- <b>(фрагмент 300)</b>
<i>800 – 2000 bp DNA Mass Ladder (**)</i>	3	2000; 1200; 800	-
<b>Псевдоаллельные лестницы для минисателлитных локусов</b>			
<i>Псевдоаллельная лестница DIS111</i>	17	973; 936; 899; 862; 825; 788; 751; 714; 677; 640; 603; 566; 529; 492; 455; 418; 381	+
<i>Псевдоаллельная лестница D17S5</i>	15	1150; 1080; 1010; 940; 870; 800; 730; 660; 590; 520; 450; 380; 310; 240; 170	+
<i>Псевдоаллельная лестница ApoB-3'VNTR</i>	13	930; 900; 870; 840; 810; 780; 750; 720; 690; 660; 630; 600; 570	+

Таблица 4 (окончание)

Высокомолекулярные стандарты ДНК	Общее число фрагментов ДНК	Длины фрагментов ДНК, в парах нуклеотидов	Использование в ПАГ (*)
<i>Псевдоаллельная лестница IgH-VNTR</i>	12	1020; 970; 920; 870; 820; 770; 720; 670; 620; 570; 520; 470	+
<i>Псевдоаллельная лестница DIS80-№1</i>	11	702; 672; 638; 606; 574; 542; 510; 478; 446; 414; 382	+
<i>Псевдоаллельная лестница DIS80-№2</i>	11	718; 686; 654; 622; 590; 558; 526; 494; 462; 430; 398	+
<b>Высокомолекулярные стандарты ДНК, снятые с поддержки (***)</b>			
<i>pBR322 DNA / Tapotili</i>	29	421; 404; 368; 307; 242; 201; 190; 180; 170; 160; 147; 136; 130; 123; 119; 118; 110; 108; 106; 90; 76; 67; 47; 41; 34; 26; 15; 11; 9	+
<i>pBR322 DNA / MspI</i>	21	622; 527; 404; 307; 242; 238; 217; 201; 190; 180; 160; 147; 123; 110; 90; 76; 67; 34; 26; 9; 5	+
<i>pBR322 DNA / BsuRI (HaeIII)</i>	22	587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21, 18, 11, 8	+
<i>pBR322 DNA / AluI</i>	17	908; 659; 656; 521; 403; 281; 257; 226; 100; 90; 63; 57; 49; 46; 19; 15; 11	- <b>(фрагменты 659, 656, 403, 257)</b>
<i>pBlueScript DNA / MspI</i>	13	710; 489; 404; 325; 242; 190; 157; 147; 110; 67; 57; 34; 26	+
<i>50 – 2000 bp PCR Marker</i>	8	2000; 1500; 1000; 750; 500; 300; 150; 50	+

(\*) Все перечисленные высокомолекулярные стандарты ДНК пригодны для использования в агарозных гелях.

При использовании этих маркеров в неденатурирующих ПАГ (29:1 или 19:1, различной процентности) следует учитывать, что в ПАГ подвижность отдельных фрагментов ДНК может являться аномальной. Как следствие, это может привести к некорректному определению размеров амплифицированных аллелей генотипируемых полиморфных локусов.

Например, для высокомолекулярного стандарта *pBR322 DNA / AluI* в неденатурирующих ПАГ (6-10%, 29:1) аномальную подвижностью демонстрируют фрагменты ДНК размером 659, 656, 403 и 257 п.н.

(\*\*) Высокомолекулярный стандарт ДНК **800 – 2000 bp DNA Mass Ladder** следует использовать для количественной оценки ДНК в продуктах ПЦР путём сравнения интенсивности свечения фрагментов ДНК. При нанесении **3 мкл** этого маркера на агарозный электрофорез количество ДНК в соответствующих фрагментах следующее: **2 000 bp = 50 ng; 1 200 bp = 30 ng; 800 bp = 20 ng.**

(\*\*\*) Для высокомолекулярных стандартов ДНК, снятых с поддержки, информация в таблице сохраняется справочно. Поставка отдельных таких маркеров возможна только под заказ.

## Забор биологического материала и выделение ДНК

Молекулярно-генетический анализ позволяет эффективно исследовать практически любой биологический материал: кровь, слюну, сперму, волосы, костную и мышечную ткань, биопсийный материал, мочу, амниотическую жидкость, ногти, использованные женские прокладки, окурки сигарет и пр.

При заборе биологического материала у живых лиц предпочтение следует отдать неинвазивным (от лат. *invasio* – вторгаюсь) методам, которые более приятны для обследуемых.

Способам забора, хранения и транспортировки различных биологических образцов посвящена обширная литература. Еще более обширная литература посвящена различным методам выделения и дополнительной очистки ДНК. В **Приложении** приведены лишь основные рекомендуемые методики с указанием ссылок на первоисточники, без претензии на полноту изложения. Более подробную информацию можно найти в работах, приведённых в списке литературы. Исследователям, не владеющим английским языком, можно рекомендовать монографии *Корниенко и др. (2001, 2012)*, в которых рассмотрены вопросы пробоподготовки объектов биологического происхождения для молекулярно-генетической идентификации личности с подробным изложением различных методов выделения ДНК.

В целом, ДНК из биологических образцов можно успешно выделять принципиально различными методами. Это зависит от природы и количества исследуемого образца, материальной базы лаборатории и личных предпочтений и навыков сотрудников. Из всех известных способов выделения ДНК наиболее универсален и качественен по очистке «классический» метод, основанный на использовании различных лизирующих буферов, *протеиназы K* и органических растворителей (фенол/хлороформ). С другой стороны, этот метод является и наиболее трудоемким.

Из экспресс-методов выделения ДНК в первую очередь следует рекомендовать использование ионообменной смолы *Челекс-100 (Chelex<sup>R</sup>100)*. Метод основан на связывании продуктов клеточного лизиса и ингибиторов ПЦР (таких, как ионы магния) специальным хелатирующим реагентом. В большинстве случаев процесс выделения занимает меньше одного часа, при этом все манипуляции производятся в одной пробирке. Отдельные зарубежные производители достаточно давно выпускают коммерческие комплекты реагентов для очистки ДНК этим методом, например: *InstaGene<sup>TM</sup> Matrix* (“Bio-Rad Laboratories”, США), *ReadyAmp<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification System* (“Promega Corporation”, США). При этом протоколы разных производителей могут в деталях отличаться между собой и с приведенными в Приложении. Следует учитывать, что качество и стабильность «челексных» препаратов ДНК часто может быть хуже, чем препаратов ДНК, полученных в ходе фенол-хлороформной очистки.

Также в настоящее время производится большое количество оборудования и коммерческих наборов для выделения ДНК, включая полностью автоматизированные методы.

## Качественный и количественный контроль при выделении ДНК

При работе с микроколичествами биологического материала, независимо от используемого метода выделения ДНК, обязательно следует осуществлять постановку «контрольного образца экстракции». Для этого в отдельной пробирке, не внося в нее никакого биологического материала, параллельно проводятся все манипуляции согласно протоколу.

Измерение концентрации выделенной ДНК является важной промежуточной стадией анализа, позволяющей избежать возможных дальнейших артефактов. Самым простым, но и приблизительным методом (уверенно можно определить только порядок концентрации выделенной ДНК) является сравнение со стандартными разведениями эталонной высокомолекулярной ДНК (например, с разведениями ДНК фага лямбда в диапазоне концентраций от 1 до 500 нг/мкл).

Для этого проводят электрофорез в 0,5-1% агарозном геле, окрашивают гель бромистым этидием и сравнивают интенсивность свечения полос ДНК в выделенных и эталонных образцах. На деградацию и некачественную очистку образцов ДНК указывает наличие «шмеров» выше или ниже основной полосы.

## Важные предубеждения

Наборы ТАПОТИЛИ обеспечивают устойчивые воспроизводимые результаты по всем локусам при внесении в реакционную смесь **5 нг** и более очищенной высокомолекулярной ДНК человека (при отсутствии в исследуемом образце ингибиторов ПЦР). Объем вносимого в реакционную смесь образца ДНК зависит от метода выделения, концентрации ДНК, а также от возможного наличия ингибиторов.

В общем случае в реакционную смесь предпочтительно вносить малые количества (5-100 нг) и объёмы (1-5 мкл) образцов ДНК. В последнем случае концентрация вносимых потенциальных ингибиторов и изменения pH реакционной смеси оказываются минимальными.

При регулярном недостаточном количественном выходе продуктов реакции число циклов ПЦР может быть увеличено с 30 до 35-45, при этом нет необходимости увеличивать количество *Taq*-полимеразы, вносимой в реакционную смесь.

При неудовлетворительных результатах анализа «проблемных» образцов ДНК, содержащих ингибиторы ПЦР, амплификацию следует повторить с двукратным количеством фермента *Смарт Taq*-полимеразы (0,2 мкл).

## Проведение ПЦР

10X ПЦР-буферы, 12,5X смеси праймеров и образцы исследуемой ДНК перед каждым использованием следует полностью разморозить при комнатной температуре. Затем перемешать содержимое пробирок, встряхнув на Вортексе в течение нескольких секунд. Осадить содержимое всех используемых пробирок на дно (центрифугированием в течение нескольких секунд).

Для постановки ПЦР для одного образца ДНК по одному (любому) локусу в амплификационную пробирку вносят следующие реагенты в указанном порядке:

Реагент	При использовании 10X ПЦР-буфера и <i>Taq</i> -полимеразы	При использовании 10X ПЦР-буфера и <i>Смарт Taq</i> -полимеразы	При использовании <i>Смарт 10X ПЦР-буфера</i>
Деионизованная вода	19,3 мкл	19,4 мкл	19,5 мкл
10X ПЦР-буфер	2,5 мкл	2,5 мкл	2,5 мкл
12,5X смесь праймеров	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Полимераза	0,2 мкл	0,1 мкл	-
Исследуемый образец ДНК (10-100 нг/мкл, *)	1 мкл	1 мкл	1 мкл
<b>Суммарный объём</b>	<b>25 мкл</b>	<b>25 мкл</b>	<b>25 мкл</b>

(\*) При работе с низкими концентрациями ДНК (<10 нг/мкл) следует увеличить вносимый в реакционную смесь объём исследуемого образца за счет соответствующего уменьшения объёма деионизованной воды.

### Внимание!

Количество матрицы ДНК, вносимой в ПЦР-смесь, должно быть **не менее 5,0 нг** на 25 мкл реакционной смеси. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует адекватную наработку специфических продуктов реакции при 30 циклах ПЦР. При работе с низкими концентрациями стартовой ДНК число циклов ПЦР следует увеличить до **35**.

Для получения воспроизводимых результатов необходимо строгое соблюдение объёмов добавляемых компонентов. Поэтому для более точного соблюдения концентрационных условий и однородности всех проб рекомендуется смешивать в отдельной стерильной пробирке все компоненты для ПЦР (за исключением, естественно, образцов ДНК) из расчёта:

**(объём компонента для 1 образца) \* (число исследуемых образцов + 3)**

После тщательного перемешивания такая смесь разливается по амплификационным пробиркам, после чего в них добавляют исследуемые образцы ДНК.

В каждом раунде ПЦР осуществляется также постановка «положительного контроля амплификации» (образец К+, *Положительный Контрольный Образец, ПКО*) и «отрицательного контроля амплификации» (образец К-, *Отрицательный Контрольный Образец, ОКО*). Последний необходим для контроля как возможного загрязнения компонентов наборов чужеродной ДНК, так и соблюдения чистоты условий в конкретном раунде пробоподготовки.

---

В пробирку *ОКО* вместо исследуемого образца ДНК добавляют такой же объём деионизованной воды. В пробирку *ПКО* добавляют **1,0 мкл** поставляемой контрольной ДНК.

При использовании амплификаторов без нагреваемой крышки во все пробирки добавляют по одной капле (примерно 20 мкл) минерального или вазелинового масла для предотвращения испарения реакционной смеси. После добавления всех компонентов пробирку следует сразу закрыть.

Пробирки откручивают в течение нескольких секунд на Вортексе для осаждения на дно капель на стенках и удаления пузырьков воздуха между реакционной смесью и маслом.

Помещают пробирки в амплификатор и проводят ПЦР по соответствующим программам. Рекомендуется начинать амплификацию не позднее, чем через 30 минут после добавления образцов ДНК в реакционную смесь.

При использовании *Смарт Taq*-полимеразы вместо стандартной *Taq*-полимеразы условия ПЦР не меняются.

Все указанные в настоящей «Инструкции» программы ПЦР для отдельных локусов обеспечивают устойчивые воспроизводимые результаты (электрофоретические аллельные полосы удовлетворительной интенсивности без переработки неспецифических продуктов реакции) при использовании прибора *МС-2* («Терцик», «ДНК-Технология», Россия) в комбинации с тонкостенными пробирками.

Устойчивые воспроизводимые результаты с использованием этих же программ ПЦР были получены на следующих приборах: *PHC-2* (“Techné”, Великобритания), *PolyChain* (“Polygen”, Австрия), *PTC-100* (“MJ Research Inc.”, Великобритания), *Omni-E*, *TouchDown* (“Hybaid”, Великобритания), *GeneAmp® PCR System 9600* и *9700*, *Veriti Thermal Cycler* (“Applied Biosystems”, США), *T1 Thermocycler* (“Biometra GmbH”, Германия), *DNA Engine Dyad®*, *T100™ Thermal Cycler* (“Bio-Rad Laboratories”, США), *Циклотемп-2...5* (СТМ, Россия), *БИС М-111* («БИС-Н», Россия).

При использовании других, не перечисленных выше, моделей термоциклеров или несоответствующих ПЦР-пробирок может возникнуть необходимость в коррекции условий ПЦР.

После завершения реакции все пробирки следует собрать в специальный штатив и перенести в электрофоретическую зону. Образцы можно сразу же анализировать методом электрофореза или хранить при 2-8°C несколько недель, а при -20°C – несколько месяцев.

## Регистрация результатов

Аmplифицированные фрагменты ДНК можно анализировать в агарозных или в полиакриламидных гелях (ПАГ). Визуализация фрагментов ДНК может осуществляться различными методами: гибридизация по Саузерну, окрашивание бромистым этидием или другими интеркалирующими красителями (например, SYBR Green I, любые гели), окрашивание гелей нитратом серебра (только ПАГ).

Различные модификации методов электрофореза как в агарозных, так и в полиакриламидных гелях подробно описаны во многих источниках, отдельные рекомендуемые методики приведены в Приложении. Более подробную информацию можно найти в работах, приведенных в списке литературы.

Перед нанесением на гель анализируемые образцы смешиваются с *6X буфером для нанесения на гель* (поставляется в комплекте) в объёмном соотношении 5:1. Можно сразу по окончании ПЦР добавить во все пробирки по 5-6 мкл этого буфера. Присутствие красителей в буфере облегчает нанесение образцов на гель и позволяет в процессе электрофореза контролировать, в какой части геля находятся целевые фрагменты ДНК.

В зависимости от количественного выхода продуктов ПЦР и метода визуализации фрагментов ДНК в гелях, для одного нанесения следует брать 3-7 (ПАГ) или 4-10 (агароза) мкл амплифицированного образца. Следует учитывать, что избыточное количество продукта ПЦР, наносимое на дорожку геля (перегруз), приводит к такому эффекту, как увеличение подвижности целевых фрагментов ДНК в геле.

Как минимум одну дорожку в геле используют для нанесения соответствующего *нелокусного высокомолекулярного стандарта ДНК* (поставляется в комплекте). *Аллельные лестницы* (поставляются в комплекте) наносят таким образом, чтобы каждый анализируемый образец находился рядом с соответствующей аллельной лестницей. Они представляют собой смесь в одной пробирке большинства известных аллелей для анализируемого локуса.

Электрофорез проводят при напряжённости поля около 10 В/см (агарозные гели) или 25 В/см (ПАГ), помещая гель стартовыми лунками к катоду (минус, черный разъем). Напряжённость поля рассчитывается как выходное напряжение источника питания (измеренное в вольтах), делённое на расстояние между электродами камеры (измеренное в сантиметрах). Расстояние между электродами для горизонтального электрофореза определяется по прямой проекции на плоскость, без учета геометрии камеры.

Реальные значения максимального напряжения (соответственно, минимального времени электрофореза) сильно зависят от моделей источников питания и камер, процентности геля, типа, кратности и свежести используемого буфера. Основным критерием завышенных значений напряжения (мощности) является перегрев буфера в камере свыше 50°C, а также сильное искривление фронта лидирующего красителя (эффект улыбки). Важно учитывать, что проведение электрофореза при завышенном напряжении равносильно уменьшению длины геля (разрешающей способности). То есть для максимального разделения в геле соседних фрагментов ДНК электрофорез следует проводить при низком напряжении (в диапазоне 2-6 В/см для агарозных гелей).

По окончании электрофореза окрашивают гель и документируют полученные результаты. Агарозные и неденатурирующие ПАГ можно окрашивать в растворе бромистого этидия (рабочая концентрация раствора от 0,5 до 1,25 мкг/мл, окрашивание в течение 20-40 мин) с последующей промывкой в дистиллированной воде и просмотром в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе (длина волны 254 или 302 нм). Неденатурирующие и денатурирующие ПАГ можно также окрашивать нитратом серебра (методики приведены в приложениях).

Полученные результаты документируют фотографированием (видеосъемкой, сканированием) гелей с использованием при необходимости оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра или в виде высушенных гелей (в случае окрашивания ПАГ серебром).



## Учёт результатов

После электрофореза на дорожках геля в аллельном диапазоне должны отчетливо выявляться **один** (гомозиготный генотип) или **два** (гетерозиготный генотип) амплифицированных фрагмента ДНК. Для микросателлитных локусов допустима визуализация отдельных дополнительных полос меньшей интенсивности выше аллельного диапазона, которые не учитываются при определении генотипов.

Визуализация каких-либо полос на дорожке отрицательного контроля свидетельствует о загрязнении реакционной смеси чужеродной ДНК (контаминация). Результаты анализа в таких случаях не подлежат учету для всех образцов.

Визуализация в исследуемых образцах в аллельном диапазоне трех и более полос одинаковой интенсивности (вплоть до «частокола») свидетельствует либо о загрязнении образца чужеродной ДНК (возможно и смешанное происхождение образцов), либо о неоптимальных условиях амплификации (присутствие ингибиторов, деградация праймеров). В таких случаях результаты не учитывают, повторяют постановку ПЦР; при повторных неудовлетворительных результатах необходимо обратить внимание на стадию выделения ДНК, заменить рабочие растворы для ПЦР и / или откорректировать условия проведения ПЦР на конкретном исследуемом амплификаторе.

Для каждого исследуемого образца идентифицируют аллели, сопоставляя амплифицированные фрагменты ДНК с соответствующими фрагментами известных размеров в аллельных «лестницах» (либо в нелокусных высокомолекулярных стандартах ДНК) на соседних дорожках в геле. Выявленные генотипы (комбинацию аллелей) следует фиксировать в численной форме, с использованием стандартной номенклатуры аллелей для каждого из локусов (см. соответствующие аллельные таблицы по локусам). Пример указания выявленных генотипов приведен в настоящей Инструкции в разделе «*Референтные генотипы для различных контрольных ДНК*».

Если по какому-либо **минисателлитному** локусу в геле визуализируется только один относительно низкомолекулярный аллель, то следует учитывать возможный эффект так называемой "*предпочтительной амплификации*". Этот эффект в максимальной степени проявляется в условиях переизбытка стартовой ДНК, когда в анализируемом гетерозиготном образце аллели значительно различаются по длине. В этом случае количественная наработка ДНК-полимеразой низкомолекулярного аллеля происходит в гораздо большей степени. Поэтому интенсивность свечения высокомолекулярного аллеля оказывается значительно ниже (может отсутствовать вообще). Ярко выраженный эффект "*предпочтительной амплификации*" может привести к ошибочному заключению о гомозиготности по данному **минисателлитному** локусу (так называемая "*ложная гомозиготность*"): анализируемый образец на самом деле является гетерозиготным, но имеющийся высокомолекулярный аллель не выявляется в ходе исследования. В сомнительных случаях следует повторить ПЦР, внося в реакцию не более 20 нг ДНК.

Существенные ограничения, в первую очередь при использовании **минисателлитных** локусов, накладываются на учет результатов при анализе деградированных препаратов ДНК, выделенных из пятен крови, спермы, а также частей волосяного покрова и трупного материала, подвергшихся разложению под действием огня или биологических факторов. При анализе подобных препаратов отсутствие электрофоретических полос в аллельном диапазоне даже после 35-40 циклов ПЦР может свидетельствовать о полной деградации аллелей анализируемого локуса.

Если при анализе деградированного образца ДНК в геле визуализируется только один относительно низкомолекулярный аллель, то в этом случае также существует опасность "*ложной гомозиготности*", поскольку вероятность деградации высокомолекулярного аллеля существенно выше, нежели низкомолекулярного.

Необходимо также учитывать разрешающую способность агарозных гелей при анализе аллельных продуктов локусов с небольшой длиной повтора (**минисателлитные** локусы *DIS80*, *ApoB-3'VNTR*). Поэтому для повышения разрешающей способности, точности определения длин амплифицированных аллелей, а также во избежание опасности "*ложной гомозиготности*" во всех случаях (особенно – для минисателлитов при визуализации лишь одного низкомолекулярного аллеля в агарозном геле) рекомендуется электрофоретическое разделение продуктов реакции в ПАГ.

Определение размеров амплифицированных фрагментов для некоторых **минисателлитных** локусов может проводиться по нелокусным высокомолекулярным стандартам ДНК методом компьютерной интерполяции и регрессионного анализа. Алгоритм расчётов основан на логарифмической зависимости длин пробегов фрагментов ДНК в гелях (от стартовых лунок геля, в миллиметрах) от размеров этих фрагментов ДНК (в парах нуклеотидов).

Простейшую компьютерную программу такого рода мы можем прислать по электронной почте по запросу (dzek.zip, 50К). В ней в качестве калибровочного алгоритма используется кубический сплайн (сплайн третьего порядка).

---

Следует учитывать, что для всех **минисателлитных** локусов показано непостоянство длины тандемного повтора, обусловленное наличием внутренних нуклеотидных вставок и делеций. Поэтому определяемые экспериментально по нелокусным высокомолекулярным стандартам ДНК длины амплифицированных аллелей могут незначительно отклоняться от размеров, приводимых в таблицах аллельных частот.

Также следует учитывать, что подвижность фрагментов ДНК и, как следствие, взаимное расположение окрашенных полос в геле при разделении в агарозных и полиакриламидных гелях сложным образом зависит от целого ряда факторов: тип и степень очистки используемых электрофоретических реагентов, процентность геля, условия проведения электрофореза, используемые внешние стандарты ДНК. Поэтому при определении длин амплифицированных аллелей **минисателлитных** локусов с использованием нелокусных высокомолекулярных стандартов ДНК в ряде случаев возможны определенные затруднения.

Более простое, уверенное и точное генотипирование достигается при использовании аллельных «лестниц», использование которых обязательно при анализе **микросателлитных** локусов.

Практически для всех **микросателлитных** локусов показано существование «промежуточных» аллелей. Эти аллели отличаются от «основных» аллелей на 1 или 2 п.н. и выявляются относительно редко. Для каждого локуса под таблицей, описывающей «основные» аллели, перечисляются известные «промежуточные» аллели. При интерпретации результатов следует учитывать возможность выявления указанных «промежуточных» аллелей.

Во всех сомнительных случаях, когда невозможно точно отнести амплифицированный фрагмент к известному аллелю, его следует относить к **более частому** из соседних возможных аллелей. Это позволяет свести к минимуму возможность экспертной ошибки «*против обвиняемого*» при вероятностных расчетах.

На основе результатов генотипирования для каждого локуса по аллельным таблицам определяют частоты выявленных аллелей и проводят соответствующие расчёты.

## Эталонные частоты аллелей и вероятностные расчеты

При семейном анализе для всех локусов наблюдалось кодоминантное аутосомное распределение и менделевское наследование аллелей. Аллельный спектр и параметры информативности для всех локусов изучены на различных эталонных (референтных) выборках из европеоидного населения России. Объёмы исследованных выборок и литературные источники указаны в соответствующих разделах для каждого локуса. Распределение наблюдавшихся генотипов для всех локусов подчинялось равновесию Харди-Вайнберга. Для каждого маркера приведены экспериментальные частоты аллелей, рассчитанные по эталонным выборкам. Эталонные частоты аллелей корректируются по мере накопления новых популяционных данных – следите за обновлениями.

В последних столбцах аллельных таблиц приводится их «консервативная оценка для европеоидного населения России». **Именно эти значения рекомендуется использовать при всех вероятностных расчетах в экспертной практике.**

Для вероятностных расчётов популяционные частоты выявленных редких или «новых» аллелей следует полагать не меньше  $5/2n$ , где  $n$  – число человек в исследованной эталонной популяционной выборке. При таком условии для эталонной выборки объёмом 200 человек используемые при расчетах частоты аллелей будут не меньше  $5/400 = 0,0125$ .

Поскольку в исследованных референтных выборках наблюдались не все известные для данных локусов аллели (сравнительный анализ с другими популяциями), то для выявленного «нового» аллеля следует также проводить такую оценку ( $5/2n$ ) или полагать его частоту равной 0,013.

### Внимание!

Исходя из хромосомной локализации локусов, входящих в наборы ТАПОТИЛИ, потенциально сцепленными между собой следует считать следующие группы (пары) маркеров: *ApoB-3'VNTR* и *TPOX*; *D7S820* и *NOS3-VNTR*; *DRD4-VNTR* и *TH01*. Соответственно, в этих группах неприемлемо правило перемножения частот аллелей (генотипов) при вероятностных расчётах. Для расчётов следует использовать данные только для одного (любого) локуса из каждой пары сцепления.

При использовании других наборов реагентов (других локусов) возможное сцепление между всеми используемыми маркерами Вы можете оценить из **Таблицы возможного сцепления** настоящей Инструкции.

При исследованиях случаев спорного отцовства (материнство рассматривается как бесспорное, анализируется только один предполагаемый отец) для достоверного отрицания отцовства необходимо и достаточно исключение по трем независимым локусам. В случаях *неисключения* отцовства необходимый уровень достоверности может быть достигнут только при исследовании не менее десяти локусов.

Для расчётов индекса и вероятности отцовства (материнства) рекомендуем использовать компьютерную программу **Pindex**. А для расчёта вероятности случайного совпадения комбинированных генотипов (*random match probability, RMP*) – программу **Gency**. Все подробности об этих программах доступны на сайте.

## Техническое содействие / информация

Благодарим Вас за то, что Вы предпочли нашу “in-house-made” продукцию и будем рады продолжить сотрудничество.

Актуальная версия настоящей Инструкции доступна по ссылке: <https://tapotili.ru/doc/tapotili.pdf>

Адресуйте все вопросы, предложения, а также возможные рекламации:

Интернет: <https://www.tapotili.ru/>

Электронная почта [info@tapotili.ru](mailto:info@tapotili.ru)

Моб. тел. +7-903-786-4-789

Ефремов Илья Алексеевич, кандидат биологических наук

## Референтные генотипы различных контрольных ДНК

Локус	K562 (*)	9947A (*)	9948 (*)	L-68 (*)	007 (**)	2800M (**)	CO (**)	CP (**)	Tap1 (**)
<b>Микросателлиты</b>									
TPOX	8/9	8/8	8/9	11/11	8/8	11/11	11/11	8/11	9/11
UGT1A1-STR	6/6 (WT)	6/6	6/7	6/7	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6
D3S1358	16/16	14/15	15/17	16/16	15/16	17/18	15/15	15/18	15/17
FGA	<u>21/24</u>	23/24	24/26	21/23	24/26	20/23	21/24	19/24	20/22
CSF1PO	9/ <u>10</u>	10/12	10/11 (***)	9/10	11/12	12/12	10/10	10/11	10/11
D7S820	9/11	10/11	11/11	10/10	7/12	8/11	8/10	8/10	10/10
LPL	10/ <u>12</u>	11/12	10/12	10/10	10/10	11/13	12/12	10/12	11/12
D8S1179	12/12	13/13	12/13	10/12	12/13	14/15	13/13	12/13	8/13
D10S1248	12/12	13/15	12/15	14/14	12/15	13/15	14/14	13/14	12/14
TH01	9.3/9.3	8/9.3	6/9.3	7/9.3	7/9.3	6/9.3	7/9	7/7	6/9.3
vWFII	13/13	11/11	11/13	11/11	9/14	9/12	11/12	12/12	12/13
PAH	<u>4/6</u>	4/6	4/4	5/7	3/5	1/4	4/6	4/6	4/5
D13S317	8/8	11/11	11/11	8/13	11/11	9/11	11/12	11/12	11/12
D16S539	11/ <u>12</u>	11/12	11/11	11/12	9/10	9/13	12/13	12/13	11/12
D18S51	15/16	15/19	15/18	14/16	12/15	16/18	13/16	13/15	16/16
D19S253	<u>15/17</u>	7/9	15/17	17/17	13/17	17/17	15/19	17/19	17/21
D19S433	14/ <u>14.2</u>	14/15	13/14	<u>13/15</u>	14/15	13/14	13/15	13/14	13/16.2
D20S482	15/15	14/15	13/14	14/14	14/15	14/15	12/14	12/15	13/15
D21S11	29/30/31	30/30	29/30	29/30	28/31	29/31.2	31.2/32.2	31.2/32.2	28/29
D22S1045	16/16	11/14	16/18	16/17	11/16	16/16	11/17	11/16	12/15
<b>Минисателлиты</b>									
D1S80	<u>18/29</u>	18/31	18/25	18/25	29/33		24/33		24/28
D1S11	15/ <u>18</u>	15/18		12/20			18/18		18/18
ApoB-3'VNTR	37/37	<b>37/51</b>	<b>37/37</b>	31/37	<b>37/37</b>		33/37	33/37	31/37
IL1RN-VNTR	<u>2/4</u>	4/4	<u>2/4</u>	<u>2/4</u>	4/4	2/4	2/4	<u>2/5</u>	4/4
DAT-3'VNTR	9/10	10/10	9/10	10/10	9/10	10/10		10/10	8/10
NOS3-VNTR	5/5 (WT)	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
DRD4-VNTR	4/4 (WT)	4/4	2/7	4/4	2/3	4/5	4/4	4/4	2/7
IgH-VNTR	8/8			12/12	<u>10/16</u>	<u>10/16</u>	12/16	<b>8/16</b>	8/10
D17S5	2/2	5/8	1/12	<u>2/12</u>	9/11	2/4	10/10	<u>7/10</u>	3/4
5-HTT-LPR	16/16	14/16	16/16	14/16	14/16	14/16		14/16	16A/16A
<b>Локусы для определения половой принадлежности</b>									
Амелогенин	X/X	X/X	X/Y	X/X	X/Y	X/Y	X/Y	X/X	X/Y

В таблице подчёркнуты аллели, визуально более интенсивные в гелях.

WT – wild type, генотип «дикого типа», то есть нормальный, не-мутантный.

Работа по заполнению пустых клеток и уточнению данных продолжается. *Красным курсивом* выделены генотипы, требующие уточнения. Следите за обновлениями описания.

(\*) Высокомолекулярная ДНК, выделенная из различных стандартных культур клеток человека, от разных людей. K562 – эритроидная клеточная линия от пациентки с хроническим миелоидным лейкозом (chronic myeloid leukemia, CML). L-68 – культура диплоидных клеток (фибробласты) из здоровой ткани лёгкого. Клеточные линии 9947A и 9948 в литературе обозначаются также как GM9947 и GM9948.

Дополнительная информация о референтных клеточных линиях доступна в работах Frégeau et al., 1995; Gribble et al., 2000; Szibor et al., 2003; а также в сети Интернет, например:

Coriell Institute for Medical Research, <https://catalog.coriell.org>

ATCC (American Type Culture Collection), <https://www.atcc.org>

---

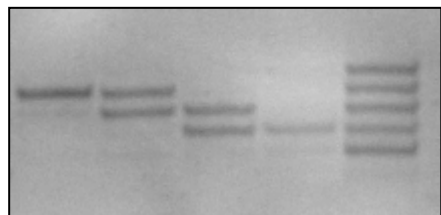
(\*\*) Контрольная ДНК, выделенная из жидкой крови, полученной от различных анонимных доноров. Наборы могут укомплектовываться контрольной ДНК, полученной от разных доноров, то есть разные партии наборов могут укомплектовываться различными контрольными ДНК с различными, соответственно, генотипами. Следите за маркировкой пробирок.

(\*\*\*) Для ДНК 9948 по локусу *CSF1PO* генотип определяется нами именно как двухаллельный, 10 / 11. Однако в отдельных Руководствах "*Promega Corporation*" (США) генотип по этому локусу (был) указан как трёх-аллельный: 10 / 11 / 12. Смотрите пояснения и рисунки в разделе про локус *CSF1PO*.

## TPOX

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин



Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», которая изображена на рисунке слева (фрагмент окрашенного солями серебра неденатурирующего ПАГ, фотографирование в проходящем свете).

*Изображение получено в Тюменском областном Бюро судебно-медицинской экспертизы: судебная экспертиза по установлению отцовства (2011 год).*

Слева направо, по дорожкам:

Дорожка 1 – положительный контроль ПЦР (генотип 11/11).

Дорожка 2 – мать ребёнка (генотип 10/11).

Дорожка 3 – ребёнок (генотип 9/10).

Дорожка 4 – предполагаемый отец (генотип 9/9).

**Дорожка 5 – аллельная «лестница», включающая 5 аллелей: 8, 9, 10, 11, 12.** Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе TPOX

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
5	102	0	0,001
6	106	0,00135	0,003
7	110	0	0,001
<b>8</b>	114	0,57951	0,580
<b>9</b>	118	0,08760	0,089
<b>10</b>	122	0,05930	0,061
<b>11</b>	126	0,24394	0,245
<b>12</b>	130	0,02830	0,030
13	134	0	0,001
14	138	0	0,001
15	142	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей 4 – 16, в том числе «промежуточных» аллелей 7.3, 10.1, 10.3, 13.1.

Микросателлит *TPOX* входит в число основных локусов (“core loci”) национальной базы данных США (Combined DNA Index System, *CODIS*, 13 аутосомных локусов), а также в число рекомендованных дополнительных локусов Евросоюза и Великобритании.

---

Микросателлит *TPOX* расположен в интроне 10 гена тиреоидной пероксидазы. Другие названия этого маркера, используемые в разных источниках: *hTPO*, *TPO*, *UniSTS:240638*. Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,01%.

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">M68651</a>	14-JAN-1995	11 повторов: (AATG) <sub>11</sub> или (CATT) <sub>11</sub>	126

**M68651**: Human thyroid peroxidase (hTPO) gene, exon 10.

**Ссылки:**

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – J. Forensic Sci., 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Anker R., Steinbrueck T., Donis-Keller H. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. – Hum. Mol. Genet., 1 (2), 137.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – Forensic Sci. Int. Genet., 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

**D3S1358**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей используется соответствующая “лестница”, включающая 9 аллелей: **11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20**. Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе D3S1358**

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
9	103	0	0,001
10	107	0	0,001
<b>11</b>	111	0	0,001
12	115	0,00270	0,004
<b>13</b>	119	0	0,001
<b>14</b>	123	0,11590	0,117
<b>15</b>	127	0,25337	0,254
<b>16</b>	131	0,29380	0,295
<b>17</b>	135	0,21833	0,219
<b>18</b>	139	0,11051	0,112
<b>19</b>	143	0,00539	0,007
<b>20</b>	147	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей 8 (99 п.н.) – 20 (147 п.н.), в том числе «промежуточных» и «вариантных» аллелей 8.3, 14.3, 15', 15.1, 15.2, 15.3, 16', 16.2, 17', 17.1, 17.2, 18.1, 18.2, 18.3.

Микросателлит *D3S1358* входит в число основных локусов (“core loci”) в международной базе данных Интерпола (7 аутосомных локусов), а также в национальных базах данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутосомных локусов), Евросоюза (Extended European Standard Set, ESS, 12 аутосомных локусов), Великобритании (UK Core Loci, 10 аутосомных локусов), Германии (German Core Loci, 8 аутосомных локусов).

Микросателлит *D3S1358* расположен в интроне 20 гена *LARS2*, кодирующего фермент класса 1 аминоксил-тРНК-синтаз (*leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial*). Другое название этого маркера – *UniSTS:148226*. Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,12%. Гомологичный маркер выявлен на хромосоме 3 шимпанзе.

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">NC_000003</a>	13-AUG-2013	16 повторов: (TCTA)(TCTG)(TCTA) <sub>14</sub> или (ATAG) <sub>14</sub> (ACAG)(ATAG)	131

**NC\_000003**: “Homo sapiens chromosome 3, GRCh37.p13 Primary Assembly”. Позиции 45557209-45557339.



---

**Ссылки:**

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – J. Forensic Sci., 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Butler et al. (July 18, 2000) DNA typing by mass spectrometry with polymorphic DNA repeat markers. United States Patent 6,090,558.
- Heinrich M., Felske-Zech H., Brinkmann B., Hohoff C. (2005) Characterisation of variant alleles in the STR systems D2S1338, D3S1358 and D19S433. – Int J Legal Med., 119 (5), 310-313. PMID: 15965763.
- Li H., Schmidt L., Wei M.-H., Hustad T., Lerman M.I., Zbar B., Tory K. (1993) Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359. – Hum. Mol. Genet., 2, 1327.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – Forensic Sci. Int. Genet., 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

## CSF1PO

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек + 58°C, 20 сек + 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин



Для идентификации аллелей используется соответствующая “лестница”, которая изображена на рисунке слева (фрагмент окрашенного серебром неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1).

Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером 1X TBE при напряжении 500 В в течение 3 ч 30 мин.

Дорожка 1 – ДНК 9948 (генотип 10/11), видны также слабые полосы, соответствующие аллелям 9 и 12.

Дорожка 2 – ДНК K562 (генотип 9/10).

Дорожка 3 – аллельная “лестница”, включающая 9 аллелей: **7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15** (на дорожку нанесено 6 мкл раствора). Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

Подчеркнуты аллели, визуальнее более интенсивные.

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе CSF1PO

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
6	172	0	0,001
<b>7</b>	176	0	0,001
<b>8</b>	180	0	0,001
<b>9</b>	184	0,04582	0,047
<b>10</b>	188	0,28167	0,283
<b>11</b>	192	0,29380	0,295
<b>12</b>	196	0,30593	0,307
<b>13</b>	200	0,05795	0,059
<b>14</b>	204	0,00809	0,009
<b>15</b>	208	0,00539	0,007
16	212	0,00135	0,003

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным Zhivotovsky *et al.*, 2009; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям Gjertson *et al.*, 2007.

В различных популяциях показано существование аллелей 5 (168 п.н.) – 16 (212 п.н.), в том числе “промежуточных” аллелей 6.3, 7.3, 8.3, 9.1, 9.3, 10.1, 10.2, 10.3, 11.1, 11.3, 12.1.

Микросателлит CSF1PO входит в число основных локусов (“core loci”) в национальной базе данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутосомных локусов).

Микросателлит CSF1PO расположен в интроне 6 протоонкогена *c-fms*, кодирующего белок рецептора одного из факторов роста (*колониестимулирующий фактор-1, csf-1, Colony Stimulating Factor-1 Proto-Oncogene*). Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,16%.

**Показано, что при неоптимальных условиях разделения в неденатурирующих ПАГ возможно определенное несоответствие амплифицированных аллелей локуса CSF1PO фрагментам ДНК в аллельной «лестнице» («сдвиг» полос). Это может оказаться критичным для уверенного генотипирования, поскольку интенсивность такого «сдвига» сложным образом зависит от конкретных условий проведения электрофореза. Настоятельно рекомендуется на каждом неденатурирующем ПАГ как минимум на одну дорожку наносить образец контрольной ДНК с известным генотипом по локусу CSF1PO или использовать денатурирующие ПАГ.**

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">X14720</a>	21-APR-1993	12 повторов: (AGAT) <sub>12</sub> или (ATCT) <sub>12</sub>	196
<a href="#">U63963</a>	12-APR-1997	12 повторов: (AGAT) <sub>12</sub> или (ATCT) <sub>12</sub>	196

**X14720**: “Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene”. Устарела, заменена на U63963.

**U63963**: “Human CSF-1 receptor (FMS) gene, complete cds, and (SMF) gene, partial cds”.

**Ссылки:**

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – J. Forensic Sci., 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Hammond H.A., Jin L., Zhong Y., Caskey C.T., Chakraborty R. (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification application. – Am. J. Hum. Genet., 55, 175-189.
- Orekhov V.A., Shaikhaev G.O., Aghajanyan A.V., Zakharenko M.V., Snigiryova G.P. (2009) Effect of low-dose radiation on mutation rates of STR loci commonly used in forensic casework. – 23rd International Society of Forensic Genetics World Congress, Buenos Aires, Argentina, September 14-18, 2009.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – Forensic Sci. Int. Genet., 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

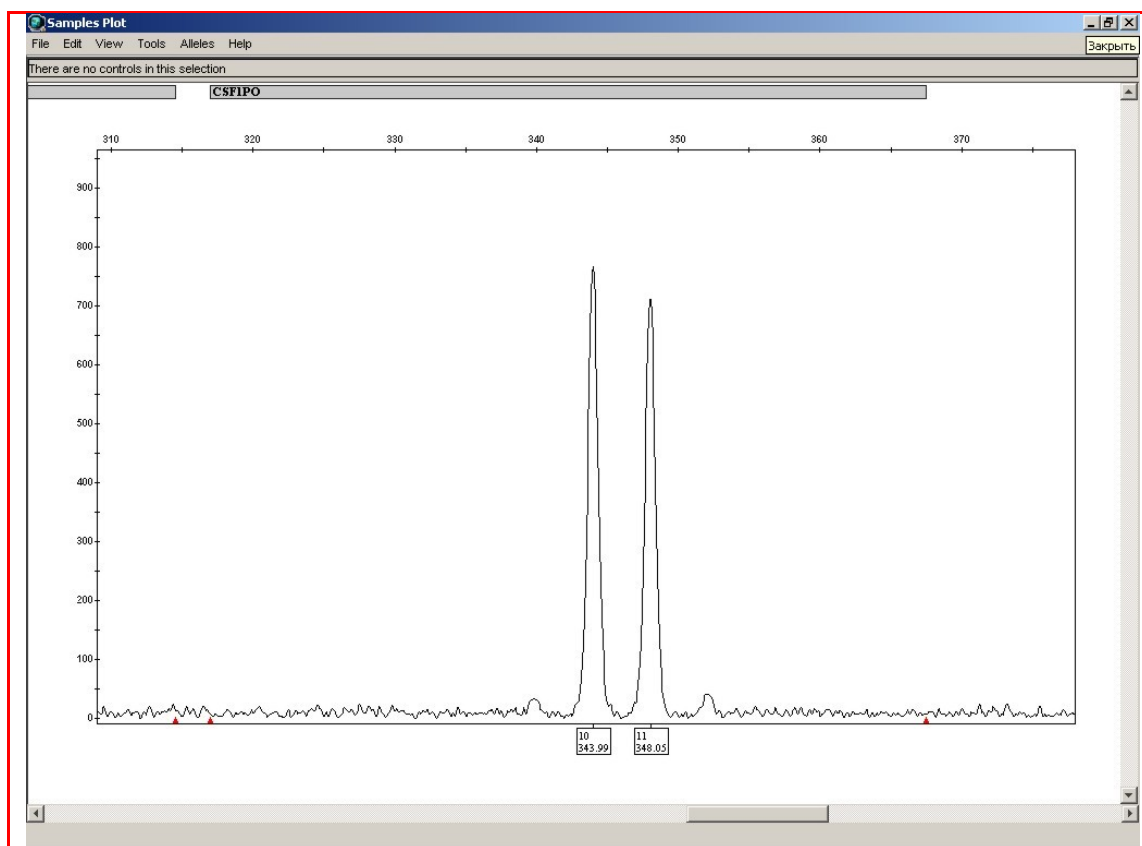


Рисунок к вопросу о генотипе референтной ДНК 9948 по локусу *CSFIPO* (см. раздел «Референтные генотипы для различных контрольных ДНК» и пояснение ниже). **Представленный рисунок однозначно свидетельствует о генотипе 10/11.** Результат получен на наборе *COrDIS-18* (ООО «Гордиз», Россия), персональное сообщение разработчика. Однако в отдельных Руководствах "Promega Corporation" (США) генотип по этому локусу (был) указан как трёх-аллельный, 10/11/12, при этом для аллеля 12 оговорено, что он существенно более слабый по интенсивности.

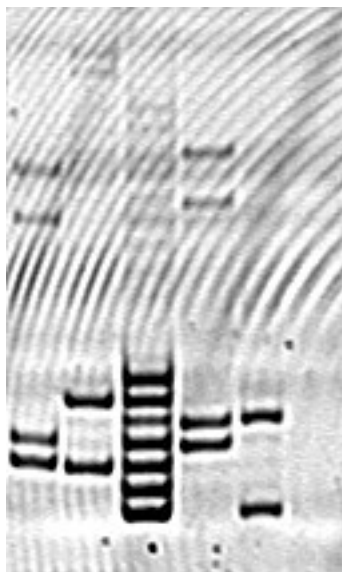
В описании к Standard Reference Material 2391b ([www.origene.com/assets/documents/Other/2391b.pdf](http://www.origene.com/assets/documents/Other/2391b.pdf)) специально отмечено, что неустойчивая детекция аллеля №12 наиболее вероятно обусловлена определенной нестабильностью этой клеточной линии (зависит от числа клеточных делений).

**D7S820**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», которая изображена на рисунке ниже (фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1).



Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером IX ТБЕ при напряжении 500 В в течение 2 ч 30 мин.

Видеозахват изображения осуществлялся в формате с концентрическими линиями во избежание возможных вопросов о «подрисовке».

**Дорожка 3** – экспериментальная аллельная «лестница» на локус *D7S820*, включающая семь аллелей: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.

**Внимание!** С 2012 г. наборы на локус *D7S820* укомплектовываются аллельной «лестницей», содержащей **восемь аллелей: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14**. Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

Дорожка 1 – положительный контроль ПЦР, ДНК 9947A (генотип 10/11).  
Дорожка 6 – отрицательный контроль ПЦР.

Дорожки 2, 4 и 5 – пример семейного анализа трёх человек. Генотипы 10/13, 11/12 и 8/12 для предполагаемого отца, ребёнка и матери, соответственно.

В исследованном спорном случае отцовство по локусу *D7S820* **исключается**: выявлены несовпадающие аллели между ребёнком (11 и 12) и предполагаемым отцом (10 и 13).

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *D7S820***

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
6	124	0	0,001
7	128	0,01213	0,013
8	132	0,17116	0,172
9	136	0,15094	0,152
10	140	0,28302	0,284
11	144	0,21159	0,213
12	148	0,14420	0,145
13	152	0,02561	0,027
14	156	0,00135	0,003
15	160	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей 5 (120 п.н.) – 16 (164 п.н.), в том числе «промежуточных» аллелей 5.2, 6.2, 6.3, 7.1, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2, 9.3, 10.1, 10.3, 11.1, 11.3, 12.1, 12.2, 12.3, 13.1, 14.1.

Микросателлит *D7S820* входит в число основных локусов (“core loci”) в национальной базе данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутомных локусов). Другое название этого маркера – UniSTS:[74895](#). Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,10%.

При интерпретации результатов по локусу *D7S820* следует учитывать, что **достаточно редко** для некоторых гетерозиготных образцов может наблюдаться дисбаланс по интенсивности продуктов ПЦР между двумя аллелями. То есть в анализируемом образце на ПАГ один из аллелей выглядит существенно «ярче» по сравнению с другим аллелем. В этом случае генотип исследуемого образца является **гетерозиготным** по двум выявляемым аллелям.

Причиной такой *предпочтительной амплификации* одного из аллелей является структура нуклеотидной последовательности в области тандемных повторов и локализации праймеров. Компенсирующие праймеры в наборах на локус *D7S820* в настоящее время не используются.

#### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">NT_007933.15</a>	10-JUN-2009	13 повторов: (TCTA) <sub>13</sub> или (GATA) <sub>13</sub>	152

**NT\_007933.15:** “Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly”. Область тандемных повторов соответствует позициям 21,822,383-21,822,434.

#### Ссылки:

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – J. Forensic Sci., 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Jin L., Underhill P.A., Buoncristiani M., Robertson J.M. (1997) Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. – J. Forensic Sci., 42 (3), 496-499. PMID: 9144938.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – Forensic Sci. Int. Genet., 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

## LPL

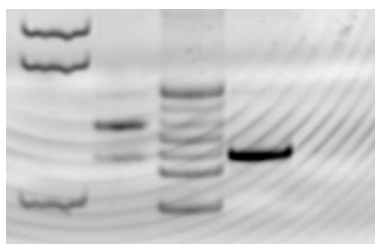
Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

**Внимание!** При недостаточном количественном выходе или неспецифической наработке продуктов ПЦР на отдельных моделях амплификаторов рекомендуется использовать следующие условия амплификации (по времени существенно дольше, но результат может быть лучше):

Первая денатурация	Первые 10 циклов	Последующие 20 циклов
96°C, 2 мин	94°C, 30 сек 60°C, 30 сек 70°C, 30 сек	90°C, 30 сек 60°C, 30 сек 70°C, 30 сек

Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», которая изображена на рисунке ниже (фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1). Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером *1X TBE* при напряжении 400 В в течение 3 ч 20 мин. Видеозахват изображения осуществлялся в формате с концентрическими линиями во избежание возможных вопросов о «подрисовке».



**Дорожка 3 – аллельная “лестница” на локус *LPL*, включающая 7 аллелей: 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14.** Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот. Подчеркнуты аллели, визуально более интенсивные.

Дорожка 1 – фрагменты ДНК нелокусного высокомолекулярного стандарта *pBlueScript DNA\**MspI** размером 157, 147 и 110 п.н.

Дорожка 2 – положительный контроль ПЦР, ДНК *K562* (генотип 10/12).

Дорожка 4 – исследуемый образец ДНК (генотип 10/10).

Дорожка 5 – отрицательный контроль ПЦР.

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *LPL*

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
<b>7</b>	105	0,0014	0,003
8	109	0	0,001
<b>9</b>	113	0,0476	0,049
<b>10</b>	117	0,4678	0,468
<b>11</b>	121	0,2297	0,231
<b>12</b>	125	0,2255	0,226
<b>13</b>	129	0,0280	0,029
<b>14</b>	133	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Корниенко и др., 2002*; популяционная выборка 442 неродственных человека.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей 7 (105 п.н.) – 16 (141 п.н.). У европеоидов не обнаружены аллели 15 и 16, а аллели 7, 8 и 14 для них являются достаточно редкими.

Микросателлит *LPL* **не входит** в число основных локусов (“core loci”) в международной базе данных Интерпола (7 аутосомных локусов), а также в национальных базах данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутосомных локусов), Евросоюза и Великобритании (National Criminal Intelligence DNA Database, NCIDD, 11 локусов), Германии (German DNA profiling group, GEDNAP, 9 локусов).

Тем не менее, этот маркер включён в состав нескольких коммерческих наборов производства "Promega Corporation" (США). Микросателлит *LPL* расположен в интроне 6 гена липопротеин-липазы (lipoprotein lipase gene). Другие названия этого маркера – *LIPOL*, *HUMLIPOL*. Средняя частота мутаций в этом локусе составляет <1,0% (данные по мутациям малочисленны).

#### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">D83550</a>	14-APR-2000	8 повторов: (TTTA) <sub>8</sub> или (AAAT) <sub>8</sub>	109

**D83550:** "Human DNA for lipoprotein lipase, intron 6".

#### Ссылки:

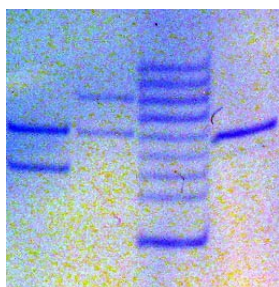
- Takagi A., Mori A., Ikeda Y., Yamamoto A. (1996) Identification of two new alleles at the lipoprotein lipase (LPL) short tandem repeat (STR) locus results in seven polymorphic alleles in the Japanese population: allele frequency data in comparison with Caucasian populations. – Mol. Cell. Probes, 10 (3), 227-228.
- Zuliani G., Hobbs H.H. (1990) Tetranucleotide repeat polymorphism in the LPL gene. – Nucleic Acids Res., 18, 4958.
- Корниенко И.В., Земскова Е.Ю., Фролова С.А., Якушев В.В., Иванов П.Л. (2002) Исследование аллельного полиморфизма молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе тетрануклеотидных тандемных повторов LPL, vWA и TH01 среди населения России. – Судебно-медицинская экспертиза, 45 (5), 12-14.

**D10S1248**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», которая изображена на рисунке ниже (фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1). Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером *LX TBE* при напряжении 600 В в течение 3 часов.



**Дорожка 3 – аллельная «лестница» на локус *D10S1248*, включающая 9 аллелей: 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.** Эти аллели также выделены цветом в таблице аллельных частот.

Дорожки 1, 2, 4 – семейный анализ (исключение отцовства).

Дорожка 1 – предполагаемый отец, генотип 12/14.

Дорожка 2 – ребёнок, генотип 14/16.

Дорожка 4 – мать ребёнка, генотип 14/14.

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *D10S1248***

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
8	82	0,000000	0,001
9	86	0,000000	0,001
10	90	0,000000	0,001
11	94	0,003418	0,004
12	98	0,022063	0,022
13	102	0,239901	0,240
14	106	0,326911	0,327
15	110	0,223120	0,223
16	114	0,146053	0,146
17	118	0,036047	0,036
18	122	0,002175	0,002
19	126	0,000311	0,001

Нумерация аллелей **уточнённая** международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zavarin et al., 2019*; популяционная выборка **1 609** неродственных человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

Первоначально (*Coble & Butler, 2005*) для этого локуса была использована неправильная нумерация аллелей, которая с подачи *Lederer & Braunschweiger, 2007* была уточнена: произошло уменьшение на один числа тандемных повторов в каждом аллеле (*Butler & Coble, 2007*).

В различных популяциях показано существование аллелей 8 (82 п.н.) – 19 (126 п.н.).

Микросателлит *D10S1248* входит в число основных локусов (“core loci”) для национальных баз данных Евросоюза (Extended European Standard Set, ESS, 12 аутосомных локусов) и Великобритании.

Другое название этого маркера – CHLC.GGAA23C05.



**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">AL391869</a>	13-DEC-2012	13 повторов: (GGAA) <sub>13</sub>	102

**AL391869:** “Human DNA sequence from clone RP11-168C9 on chromosome 10, complete sequence”, позиции повторов 136799-136850.

**Ссылки:**

- Butler J.M., Coble M.D. (2007) Authors' Response to Letter to Editor [regarding nomenclature for new miniSTR locus D10S1248]. – J. Forensic Sci., 52 (2), 494.
- Coble M.D., Butler J.M. (2005) Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. – J. Forensic Sci., 50 (1), 43-53.
- Lederer T., Braunschweiger G. (2007) Commentary on: M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. J. Forensic Sci. 50 (2005) 43–53. – J. Forensic Sci., 52 (2) 493.
- Zavarin V., Ilina V., Krassotkin Y., Makarova T., Sutiagina D., Semikhodskii A. (2019) Evaluation of sensitivity and specificity of sibship determination in the Caucasian population of the Russian Federation using the 23 STR loci VeriFiler panel. – Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 7 (1), 56-58. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.023>.

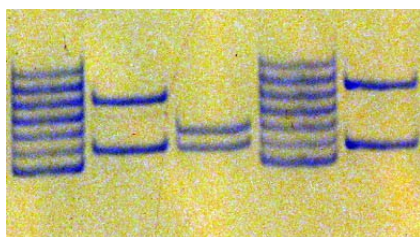
## ТН01

Условия амплификации:

Первая денатурация	30-35 циклов (*)	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

**(\*) Внимание.** При недостаточном количественном выходе продуктов реакции, в том числе для образцов положительных контролей, число циклов ПЦР следует увеличить до **35**, при этом нет необходимости увеличивать количество *Taq*-полимеразы, вносимой в реакционную смесь.

Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», которая изображена на рисунке ниже (фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1). Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером IX ТБЕ при напряжении 600 В в течение 3 часов.



**Дорожки 1 и 4 – аллельная «лестница» на locus *ТН01*, включающая 7 аллелей: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.** Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

Дорожки 2, 3, 5 – семейный анализ (исключение отцовства).  
Дорожка 2 – предполагаемый отец, генотип 6/9.  
Дорожка 3 – ребёнок, генотип 6/7.  
Дорожка 4 – мать ребёнка, генотип 6/9.3.

При интерпретации результатов особое внимание следует обратить на уверенное различие весьма редкого для европеоидов аллеля 10 (он входит в состав аллельной «лестницы») и наиболее частого для европеоидов аллеля 9.3 (он короче аллеля 10 всего на 1 п.н.).

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *ТН01*

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
4	124	0	0,001
<b>5</b>	128	0	0,001
<b>6</b>	132	0,22237	0,223
<b>7</b>	136	0,13342	0,135
<b>8</b>	140	0,09434	0,096
<b>9</b>	144	0,23046	0,231
9.3	147	0,31402	0,315
<b>10</b>	148	0,00404	0,005
10.3	151	0,00135	0,003
<b>11</b>	152	0	0,001
13.3	163	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей 3 (120 п.н.) – 14 (164 п.н.), в том числе «промежуточных» аллелей 5.3, 6.1, 6.3, 7.1, 7.3, 8.3, 9.1, 9.3, 10.3, 13.3.

Микросателлит *TH01* расположен в интроне 1 гена тирозин-гидроксилазы (*Tyrosine Hydroxylase*). Устарелое название этого маркера – *TC11*. Микросателлит *TH01* входит в число основных локусов (“core loci”) в международной базе данных Интерпола (7 аутосомных локусов), а также в национальных базах данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутосомных локусов), Евросоюза (Extended European Standard Set, ESS, 12 аутосомных локусов), Великобритании (UK Core Loci, 10 аутосомных локусов), Германии (German Core Loci, 8 аутосомных локусов).

Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,01%.

**Ссылки:**

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – *J. Forensic Sci.*, 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. – *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 746-756.
- Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S. and Merrill, C.R. (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). – *Nucleic Acids Res.*, 19, 3753.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – *Forensic Sci. Int. Genet.*, 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">D00269</a>	21-APR-2005	9 повторов: (TCAT) <sub>9</sub> или (ATGA) <sub>9</sub>	144

**D00269:** “Homo sapiens gene for tyrosine hydroxylase, partial cds”.

**vWFII**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей в ПАГ используется соответствующая аллельная «лестница». Аллели, входящие в состав аллельной «лестницы», выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

В связи с усовершенствованием наборов состав аллельной «лестницы» изменяется. Актуальная версия аллельной «лестницы» на локус *vWFII* (с 01-2010) включает **девять** аллелей: **8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16**. Шаг между отдельными аллелями в аллельной «лестнице» составляет 4 п.н.

Предыдущие версии аллельных «лестниц»:

- Семь аллелей (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), до 01-2010.

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *vWFII***

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Консервативная оценка частот аллелей для европеоидного населения России
<b>8</b>	150	0	0,01
<b>9</b>	154	0,082±0,013	0,11
<b>10</b>	158	0,088±0,013	0,12
<b>11</b>	162	0,392±0,023	0,44
<b>12</b>	166	0,296±0,021	0,34
<b>13</b>	170	0,069±0,012	0,09
<b>14</b>	174	0,058±0,011	0,08
<b>15</b>	178	0,015±0,006	0,03
<b>16</b>	182	0	0,01

Нумерация аллелей отражает число содержащихся в них tandemных повторов. В различных популяциях показано существование аллелей 8 (150 п.н.) – 16 (182 п.н.).

(\*) по данным *Ефремов и др., 1998*; популяционная выборка 226 неродственных человек. ± стандартная ошибка.

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура tandemного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">M25858</a>	14-JAN-1995	12 повторов: (TCTA) <sub>12</sub> или (TAGA) <sub>12</sub>	166

**M25858**: “Human von Willebrand factor gene, exon 39, 40, 41 and 42, and Alu repetitive element”.

**Ссылки:**

- Ploos van Amstel H.K., Reitsma P.H. (1990) Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. – *Nucleic Acids Research*, 18, 4957. PMID: [2395671](#).
- Ефремов И.А., Заяц М.В., Иванов П.Л. (1998) Экспертная оценка молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе тетрануклеотидных tandemных повторов *HUMvWFII* и *D6S366*. – Судебно-медицинская экспертиза, 41 (2), 33-36. PMID: [9608260](#).
- Иванов П.Л., Земскова Е.Ю., Туракулов Р.И., Ефремов И.А. (2005) Изучение потенциально сцепленных вариантов полиморфизма хромосомной ДНК в аспекте судебно-экспертного применения молекулярно-генетических индивидуализирующих систем *CD4*, *vWA* и *VWFII*. – Судебно-медицинская экспертиза, 48 (2), 29-34. PMID: [15881140](#).
- Чистяков Д.А., Ефремов И.А., Одиноква О.Н., Носиков В.В. (1996) Анализ аллельного полиморфизма двух тетрануклеотидных tandemных повторов в двух городских популяциях России. – Молекулярная биология, 30 (6), 1274-1283. PMID: [9026718](#).

## РАН

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек + 58°C, 20 сек + 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей используется соответствующая «лестница», включающая восемь аллелей: **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8**. Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *РАН*

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
<1	<228	0	0,003
<b>1</b>	228	0,013±0,006	0,016
<b>2</b>	232	0,040±0,010	0,043
<b>3</b>	236	0,110±0,016	0,112
<b>4</b>	240	0,257±0,023	0,259
<b>5</b>	244	0,350±0,025	0,352
<b>6</b>	248	0,184±0,020	0,186
<b>7</b>	252	0,037±0,010	0,040
<b>8</b>	256	0,008±0,005	0,011
9	260	0	0,003

Нумерация аллелей **не отражает** число содержащихся в них тандемных повторов и приводится согласно номенклатуре, использованной в работе *Одинокова и др., 1999*.

В литературных источниках выявлены разночтения при обозначении аллелей локуса *РАН*. Это может являться препятствием для сравнения результатов, выполненных в разных лабораториях и с использованием различных наборов. *При оформлении экспертных заключений настоятельно рекомендуется приводить ссылку на литературные источники, описывающие используемый порядок нумерации аллелей!*

(\*) по данным *Одиноковой и др., 1999*; популяционная выборка 187 неродственных человек. ± стандартная ошибка.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

В различных популяциях показано существование аллелей «-2» (216 п.н.), «-1» (220 п.н.), 0 (224 п.н.) – 9 (260 п.н.).

#### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">L10105</a>	12-JUN-1993		234

**L10105**: “Human phenylalanine hydroxylase (РАН) gene”.

#### Ссылки:

- Goltsov A.A., Eisensmith R.C., Naughton E.R., Jin L., Chakraborty R., Woo S.L.C. (1993) A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria. – *Hum. Mol. Genet.*, 2, 577-581.
- Одинокова О.Н., Демуров Л.М., Карташова О.Г., Ефремов И.А., Кутмин А.И., Пузырев В.П. (1999) Характеристика информативности STR-полиморфизма гена РАН для использования в идентификационных тест-системах. – *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 127 (Приложение 1), 88–91.

**D13S317**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей в ПАГ используется соответствующая аллельная «лестница». Аллели, входящие в состав аллельной «лестницы», выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

В связи с усовершенствованием наборов состав аллельной «лестницы» изменяется.

Актуальная версия аллельной «лестницы» на локус *D13S317* (с 10-2020) включает **восемь аллелей: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15.**

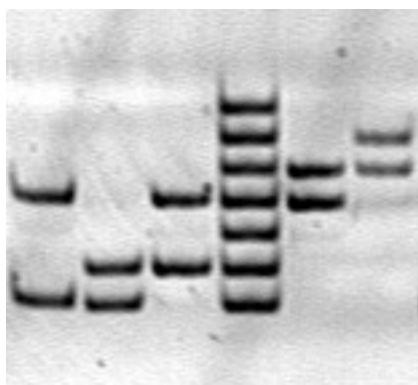
Шаг между отдельными аллелями в аллельной «лестнице» составляет 4 п.н.

Предыдущие версии аллельных «лестниц»:

- Семь аллелей (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14), до 10-2020.

Фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1.

Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером *IX TBE* при напряжении 500 В в течение 2 ч 30 мин.



**Дорожка 4 – аллельная «лестница» на локус *D13S317*, включающая семь аллелей: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.**

Дорожки 1-3: пример семейного анализа трёх человек. Генотипы 8/11, 8/9 и 9/11 для предполагаемого отца, ребёнка и матери, соответственно.

Дорожки 5 и 6: пример семейного анализа двух человек. Генотипы 11/12 и 12/13 для предполагаемого отца и ребёнка, соответственно.

В обоих исследованных случаях отцовство по локусу *D13S317* **не исключается** (выявлены совпадающие аллели между ребёнком и предполагаемым отцом).

При интерпретации результатов следует учитывать, что **достаточно редко** для некоторых гетерозиготных образцов может наблюдаться дисбаланс по интенсивности продуктов ПЦР между двумя аллелями. То есть в анализируемом образце на ПАГ один из аллелей выглядит существенно «ярче» по сравнению с другим аллелем. В этом случае генотип исследуемого образца является **гетерозиготным** по этим двум выявляемым аллелям.

Причиной такой *предпочтительной амплификации* одного из аллелей является структура нуклеотидной последовательности в области тандемных повторов и локализации используемых праймеров.

Компенсирющие праймеры в наборах *ТАПОТИЛИ* на локус *D13S317* в настоящее время не используются.

В области тандемных повторов локализован точечный полиморфизм [rs9546005](#) (A/T), что отражается на структуре последнего повтора.

В различных популяциях показано существование не менее 20 аллелей: 5 (88 п.н.) – 17 (136 п.н.), в том числе «промежуточных» и «вариантных» аллелей 7.1, 8.1, 10<sup>2</sup>, 11.1, 11.3, 13.3, 14.3 (*STRBase*).

Микросателлит *D13S317* входит в число основных локусов (“core loci”) в национальной базе данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 13 аутосомных локусов).

Другое название этого маркера – UniSTS:7734. Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,14% (*STRBase*).

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *D13S317*

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
5	88	0	0,001
6	92	0	0,001
7	96	0	0,001
8	100	0,15499	0,156
9	104	0,08760	0,089
10	108	0,05795	0,059
11	112	0,35175	0,353
12	116	0,20081	0,202
13	120	0,10108	0,102
14	124	0,04313	0,044
15	128	0,00270	0,004
16	132	0	0,001

Нумерация аллелей международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 371 неродственный человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">G09017</a>	05-FEB-1997	13 повторов: (TATC) <sub>13</sub> или (GATA) <sub>13</sub>	120
<a href="#">NT_024524.14</a>	28-OCT-2010	12 повторов: (TATC) <sub>11</sub> (AATC) или (GATT) (GATA) <sub>11</sub>	116

**G09017:** “human STS CHLC.GATA7G10.P6420 clone GATA7G10, sequence tagged site”.

**NT\_024524:** “Homo sapiens chromosome 13 genomic contig, GRCh37.p2 reference primary assembly”. Область тандемных повторов соответствует позициям 63,702,160 – 63,702,234.

### Ссылки:

- Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – *J. Forensic Sci.*, 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- Jin L., Underhill P.A., Buoncristiani M., Robertson J.M. (1997) Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. – *J. Forensic Sci.*, 42 (3), 496-499. PMID: 9144938.
- Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – *Forensic Sci. Int. Genet.*, 3 (4), e111-116, PMID: 19647694.

**D19S433**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей в ПАГ используется соответствующая аллельная «лестница». Аллели, входящие в состав аллельной «лестницы», выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

В связи с усовершенствованием наборов состав аллельной «лестницы» изменяется.

Актуальная версия аллельной «лестницы» на locus *D19S433* (с 11-2020) включает **11 аллелей: 10, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 18.2.**

Шаг между отдельными аллелями в аллельной «лестнице» составляет **2 п.н.**

Предыдущие версии аллельных «лестниц»:

- нет.

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *D19S433***

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
<b>10</b>	126	0	0,003
11	130	0,00272	0,005
<b>12</b>	134	0,07609	0,079
12.2	136	0,00272	0,005
<b>13</b>	138	<b>0,21196</b>	<b>0,214</b>
<b>13.2</b>	140	0,01087	0,014
<b>14</b>	142	<b>0,37500</b>	<b>0,377</b>
<b>14.2</b>	144	0,03804	0,041
<b>15</b>	146	<b>0,15489</b>	<b>0,157</b>
<b>15.2</b>	148	0,04076	0,043
<b>16</b>	150	0,04348	0,046
<b>16.2</b>	152	0,02174	0,024
17	154	0,00543	0,008
17.2	156	0,00815	0,011
18	158	0	0,003
<b>18.2</b>	160	0,00815	0,011
19	162	0	0,003

Нумерация аллелей устоявшаяся международная, используемая в коммерческих наборах различных производителей. Однако эта нумерация **не соответствует** структуре тандемных повторов (пояснения в тексте).

(\*) по данным *Zhivotovsky et al., 2009*; популяционная выборка 184 неродственных человека.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям *Gjertson et al., 2007*.

Полиморфный микросателлит *D19S433* впервые был описан в 1997 г. (*Murray et al., submission 05-FEB-1997, GenBank: G08036*). Он расположен в первом интроне гена *URI1* (*URI1 prefoldin like chaperone*, Gene ID: [8725](#)).

Тандемные повторы: 4 нуклеотида, комплексные: 5'-[AAGG](AAAG)[AAGG](TAGG)[AAGG]<sub>n</sub>.

Используемая в настоящее время международная номенклатура аллелей учитывает только число тандемных повторов мотива [AAGG], тогда как внутри этой области локализованы два дополнительных тетрануклеотидных мотива: (AAAG) и (TAGG), то есть формально число тандемных звеньев из четырёх нуклеотидов на два **больше**.



В различных популяциях показано существование не менее **30** аллелей: 5.2 (108 п.н.) – 20 (166 п.н.), в том числе относительно редких «промежуточных» аллелей 6.2, 11.1, 12.1, 12.2, 13.1, 13.2, 13.3, 14.1, 14.2, 14.3, 15.2, 16.2, 17.2, 18.2, 19.2 (Czarnogórska et al., 2009; STRBase). «Промежуточные» аллели **x.2** характеризуются наличием делеции двух оснований (AG) перед блоком повторов (AAGG)<sub>n</sub> (Butler & Hill, 2012; Heinrich et al., 2005). Точно аллели локуса *D19S433* могут быть определены только методом прямого секвенирования (Dell'Ariccica-Carmon et al., 2014).

Для популяции РФ наиболее частыми являются только три аллеля (13, 14 и 15), с суммарной частотой более 70% (Zivotovsky et al., 2009). **При интерпретации результатов особое внимание следует обратить на уверенное различие весьма редких для русской популяции «промежуточных» аллелей 12.2, 13.2, 14.2, 15.2 от частых 13, 14 и 15.**

В настоящее время микросателлит *D19S433* входит в число основных локусов (“core loci”) в национальных базах данных США (Expanded U.S. Core Loci, required after January 1, 2017, 20 аутосомных локусов) и Великобритании (UK Core Loci, 10 аутосомных локусов), а также является «дополнительным» локусом для национальных баз данных Евросоюза (Extended European Standard Set, ESS – 12 основных и 5 дополнительных локусов).

Другие названия этого маркера – *UniSTS:33588*, *CHLC.GGAA2A03*, *rs35040318*.

Средняя частота мутаций в этом локусе составляет 0,11% (STRBase).

В ряде работ было показано, что точечные мутации в области посадки праймеров, а также артефакты фрагментного анализа являются причинами относительно редкой дискордантности результатов по этому локусу при использовании разных наборов разных производителей, то есть наблюдались эффекты «выпадения» и «сдвига» аллелей (Dauber et al., 2008; Dell'Ariccica-Carmon et al., 2014; Mizuno et al., 2008). Компенсирующие праймеры в наборах ТАПОТИЛИ на локус *D19S433* в настоящее время не используются.

#### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней или нижней цепям	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">AC008507</a>	22-MAR-2003	14 повторов: (AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) <sub>12</sub>	142
<a href="#">G08036</a>	05-FEB-1997	13 повторов: (AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) <sub>11</sub>	138

**AC008507**: “Homo sapiens chromosome 19 clone CTC-448F2, complete sequence”. Позиции 23 100-23 300.

**G08036**: “human STS CHLC.GGAA2A03.P6169 clone GGAA2A03, sequence tagged site”.

#### Ссылки:

- Butler J.M., Hill C.R. (2012) Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. – Forensic Science Review, 24 (1), 15–26. PMID: [26231356](#).
- Czarnogórska M, Sanak M, Piniewska D, Kochmańska N, Stawowiak A, Opolska-Bogusz B. (2009) Rzadki wariant alleliczny D19S433\*7 w badaniu spornego ojcostwa z mutacją [A rare D19S433\*7 variant in the paternity case with mutation]. – Arch Med Sadowej Kryminol., 59 (4), 320-325. Polish. PMID: [20860305](#).
- Dauber E.M., Glock B., Mayr W.R. (2008) Two examples of null alleles at the D19S433 locus due to the same 4bp deletion in the presumptive primer binding site of the AmpFISTR Identifier kit. – Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 1 (1), 107-108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.079>.
- Dell'Ariccica-Carmon A, Raziell A, Oz C, Berdugo R, Zamir A. (2014) Long allele designations at D2S1338 and D19S433 loci as influenced by various multiplex STR kits. – J Forensic Sci., 59 (3), 718-722. PMID: [24261684](#).
- Heinrich M., Felske-Zech H., Brinkmann B., Hohoff C. (2005) Characterisation of variant alleles in the STR systems D2S1338, D3S1358 and D19S433. – Int J Legal Med., 119 (5), 310-313. PMID: [15965763](#).
- Mizuno N, Kitayama T, Fujii K, Nakahara H, Yoshida K, Sekiguchi K, Yonezawa N, Nakano M, Kasai K. (2008) A D19S433 primer binding site mutation and the frequency in Japanese of the silent allele it causes. – J Forensic Sci., 53 (5), 1068-1073. PMID: [18636979](#).
- Zivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – Forensic Sci. Int. Genet., 3 (4), e111-116, PMID: [19647694](#).

**D22S1045**

Условия амплификации:

Первая денатурация	30 циклов	Последний синтез цепи
96°C, 2 мин	94°C, 20 сек 58°C, 20 сек 72°C, 20 сек	72°C, 5 мин

Для идентификации аллелей в ПАГ используется соответствующая аллельная «лестница». Аллели, входящие в состав аллельной «лестницы», выделены **цветом** в таблице аллельных частот.

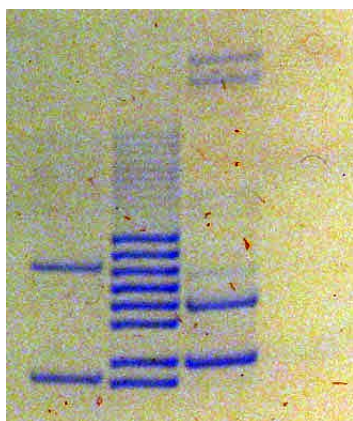
В связи с усовершенствованием наборов состав аллельной «лестницы» изменяется.

Актуальная версия аллельной «лестницы» на локус *D22S1045* (с 01-2012) включает **восемь аллелей: 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19.**

Шаг между отдельными аллелями в аллельной «лестнице» составляет **3 п.н.**

Предыдущие версии аллельных «лестниц»:

- Семь аллелей (11, 12, 14, 15, 16, 17, 19), до 01-2012.



Фрагмент окрашенного бромистым этидием неденатурирующего ПАГ – 10%, 19:1.

Электрофорез проводился в вертикальной камере размером 20x20 см (VE-20, «Хеликон», Россия) с буфером *IX TBE* при напряжении 500В в течение 2 ч 30 мин. Результаты документировали с использованием аппаратно-программного комплекса *ViTran-Photo* («Компания Биоком», Россия).

Дорожка 1 – положительный контроль (10 нг матрицы ДНК на 25 мкл реакционной смеси, 30 циклов ПЦР, наносили 7 мкл продукта реакции на дорожку в геле), генотип 11/17.

**Дорожка 2 – аллельная «лестница» на локус *D22S1045*, включающая 8 аллелей: 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19.** Наносили 6 мкл на дорожку в геле.

Дорожка 3 – исследуемый образец (индивидуальное генотипирование). Вносили 60 нг матрицы ДНК в 25 мкл реакционной смеси, проводили 30 циклов ПЦР, наносили 7 мкл продукта реакции на дорожку в геле. Генотип 12/15.

Дорожка 4 – отрицательный контроль ПЦР (наносили 10 мкл продукта реакции на дорожку в геле).

Первоначально (*Coble & Butler, 2005*) для этого локуса была использована неправильная нумерация аллелей, которая с подачи *Lederer & Braunschweiger, 2007* была уточнена: **произошло увеличение на три числа тандемных повторов в каждом аллеле** (*Butler & Coble, 2007*).

Микросателлит *D22S1045* входит в число основных локусов (“core loci”) в национальных базах данных США (Expanded U.S. Core Loci, required after January 1, 2017, 20 аутосомных локусов), Евросоюза (Extended European Standard Set, ESS, 12 аутосомных локусов).

В различных популяциях показано существование не менее 13 аллелей: 8 (79 п.н.) – 20 (115 п.н.), по данным *STRBase*.

Другое название этого маркера – CHLC.ATA37D06.

**Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе D22S1045**

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Частоты аллелей в выборке из русской популяции (*)	Частоты аллелей, которые рекомендуется использовать для вероятностных расчётов по русской популяции (**)
8	79	0	0,001
9	82	0	0,001
10	85	0,000622	0,001
11	88	0,163766	0,164
12	91	0,029521	0,030
13	94	0,002797	0,003
14	97	0,045991	0,046
15	100	0,329086	0,329
16	103	0,336234	0,336
17	106	0,079553	0,080
18	109	0,010255	0,011
19	112	0,002175	0,002
20	115	0	0,001

Нумерация аллелей **уточнённая** международная и отражает число содержащихся в них тандемных повторов (Butler & Coble, 2007).

(\*) по данным Zavarin et al., 2019; популяционная выборка **1 609** неродственных человек.

(\*\*) «консервативная» оценка частот аллелей проведена для исследованной выборки (предыдущий столбец таблицы) согласно рекомендациям Gjertson et al., 2007.

**Референтные нуклеотидные последовательности**

Доступ к GenBank	Дата публикации	Структура тандемного блока по верхней цепи	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">AL022314</a>	24-JAN-2013	17 повторов: (ATT) <sub>14</sub> (ACT)(ATT) <sub>2</sub>	106

**AL022314**: “Human DNA sequence from clone RP5-1170K4 on chromosome 22q12.2-13.1, complete sequence.”  
Позиции 92943 – 93047.

**Ссылки:**

- Butler J.M., Coble M.D. (2007) Authors' Response to Letter to Editor [regarding nomenclature for new miniSTR locus D10S1248]. – J. Forensic Sci., 52 (2), 494.
- Coble M.D., Butler J.M. (2005) Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. – J. Forensic Sci., 50 (1), 43-53.
- Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM. (2006) The evolution of DNA databases--recommendations for new European STR loci. – Forensic Sci Int., 156 (2-3), 242-244. Epub 2005 Jul 5. PubMed PMID: 16002250.
- Lederer T., Braunschweiger G. (2007) Commentary on: M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. J. Forensic Sci. 50 (2005) 43–53. – J. Forensic Sci., 52 (2) 493.
- STRBase: [https://strbase.nist.gov/str\\_D22S1045.htm](https://strbase.nist.gov/str_D22S1045.htm)
- Tucker VC, Hopwood AJ, Sprecher CJ, McLaren RS, Rabbach DR, Ensenberger MG, Thompson JM, Storts DR. (2011) Developmental validation of the PowerPlex(®) ESI 16 and PowerPlex(®) ESI 17 Systems: STR multiplexes for the new European standard. – Forensic Sci Int Genet., 5 (5), 436-448. PMID: 21071297.
- Zavarin V., Ilina V., Krassotkin Y., Makarova T., Sutiagina D., Semikhodskii A. (2019) Evaluation of sensitivity and specificity of sibship determination in the Caucasian population of the Russian Federation using the 23 STR loci VeriFiler panel. – Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 7 (1), 56-58. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.09.023>.
- [http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub\\_pres/Promega2006\\_Hill.pdf](http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/Promega2006_Hill.pdf)

## Список литературы

- 1) Гаврилей Ю.К., Корниенко И.В., Щербаков В.В., Иванов П.Л. (2002) Применение компьютерных программных средств при решении задач непрямой молекулярно-генетической идентификации неопознанных тел. – Судебно-медицинская экспертиза, 45 (2), 11-16. PMID: 12063791.
- 2) Гурьев С.О., Федченко В.Ф., Жданов Р.И. (1999) Новый способ ПЦР-амплификации для двух минисателлитных локусов человека и надежный метод выделения ДНК. – Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 127 (3), 357-360. PMID: 10225122.
- 3) Гыскэ Л.И., Иванов П.Л. (1995) Молекулярно-генетический подход в судебно-медицинской экспертизе биологического родства на ранних стадиях эмбрионального развития. – Судебно-медицинская экспертиза, 38 (3), 36-40.
- 4) Ефремов И.А., Кожемяко В.Б. (2011) Молекулярно-генетические экспертизы спорного родства по полиморфным маркерам хромосомы X человека: особенности интерпретации результатов и расчетов индекса отцовства. – Сибирский медицинский журнал, 106 (7), 49-55.
- 5) Ефремов И.А., Носиков В.В., Скоблилов Е.Ю., Законова А.Ф., Иванов П.Л. (2001) О возможных затруднениях молекулярно-генетической экспертизы при недостаточно высокой индивидуализирующей значимости результатов (на примере сложного случая оспариваемого материнства). – Судебно-медицинская экспертиза, 44 (1), 11-17.
- 6) Ефремов И.А., Серегин Ю.А. (2002) Расчеты индекса и вероятности отцовства в судебно-медицинских экспертизах случаев спорного родства. – Одеський Медичний Журнал, 4 (72), 11-16.
- 7) Ефремов И.А., Серегин Ю.А. (2009) Программа для расчета индекса и вероятности отцовства (материнства) при исследованиях ДНК - Pindex: Paternity Index. [программа] // Программы для ЭВМ / RU ОБПБТ №2(67) 20.06.2009, Свидетельство №2009610058.
- 8) Животовский Л.А. (2001) Критические замечания на «Методические указания» П.Л. Иванова «Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства» // «Судебно-медицинская экспертиза». – изд. «Медицина», 1999. – №5. – С. 35-41. – Сибирский медицинский журнал, 2, 85-86.
- 9) Иванов П.Л. (1999) Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства. Методические Указания (утверждены Минздравом России 19.01.99). – Судебно-медицинская экспертиза, 42 (4), 35-41.
- 10) Иванов П.Л., Гуртовая С.В., Плаксин В.О., Вербовая Л.В., Рысков А.П. (1989) «Геномная дактилоскопия» с использованием в качестве зонда бактериофага M13 (экспертиза вещественных доказательств и идентификация личности) – Судебно-медицинская экспертиза, 32 (4), 39-42.
- 11) Иванов П.Л., Земскова Е.Ю., Туракулов Р.И., Ефремов И.А. (2005) Изучение потенциально сцепленных вариантов полиморфизма хромосомной ДНК в аспекте судебно-экспертного применения молекулярно-генетических индивидуализирующих систем CD4, vWA и VWFP. – Судебно-медицинская экспертиза, 48 (2), 29-34. PMID: 15881140.
- 12) Колкутин В.В., Зосимов С.М., Пустовалов Л.В., Харламов С.Г., Алексеев С.А. (2001) Судебные экспертизы. – Москва, «Юрлитинформ», 2001.
- 13) Корниенко И.В., Афанасьева Г.В., Щербакова Е.В., Иванов П.Л. (2002) Распределение аллелей локусов HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC среди населения России. – Судебно-медицинская экспертиза, 45 (3), 20-23. PMID: 12165956.
- 14) Корниенко И.В., Водолажский Д.И., Вейко В.П., Щербаков В.В., Иванов П.Л. (2001) Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. – Ростов-на-Дону, «Ростиздат», 256 стр.
- 15) Корниенко И.В., Харламов С.Г. (2012) Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК, ее качественная и количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения. – Ростов-на-Дону, издательство Южного федерального университета, 216 стр.
- 16) Малярчук Б.А., Woźniak M., Czarny J., Деренко М.В., Grzybowski T., Miścicka-Śliwka D. (2007) Вариабельность 15 аутосомных микросателлитных локусов ДНК в русской популяции. – Молекулярная биология, 41 (1), 3-7.
- 17) Маниатис Е. (1984) Молекулярное клонирование. – Москва, «Мир».
- 18) Молекулярная клиническая диагностика. Методы. (Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги) – Москва, «Мир», 1999.
- 19) Морлинг Н., Аллен Р.В., Каррачедо А., Жеада Е., Гуде Ф., Нелленберг Ш., Мартин В., Майр В.Р., Олайсен Б., Паскали В., Шнайдер П.М. (2003) Международные рекомендации по стандартам проверки отцовства. – Проблемы стандартизации в здравоохранении, 7, 8-20.

- 20) Новоселов В.П., Шаронова Д.А. (1999) Методы геномной "дактилоскопии" в экспертизе идентификации личности и кровного родства. – Новосибирск, «Наука», Сибирское предприятие РАН.
- 21) Овчинников И.В., Савельев Ю.И., Калашников А.В., Челнокова М.В., Носиков В.В., Дебабов В.Г. (1993) Типирование полиморфизма гена HLA-DQ альфа методом ферментативной амплификации для исследования вещественных доказательств биологического происхождения. – Судебно-медицинская экспертиза, 36 (2), 32-35.
- 22) Перепечина И.О. (2003) Проблема категорического экспертного вывода в судебной ДНК-идентификации и разработка подходов к ее решению. – «Черные дыры» в Российском Законодательстве, №2.
- 23) Перепечина И.О., Гришечкин С.А. (1996) Вероятностные расчеты в ДНК-дактилоскопии: Методические рекомендации. – Москва, ЭКЦ МВД России.
- 24) Перепечина И.О., Гришечкин С.А. (1997) Экспертная оценка и математическая обработка результатов исследования объектов, содержащих ДНК двух и более лиц: Методические рекомендации. – Москва, ЭКЦ МВД России.
- 25) Пименов М.Г., Кондрашов С.А., Стороженко И.В., Культин А.Ю., Бакун К.В. (2004) Исследование частот встречаемости аллелей STR-локусов среди жителей России: информационное письмо. – Москва, ЭКЦ МВД России, 2004.
- 26) Пименов М.Г., Кондрашов С.А., Платоненкова Л.С. и др. (2006) Экспертные методики исследования тканей и выделений человека: Учебное пособие. – Москва, ЭКЦ МВД России.
- 27) Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. (2001) Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. – Москва, ГУ ЭКЦ МВД России.
- 28) Пушкарев В.П., Рахманина Л.В., Новиков П.И., Иванов П.Л. (2004) Исследование с помощью капиллярного электрофореза аллельного разнообразия микросателлитных локусов D16S539, F13B, FESFPS, TH01 и TPOX у европеоидов Уральского региона России. – Судебно-медицинская экспертиза, 47 (1), 23-28. PMID: 15008093.
- 29) Туманов А.К. (1975) Основы судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. – Москва, «Медицина».
- 30) Федченко В.И., Гурьев С.О., Калошин А.А. (2004) Эффективный метод очистки ДНК из загрязненных объектов и оптимизация амплификации. – Биомедицинская химия, 50 (2), 211-216. PMID: 15179830.
- 31) Alford, R. L., Hammond, H. A., Coto, I., and Caskey, C. T. (1994) Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. – Am J Hum Genet., 55, 190-195.
- 32) Allor C., Einum D.D., Scarpetta M. (2005) Identification and characterization of variant alleles at CODIS STR loci. – J. Forensic Sci., 50 (5), 1128-1133. PMID: 16225220.
- 33) American Association of Blood Banks (AABB) (1994) Standards for parentage testing. – 2d ed., American Association of Blood Banks, Bethesda.
- 34) Armour J.A., Povey S., Jeremiah S., Jeffreys A.J. (1990) Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries. – Genomics, 8 (3), 501-512, PMID: 2149560.
- 35) Augustin C., Grobevollmer E., Puschel K. (1998) Identification of human remains: Short tandem repeat analysis versus mitochondrial DNA. – Advances in Forensic Genetics, 7, 83-85.
- 36) Ayres K.L., Chaseling J., Balding D.J. (2002) Implications for DNA identification arising from an analysis of Australian forensic databases. – Forensic Sci Int., 129 (2), 90-98, PMID: 12243876.
- 37) Bar W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W., Olaisen B. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. – Int J Legal Med., 110, 175-176.
- 38) Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. – Anal Biochem., 196 (1), 80-83.
- 39) Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. – J Clin Microbiol., 28 (3), 495-503.
- 40) Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J., Rolf B. (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and the length of the tandem repeat. – Am J Hum Genet., 62, 1408-1415.
- 41) Brinkmann B., Meyer E. (1997) Discrimination between populations using STRs. – Proceedings from the First European Symposium on Human Identification (1996), 45-53.
- 42) Brinkmann B., Rand S., Bajanowski T. (1992) Forensic identification of urine samples. – Int J Legal Med., 105 (1), 59-61. PMID: 1354482.
- 43) Brody J.R., Kern S.E. (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. – Biotechniques, 36 (2), 214-6. Erratum in: Biotechniques, 2005 38 (1), 60.
- 44) Buckleton J., Triggs C.M., Curran J.M. (2001) Detection of deviations from genetic equilibrium – a commentary on Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, US Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. – J Forensic Sci, 1999, 44, 1277-1286. – J Forensic Sci, 46 (1), 198-202.

- 45) Budowle B., Allen R.C. (1998) Analysis of amplified fragment-length polymorphisms (VNTR/STR loci) for human identity testing. – *Methods Mol Biol.*, 98, 155-171.
- 46) Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. – *Am J Hum Genet.*, 48 (1), 137-144. PMID: 1670750.
- 47) Budowle B., Ge J., Chakraborty R., Eisenberg A.J., Green R., Mulero J., Lagace R., Hennessy L. (2011) Population genetic analyses of the NGM STR loci. – *Int J Legal Med.*, 125 (1), 101-109. PMID: 20878415.
- 48) Budowle B., Lindsey J.A., DeCou J.A., Koons B.W., Giusti A.M., Comey C.T. (1995) Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGH, D7S8, and Gc (PM loci), and HLA-DQ alpha using a multiplex amplification and typing procedure. – *J Forensic Sci.*, 40 (1), 45-54. PMID: 7876801.
- 49) Budowle B., Moretti T.R., Baumstark A.L., Defenbaugh D.A., Keys K.M. (1999) Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. – *J Forensic Sci.*, 44 (6), 1277-1286.
- 50) Budowle B., Moretti T.R., Keys K.M., Koons B.W., Smerick J.B. (1997) Validation studies of the CTT STR multiplex system. – *J Forensic Sci.*, 42 (4), 701-707.
- 51) Budowle B., Smerick J.B., Keys K.M., Moretti T.R. (1997) United States population data on the multiplex short tandem repeat loci--HUMTH01, TPOX, and CSF1PO--and the variable number tandem repeat locus D1S80. – *J Forensic Sci.*, 42 (5), 846-849.
- 52) Budowle B., Smith J., Moretti T., DiZinno J. – *DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. A BioTechniques® Books Publication. Eaton publishing, 2000.
- 53) Butler J.M. (2006) Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. – *J. Forensic Sci.*, 51 (2), 253-265.
- 54) Butler J.M. (2012) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. – Elsevier / Academic Press: San Diego, CA.
- 55) Butler JM, Devaney JM, Marino MA, Vallone PM. (2001) Quality control of PCR primers used in multiplex STR amplification reactions. – *Forensic Sci Int.*, 119 (1), 87-96. PMID: 11348798.
- 56) Butler J.M., Hill C.R. (2012) Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. – *Forensic Science Review*, 24 (1), 15–26. PMID: 26231356.
- 57) Butler J.M. et al. (2000) DNA typing by mass spectrometry with polymorphic DNA repeat markers. – *United States Patent* 6,090,558.
- 58) Butler J.M., Shen Y., McCord B.R. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. – *J Forensic Sci.*, 48 (5), 1054–1064. PMID: 14535668.
- 59) Chakraborty R., Stivers D.N. (1996) Paternity exclusion by DNA markers: effects of paternal mutations. – *J. Forensic Sci.*, 41(4), 671-677.
- 60) Coble M.D., Butler J.M. (2005) Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. – *J Forensic Sci.*, 50 (1), 43-53.
- 61) Cossutta F., Perossa R., Frassanito F., Altamura B.M., Fattorini P. (2000) Population genetics of fourteen STR loci in North-East Italy. – *Progress in Forensic Genetics*, 8, 178-180.
- 62) Decorte R., Cuppens R., Marynen P., Cassiman J.J. (1990) Rapid detection of hypervariable regions by the polymerase chain reaction. – *DNA Cell Biol.*, 9 (6), 461-469. PMID: 2206402.
- 63) Deforce D.L., Millecamps R.E., van Hoofstat D.E., van de Eeckhout G. (1998) Comparison of slab gel electrophoresis and capillary electrophoresis for the detection of the fluorescently labeled polymerase chain reaction products of short tandem repeat fragments. – *J Chromatogr A.*, 806 (1), 149-155.
- 64) Deka R., Chakraborty R., Ferrell R. (1991) A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. – *Genomics*, 11 (1), 83-92. PMID: 1765387.
- 65) DNA Commission of the International Society of Forensic Haemogenetics (1994) DNA recommendations – 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. – *Int J Legal Med.*, 107, 159–160.
- 66) Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. – *Am J Hum Genet.*, 49, 746-756.
- 67) Edwards A., Hammond H.A., Lin J., Caskey C.T., Chakraborty R. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. – *Genomics*, 12, 241-253.
- 68) Frégeau C.J., Aubin R.A., Elliott J.C., Gill S.S., Fournery R.M. (1995) Characterization of human lymphoid cell lines GM9947 and GM9948 as intra- and interlaboratory reference standards for DNA typing. – *Genomics*, 28 (2), 184-197. PMID: 8530025.
- 69) *Forensic DNA evidence interpretation*. – CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., 2005. Edited by John Buckleton, Christopher M. Triggs, Simon J. Walsh.
- 70) *GenePrint™ STR Systems (Silver Stain Detection)*. Technical manual. – Promega Corporation (USA), revised 7/99, 04/01, 7/06.

- 
- 71) Gerstenberger J., Hummel S., Schultes T., Hack B., Herrmann B. (1999) Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. – *Eur J Hum Genet.*, 7 (4), 469-477. PMID: 10352937.
  - 72) Gill P., Brinkmann B., d'Aloja E., Andersen J., Bar W., Carracedo A., Dupuy B., Eriksen B., Jangblad M., Johnsson V., Kloosterman A.D., Lincoln P., Morling N., Rand S., Sabatier M., Scheithauer R., Schneider P., Vide M.C. (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. – *Forensic Sci Int.*, 87, 185-192.
  - 73) Gjertson D.W., Brenner C.H., Baur M.P., Carracedo A., Guidet F., Luque J.A., Lessig R., Mayr W.R., Pascali V.L., Prinz M., Schneider P.M., Morling N. (2007) ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. – *Forensic Sci Int Genet.*, 1 (3-4), 223-231. PMID: 19083766.
  - 74) Gribble S.M., Roberts I., Grace C., Andrews K.M., Green A.R., Nacheva E.P. (2000) Cytogenetics of the chronic myeloid leukemia-derived cell line K562: karyotype clarification by multicolor fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and locus-specific fluorescence in situ hybridization. – *Cancer Genet Cytogenet.*, 118 (1), 1-8. PMID: 10731582.
  - 75) Hammond H.A., Jin L., Zhong Y., Caskey C.T., Chakraborty R. (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification application. – *Am J Hum Genet.*, 55, 175-189.
  - 76) Hares D.R. (2015) Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. – *Forensic Sci Int Genet.*, 17, 33-34. PMID: 25797140.
  - 77) Hill C.R., Duerwer D.L., Kline M.C., Coble M.D., Butler J.M. (2013) U.S. population data for 29 autosomal STR loci. – *Forensic Sci Int Genet.*, 7 (3), e82-83. PMID: 23317915.
  - 78) Hill C.R., Kline M.C., Coble M.D., Butler J.M. (2008) Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. – *J Forensic Sci.*, 53 (1), 73-80. PMID: 18005005.
  - 79) Hochmeister M.N., Budowle B., Borer U.V., Eggmann U., Comey C.T., Dirnhofer R. (1991) Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. – *J Forens Sci.*, 36, 6, 1649-1661.
  - 80) Huckenbeck W., Kuntze K., Scheil H.G. (1997-2006) The Distribution of the Human DNA-PCR Polymorphisms – a Worldwide Database. Berlin: Verlag Dr. Koster. DNA PCR Datenbank: Supplement Volume I/II/III/IV/V/VI/VII (1998/99/00/01/02/03/04/05/06) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MedFak/Serology/dna.html>.
  - 81) Kent W.J. (2002) BLAT – the BLAST-like alignment tool. – *Genome Res.*, 12 (4), 656-664. PMID: 11932250.
  - 82) Klitschar, M., Al Hammadi, N., Ebner, A., and Reichenpfafer, B. (2000) Is it possible to determine the ethnic origin of caucasian individuals using short tandem repeat loci? – *Progress in Forensic Genetics* 8 (1999). 8, 100-102.
  - 83) Klitschar, M. and Neuhuber, F. (2000) Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. – *J Forensic Sci.*, 45 (3), 669-673.
  - 84) Kornienko I.V., Vodolazhsky D.I., Ivanov P.L. (2002) Genetic variation of the nine Profiler Plus loci in Russians. – *Int J Legal Med.*, 116 (5), 309-311.
  - 85) Krenke BE, Tereba A, Anderson SJ, Buel E, Culhane S, Finis CJ, Tomsey CS, Zchetti JM, Masibay A, Rabbach DR, Amriott EA, Sprecher CJ. (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. – *J Forensic Sci.*, 47 (4), 773-785. PMID: 12136984.
  - 86) Latorra D., Stern C.M., Schanfield M.S. (1994) Characterization of human AFLP systems apolipoprotein B, phenylalanine hydroxylase, and D1S80. – *PCR Methods Appl.*, 3 (6), 351-358. PMID: 7920240.
  - 87) Levedakou E.N., Freeman D.A., Budzynski M.J., Early B.E., Damaso R.C., Pollard A.M., Townley A.J., Gombos J.L., Lewis J.L., Kist F.G., Hockensmith M.E., Terwilliger M.L., Amriott E., McElfresh K.C., Schumm J.W., Ulery S.R., Konotop F., Sessa T.L., Sailus J.S., Crouse C.A., Tomsey C.S., Ban J.D., Nelson M.S. (2002) Characterization and validation studies of powerPlex 2.1, a nine-locus short tandem repeat (STR) multiplex system and penta D monoplex. – *J Forensic Sci.*, 47 (4), 757-772. PMID: 12136983.
  - 88) Maha G.C., Mason J.M., Stuhlmiller G.M., Heine U. (1995) Reply to Pena. – *Am J Hum Genet.*, 56, 1505-1506.
  - 89) Masibay A, Mozer TJ, Sprecher C. (2000) Promega Corporation reveals primer sequences in its testing kits. – *J Forensic Sci.*, 45 (6), 1360-1362. PMID: 11110204.
  - 90) Mathew C.G.P. (1984) The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA. – *Nucleic Acids (Methods in Molecular Biology, volume 2)*. Edited by John M. Walker. The Humana Press Inc., pp. 31-34.
  - 91) Morling N., Allen R.W., Carracedo A., Geada H., Guidet F., Hallenberg C., Martin W., Mayr W.R., Olaisen B., Pascali V.L., Schneider P.M. (2002) Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. — *Forensic Sci Int*, 129 (3), 148–157. PMID: 12372685.
  - 92) Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. – *Science*, 235 (4796), 1616-1622, PMID: 3029872.
-

- 93) National Research Council (1992) DNA Technology in Forensic Science. Natl. Acad. Press, Washington, 1992.
- 94) National Research Council (1994) NRC Committee on DNA Forensic Science: An Update: Statement of Task. Natl. Acad. Press, Washington, 1994.
- 95) National Research Council (1996) The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Natl. Acad. Press, Washington, 1996.
- 96) Nosikov V.V., Ovchinnikov I.V., Gavrilov D.K., Chelnokova M.V. (1991) The use of synthetic oligonucleotide primers for amplification of a variable number of tandem repeats loci for paternity testing. – Nucleic Acids Symp. Ser., 24, 219.
- 97) Oldroyd N.J., Urquhart A.J., Kimpton C.P., Millican E.S., Watson S.K., Downes T., Gill P.D. (1995) A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. – Electrophoresis, 16, 334–337. PMID: 7607165.
- 98) Orekhov V.A., Shaikhaev G.O., Aghajanyan A.V., Zakharenko M.V., Snigiryova G.P. (2009) Effect of low-dose radiation on mutation rates of STR loci commonly used in forensic casework. – 23rd International Society of Forensic Genetics World Congress, Buenos Aires, Argentina, September 14-18, 2009.
- 99) Pena S.D.J. (1995) Pitfalls of paternity testing based solely on PCR typing of minisatellites and microsatellites. – Am J Hum Genet., 56, 1503-1504.
- 100) Pena S.D.J., Chakraborty R. (1994) Paternity testing in the DNA era. – Trends in Genetics, 10, 204-09.
- 101) Perez-Lezaun A., Calafell F., Mateu E., Comas D., Bosch E., Bertranpetit J. (1997) Allele Frequencies for 20 microsatellites in a worldwide population survey. – Hum Hered., 47, 189-196.
- 102) Perkin-Elmer, AmpliType® PM+DQA1 User Guide, 1995. Part No. N808-0094.
- 103) Peterson BL, Su B, Chakraborty R, Budowle B, Gaensslen RE. (2000) World population data for the HLA-DQA1, PM and D1S80 loci with least and most common profile frequencies for combinations of loci estimated following NRC II guidelines. – J Forensic Sci., 45 (1), 118-146. PMID: 10641927.
- 104) Phillips C., Kind S., Fernandez-Formoso L., Gelabert-Besada M., Carracedo A., Lareu M.V. (2013) Global population variability in Promega PowerPlex CS7, D6S1043, and Penta B STRs. – Int J Legal Med., 127 (5), 901-906. PMID: 23842667.
- 105) Rand S., Puers C., Skowasch K., Wiegand P., Budowle B., Brinkmann B. (1992) Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's. – Int J Leg Med., 104 (6), 329-333. PMID: 1355354.
- 106) Rolf B., Horst B., Eigel A., Sanguanserm Sri T., Brinkmann B., Horst J. (1998) Microsatellite profiles reveal an unexpected genetic relationship between Asian populations. – Hum Genet., 102 (6), 647-652.
- 107) Royle N.J., Armour J.A., Webb M., Thomas A., Jeffreys A.J. (1992) A hypervariable locus D16S309 located at the distal end of 16p. – Nucleic Acids Res., 20 (5), 1164, PMID: 1347930.
- 108) Ruitberg C.M., Reeder D.J., Butler J.M. (2001) STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. – Nucleic Acids Res., 29 (1), 320-322.
- 109) Sacchetti L., Calcagno G., Coto I., Tinto N., Vuttariello E., Salvatore F. (1999) Efficiency of two different nine-loci short tandem repeat systems for DNA typing purposes. – Clin Chem., 45 (2), 178-183, PMID: 9931038.
- 110) Sajantila A., Lukka M. (1993) Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrylamide gel electrophoresis. – Int J Legal Med., 105 (6), 355-359. PMID: 8518202.
- 111) Sajantila A, Lukka M, Syvänen AC. (1999) Experimentally observed germline mutations at human micro- and minisatellite loci. – Eur J Hum Genet., 7 (2), 263-266. PMID: 10196715.
- 112) Schneider HR, Rand S. (1996) High-resolution vertical PAGE: an alternative electrophoretic system with multiple forensic applications. – Int J Legal Med., 108 (5), 276-279. PMID: 8721432.
- 113) Schumm et al. (1998) Allelic ladders for short tandem repeat loci. United States Patent 5,783,406.
- 114) Schumm et al. (1998) Multiplex amplification of short tandem repeat loci. United States Patent 5,843,660.
- 115) Shiono H. (1996) Personal identification using DNA polymorphisms - the identification of forensic biological materials. – Nippon Hoigaki Zasshi, 50, 320-330.
- 116) Smolyanitsky A.G., Ivanov P.L., Kornienko I.V., Zamaraev V.S., Perepechina I.O., Komarovskiy Yu.A., Pushkarev V.P., Khromov-Borisov N.N. (2004) Towards Russian reference population data on STR loci. – International Congress Series, 1261, 242-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)01610-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5131(03)01610-8).
- 117) Smolyanitsky A.G., Smolyanitskaya A.I., Popov V.L., Zaslavsky G.I., Khromov-Borisov N.N. (2003) Polymorphism of LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC, HLA-DQA1, Ig-J<sub>H</sub>, D17S30, ApoB and D1S80 loci in northwestern Russians. – Forensic Sci Int., 137, 100–103, PMID: 14550622.
- 118) Sreenan J.J., Pettay J.D., Tbakhi A., Totos G., Sandhaus L.M., Miller M.L., Bolwell B., Tubbs R.R. (1997) The use of amplified variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation. A comparison with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by Southern blotting. – Am J Clin Pathol., 107 (3), 292-298. PMID: 9052379.
- 119) Sullivan KM, Pope S, Gill P, Robertson JM. (1992) Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. – PCR Methods Appl., 2 (1), 34-40. PMID: 1490173.



- 
- 120) Sweet D., Lorente M., Valenzuela A., Lorente J.A., Alvarez J.C. (1996) Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. – *Forensic Sci Int.*, 83 (3) 167-177.
  - 121) Szibor R., Edelmann J., Hering S., Plate I., Wittig H., Roewer L., Wiegand P., Cali F., Romano V., Michael M. (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics--the necessity of reliable standards. – *Forensic Sci Int.*, 138 (1-3), 37-43, PMID: 14642717.
  - 122) Teng Y., Zhang F.X., Shen C.M., Wang F., Wang H.D., Yan J.W., Liu J.L. (2012) Genetic variation of new 21 autosomal short tandem repeat loci in a Chinese Salar ethnic group. – *Mol Biol Rep.*, 39 (2), 1465-1470, PMID: 21617945.
  - 123) Tully G., Sullivan K.M., Gill P. (1993) Analysis of 6 VNTR loci by 'multiplex' PCR and automated fluorescent detection. – *Hum Genet.*, 92 (6), 554-562. PMID: 8262515.
  - 124) Urquhart A., Kimpton C.P., Downes T.J., Gill P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. – *Int J Legal Med.*, 107, 13–20.
  - 125) Urquhart A., Oldroyd N.J., Kimpton G.P., Gill P. (1995) Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. – *BioTechniques*, 18, 116-121. PMID: 7702836.
  - 126) Verbenko DA, Pocheshkhova EA, Balanovskaya EV, Marshanija EZ, Kvitziniya PK, Limborska SA. (2004) Polymorphisms of D1 S80 and 3'ApoB minisatellite loci in Northern Caucasus populations. – *J Forensic Sci.*, 49 (1), 178-180. PMID: 14979371.
  - 127) Verbenko DA, Slominsky PA, Spitsyn VA, Bebyakova NA, Khusnutdinova EK, Mikulich AI, Tarskaia LA, Sorensen MV, Ivanov VP, Bets LV, Limborska SA. (2006) Polymorphisms at locus D1S80 and other hypervariable regions in the analysis of Eastern European ethnic group relationships. – *Ann Hum Biol.*, 33 (5-6), 570-584. PMID: 17381055.
  - 128) Wallin J.M., Holt C.L., Lazaruk K.D., Nguyen T.H., Walsh P.S. (2002) Constructing universal multiplex PCR systems for comparative genotyping. – *Journal of forensic sciences*, 47 (1), 52–65. PMID: 12064671.
  - 129) Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R. (1992) Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. – *PCR Methods Appl.*, 1 (4), 241-250. PMID: 1477658.
  - 130) Walsh P., Metzger D., Higuchi R. (1991) Chelex<sup>R</sup> 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. – *BioTechniques*, 10, 506-513.
  - 131) Wong Z., Wilson V., Patel I., Povey S., Jeffreys A.J. (1987) Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. – *Ann Hum Genet.*, 51 (Pt 4), 269-288, PMID:3482146.
  - 132) Wu W., Hao H., Liu Q., Han X., Wu Y., Cheng J., Lu D. (2014) Analysis of linkage and linkage disequilibrium for syntenic STRs on 12 chromosomes. – *Int J Legal Med.*, 128 (5), 735-739. PMID: 24929640.
  - 133) Wyman A.R., White R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. – *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 (11), 6754-6758. PMID: 693568.
  - 134) Zavarin V., Ilina V., Krassotkin Y., Makarova T., Sutiagina D., Semikhodskii A. (2019) Evaluation of sensitivity and specificity of sibship determination in the Caucasian population of the Russian Federation using the 23 STR loci VeriFiler panel. – *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7 (1), 56-58. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.09.023>.
  - 135) Zhivotovsky L.A., Malyarchuk B.A., Derenko M.V., Wozniak M., Grzybowski T. (2009) Developing STR databases on structured populations: the native South Siberian population versus the Russian population. – *Forensic Sci Int Genet.*, 3 (4), e111-116. PMID: 19647694.

---

## Приложения

### Забор биологического материала

#### ЗАБОР ОБРАЗЦОВ ЗАЩЕЧНОГО (БУККАЛЬНОГО) ЭПИТЕЛИЯ

Ротовую полость тщательно прополоскать водой (2-3 раза). Выждать в течение 3-5 минут, чтобы накопились клетки щечного эпителия. Аптечной ватной палочкой с нажимом протереть внутреннюю поверхность обеих щёк в течение 15-30 секунд. Важно именно протереть, чтобы ватная палочка собрала достаточное количество клеток слизистой оболочки рта. Просушить ватные палочки 1-1,5 часа на проточном воздухе (под вытяжкой или феном), после чего поместить их в маркированные пластиковые пробирки. Закрытые пробирки хранить при +4°C. Пакет с пробирками можно выслать в лабораторию обычной почтой.

ЗАБОР ОБРАЗЦОВ ЖИДКОЙ КРОВИ обычно производится из локтевой вены, в объёме 1-5 мл.

Предпочтительно использовать одноразовые катетеры для забора крови с антикоагулянтом (например, типа “Venoject”, производство “Teguto Corporation”, Бельгия). При заборе крови в одноразовый шприц кровь из него следует аккуратно (без образования пены) перенести в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом. Содержимое пробирок следует перевернуть несколько раз для перемешивания крови с антикоагулянтом. Образцы крови следует хранить при +4°C не более двух месяцев, более длительное хранение (неограниченно) осуществляется при -20°C.

*Антикоагулянты предотвращают свертывание крови. Рекомендуется использовать 0,5 М ЭДТА, рН 8,0. Объёмное соотношение ЭДТА к жидкой крови допустимо от 1:10 до 1:100. Также можно использовать 3,8%-ный раствор цитрата натрия в объёмном соотношении с кровью 1:10. Использование гепарина абсолютно недопустимо! Гепарин (гетерогенный и сульфатированный полисахарид) является мощным ингибитором ДНК-полимеразы и проходит сквозь все процедуры очистки ДНК, в том числе фенол-хлороформной.*

*Содержание ДНК в лейкоцитах жидкой крови составляет 30±60 мкг/мл.*

#### ЗАБОР ОБРАЗЦОВ ЖИДКОЙ КРОВИ НА МАРЛЮ

Аптечный стерильный бинт свернуть в 4-8 слоев и поместить в чашку Петри. На бинт нанести 1-3 мл крови в виде нескольких пятен диаметром 3-4 см. Пятна высушить при комнатной температуре без доступа прямого солнечного света. Высушенные марлевые образцы упаковать в отдельные маркированные чистые конверты и хранить при комнатной температуре. Пакет с конвертами можно выслать в лабораторию обычной почтой.

## **Выделение ДНК из крови (ткани) с использованием протеиназы K и последующей фенол / хлороформной очисткой.**

Первоисточник (модифицированный): Mathew, 1984

При выделении ДНК используются органические растворители. В основе метода лежит лизис клеток крови *додецил сульфатом натрия (SDS)* и деградация белков *протеиназой K*. Затем клеточный лизат обрабатывают смесью *фенол/хлороформ/изоамиловый спирт*. Фенол удаляет из водной фазы белки, а хлороформ – остатки фенола, изоамиловый спирт является пеногасителем. ДНК осаждают с использованием холодного *этанола*, а затем растворяют в *Трис-ЭДТА (TE) буфере* или деионизованной воде.

### **Порядок работы**

1. 300 мкл крови или 100-200 мкг замороженной измельченной ткани (мышца, печень и т.п.) смешать с равным объёмом лизирующего буфера следующего состава:

*10 mM Трис-НСl (pH 7,8)*

*5 mM ЭДТА (pH 8,0)*

*0,1 M NaCl*

*2% SDS*

*При использовании образцов свернувшейся крови нужно ресуспендировать сгусток крови в равном объёме лизирующего буфера.*

2. Добавить 2-6 мкл раствора протеиназы K (20 мг/мл) до конечной концентрации 50-200 мкг/мл и 40 мкл 1 M раствора ДТТ. Содержимое пробирки хорошо перемешать.
3. Образец инкубировать не менее четырех часов (в течение ночи) при 37 °С.  
*После этой стадии можно прерваться на 1-2 дня (образцы хранить при +4 °С).*

### *Провести очистку ДНК от белков:*

4. К образцу добавить 1/10 от общего объёма 3 M ацетата натрия (pH 7.5).  
*Ацетат натрия лучше добавлять до фенольной экстракции, т.к. экстракция в низкосолевым буфере может привести к значительным потерям ДНК.  
Последующие стадии (5-13) должны осуществляться в вытяжном шкафу.*
5. Добавить равный объём фенола (уравновешенного Трис-НСl до pH 7,4-8,0). Аккуратно перемешивать образец (переворачивая пробирку) в течение 3 мин с интервалами в 30 сек.
6. Центрифугировать 2-5 минут при 5-10 тыс. об/мин.  
*После центрифугирования в пробирке образуется 3 фазы: нижняя фенольная, средняя (узкая и белесая) – интерфаза и верхняя водная фаза, содержащая ДНК.*
7. Водную фазу аккуратно отобрать в новую пробирку.  
*Следует избегать переноса в новую пробирку интерфазных белков. Старую пробирку выкинуть.*
8. Повторить пункты 6-7.
9. Добавить 500 мкл смеси фенол/хлороформ или смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт. Аккуратно перемешивать образец (переворачивая пробирку) в течение 3 мин с интервалами в 30 сек.
10. Центрифугировать 2-5 минут при 5-10 тыс. об/мин. Верхнюю фазу аккуратно отобрать в новую пробирку.
11. Повторить пункт 10 до отсутствия интерфазы после центрифугирования (1-2 раза).
12. Добавить 500 мкл хлороформа. Аккуратно перемешивать образец (переворачивая пробирку) в течение 3 мин с интервалами в 30 сек.
13. Центрифугировать 2-5 мин. при 5-10 тыс. об/мин. Верхнюю фазу отобрать в новую пробирку (1,5 мл).  
*Водная фаза содержит ДНК, очищенную от белков.*

### *Провести осаждение ДНК:*

14. К образцу добавить 2,5 объёма холодного (-20°C) 96% этанола. Аккуратно перемешать содержимое пробирки.  
*Осаждение ДНК визуально контролируется по появлению «белкообразных» нитей в растворе.  
Добавление транспортной РНК способствует более полному осаждению ДНК (при малых ожидаемых количествах).*
15. При малом выходе осаждаемой ДНК образец выдержать не менее 30 мин при -70°C или в течение ночи при -20°C.
16. Образец центрифугировать 5 минут при 10 тыс. об/мин.  
*Если осадка ДНК не наблюдается, дополнительно центрифугировать образец в течение 15 мин при максимальном ускорении.*

- 
17. Удалить супернатант, аккуратно перевернув пробирку вверх дном. Удалить остающиеся капли, промокая пробирку на фильтровальной бумаге.
  18. Осажденную ДНК промыть, добавив в пробирку 300-500 мкл холодного 80% этанола. Встряхнуть на Вортексе (1-3 сек). Центрифугировать 2-5 мин при максимальном ускорении.
  19. Повторить п.18.
  20. Высушить осадок ДНК в воздушном шкафу при 40°C (пробирку следует наполовину закрыть).  
*Для высушивания требуется около 10-20 мин.*
  21. К осадку добавить 50-200 мкл ТЕ буфера (10 mM Трис-HCl, pH 7.4-8.0; 1 mM Na<sub>2</sub>ЭДТА). Аккуратно перемешать и инкубировать при 56°C в течение 30-60 мин. Содержимое пробирки встряхнуть на Вортексе и осадить кратковременным центрифугированием.
  22. Определить концентрацию выделенной ДНК.
  23. Образцы ДНК хранить при 2-8°C.

---

### **Дополнительная очистка ДНК, выделенной фенол/хлороформным методом**

**Первоисточник (модифицированный): Федченко и др., 2004**

Для дополнительной очистки «проблемной» ДНК (отсутствуют или являются неспецифичными продукты ПЦР) используются оригинальные одноразовые колонки (амплификационные пробирки на 0,5 мл, с игольчатым отверстием в дне и заполненные очищающим сорбентом). Гель-фильтрация сквозь колонки позволяет освободить раствор ДНК от катионов (смола дауэкс-50W) и низкомолекулярных примесей (сефадекс G-50).

Одна колонка позволяет эффективно очистить до 50 мкл раствора ДНК (*не более, иначе эффективность очистки существенно снижается*). В отдельных случаях, при работе с сильно загрязненной ДНК, успешной оказывается двойная очистка.

Колонки следует хранить при +4°C, в условиях, предохраняющих от высыхания буфера внутри колонок. Срок годности до 6 месяцев со дня изготовления. При необходимости высохшую колонку можно несколько раз промыть уравнивающим буфером (10 мМ Трис-НС1 рН 8,0 и 1 мМ ЭДТА) при центрифугировании на низких оборотах для насыщения геля-сорбента.

#### **Порядок работы**

1. Удалить защитный слой парафильма со дна и крышки колонки.
2. Вставить колонку с полузакрытой крышкой в 1,5-мл пробирку типа Эппендорф и поместить эту конструкцию в микроцентрифугу.
3. Высушить колонку от уравнивающего буфера центрифугированием в течение 5 минут при 4000 g.
4. Колонку переставить в новую 1,5-мл пробирку типа Эппендорф. Пробирку с отфильтрованным буфером выкинуть.
5. В колонку аккуратно (по стенке пробирки) наложить 30-50 мкл раствора ДНК и полузакрыть крышку.
6. Центрифугировать в течение 5 минут при 4000 g.
7. Проконтролировать объем отфильтрованного раствора, который должен быть равен или несколько превышать добавленный объем очищаемой ДНК. При необходимости повторить п.6.  
*Концентрирования раствора ДНК при данном способе очистки не происходит!*
8. Использованную колонку выкинуть. Очищенный раствор ДНК, находящийся в 1,5-мл пробирке использовать в качестве матрицы для ПЦР. Хранить при +4°C.
9. При неудовлетворительных результатах амплификации повторить очистку на новой колонке.
10. Очищенную ДНК желательно анализировать в максимально сжатые сроки (в течение 5 дней), поскольку при более длительном хранении может происходить деградация очищенной ДНК вследствие того, что рН раствора в каждом конкретном случае меняется произвольно.

## Выделение ДНК с использованием ионообменной смолы Челекс-100 (Chelex®-100).

Первоисточник (модифицированный): Walsh et al., 1991

С начала 90-х годов прошлого века и вплоть до сегодняшнего дня является, пожалуй, наиболее распространенным и универсальным неорганическим экспресс-методом выделения ДНК. Метод пригоден для экспертного применения, прост, безопасен, позволяет проводить эффективную экстракцию ДНК из различного биологического материала.

Процедура этого метода вообще не предполагает выделения ДНК в очищенном виде, а заключается в очистке ДНК от белков и металлосодержащих соединений (ингибиторов ПЦР) путем кипячения в присутствии хелатирующего реагента *Челекс-100* (*Килекс*). Получаемый препарат представляет собой клеточный лизат, содержащий все исходные компоненты в инактивированной форме (за исключением ДНК). Супернатант, содержащий одноцепочечную геномную ДНК, непосредственно добавляется в реакционную смесь для ПЦР.

### Приготовление 5%-ной суспензии Челекс-100 (10 мл)

К 500 мг *Челекс-100* добавляют деионизованную воду до конечного объема раствора 10 мл. *Челекс-100* в воде не растворяется. В раствор помещают стерильную магнитную вертушку (размером примерно 7x20 мм), которая необходима для перемешивания суспензии на магнитной мешалке в процессе работы. Значение pH суспензии должно находиться в диапазоне 9-11 и является критическим параметром, определяющим эффективность экстракции. Приготовленный раствор с магнитной вертушкой хранят при комнатной температуре или +4°C.

### Выделение ДНК из крови (свежая, замороженная), пятен крови и слюны

1. В стерильную 1,5-мл микроцентрифужную пробирку добавить 1 мл деионизованной воды.
2. В пробирку добавить 1-400 мкл цельной крови или вырезку из материала с пятном крови размером 3-25 мм<sup>2</sup> или 20-200 мкл свежей слюны.
3. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд (*эту стадию пропустить для пятен крови*).
4. Инкубировать образец при комнатной температуре в течение 10-15 минут, перемешивая на Вортексе через 1-2 минуты.
5. Центрифугировать при максимальном ускорении (10-15 тыс. g) в течение 2 минут.
6. Надосадочную жидкость аккуратно удалить пипеткой, стараясь не потревожить сам осадок. С осадком должно остаться не более 30 мкл жидкости. При работе с вырезкой из пятна крови ее следует оставить в пробирке вместе с осадком.
7. Добавить 200 мкл 5%-ной суспензии Челекс-100.

*Во время отбора суспензию нужно непрерывно перемешивать на магнитной мешалке и использовать наконечники с широким отверстием (при необходимости нужно срезать кончик).*

8. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд для ресуспендирования осадка.
9. Инкубировать в течение 20-30 минут при 56°C (в твердотельном термостате или на водяной бане).
10. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд.
11. Инкубировать в течение 8 минут при 100°C (в твердотельном термостате или на кипящей водяной бане).
12. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд.
13. Центрифугировать при максимальном ускорении (10-15 тыс. g) в течение 2 минут.
14. Для проведения ПЦР использовать 1-5 мкл супернатанта.
15. Образец хранить при 2-8°C (до 1 месяца) или при -20°C (длительное хранение).
16. Для повторного использования повторить с пункта 12.

### Выделение ДНК из луковиц волос

1. Обрезки прикорневых частей волос, содержащих неповрежденную луковичную часть, длиной около 1 см в количестве 1-3 штук поместить в стерильную 1,5-мл микроцентрифужную пробирку.
2. Отмыть содержимое пробирки 30%-ным спиртом в течение 10-15 минут при комнатной температуре.
3. Удалить спирт и отмыть содержимое пробирки в 400 мкл деионизованной воды в течение 10-15 минут при комнатной температуре.
4. Удалить воду, высушить содержимое пробирки.
5. Добавить 50-200 мкл 5%-ной суспензии Челекс-100, 3 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и 2 мкл 1М дитиотрейтола.
6. Инкубировать в течение ночи при 37°C.

7. Добавить 3 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировать в течение часа при 56°C.
8. Продолжить с п. 10 методики выделения ДНК из крови.

*Выделение ДНК из пятен, содержащих сперму*

1. Вырезку из материала с пятном спермы размером 3-25 мм<sup>2</sup> поместить в стерильную 1,5-мл микроцентрифужную пробирку и добавить 300 мкл деионизированной воды.
2. Добавить 6 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл, конечная концентрация 400 мкг/мл). Перемешать таким образом, чтобы вырезка из материала оказалась полностью погруженной в жидкость.
3. Инкубировать в течение 90 минут при 56°C.
4. Вырезку из материала перенести в новую пробирку и хранить при -20°C до полного успешного окончания исследования. *При необходимости следует повторить экстракцию из этого же пятна.*
5. Оставшуюся в исходной пробирке жидкость центрифугировать при максимальном ускорении (10-15 тыс. g) в течение 5 минут.
6. Надосадочную жидкость перенести в новую пробирку.

*Оставшийся осадок представляет собой ядра сперматозоидов.*

*Надосадочная жидкость, перенесенная в новую пробирку, представляет собой лизат неспермальных клеток. Этот препарат следует хранить при -20°C и при необходимости использовать для выделения ДНК неспермальных компонентов, которые могут присутствовать в смешанном пятне (например, эпителиальные клетки или клетки крови). Для этого к лизату нужно добавить 20%-ную суспензию Челекс-100 (1/3 часть от объёма), перемешать и инкубировать при 56°C в течение 30 мин. Далее продолжить с п. 10 методики выделения ДНК из крови.*

7. Ресуспендировать осадок, содержащий ядра сперматозоидов, в 200 мкл буфера TEN 0.15, добавить 20 мкл 10%-го раствора додецилсульфата натрия.
8. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд.
9. Центрифугировать при максимальном ускорении (10-15 тыс. g) в течение 5 минут, надосадочную жидкость осторожно удалить.
10. Ресуспендировать осадок в 1 мл деионизированной воды.
11. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд.
12. Центрифугировать при максимальном ускорении (10-15 тыс. g) в течение 5 минут, надосадочную жидкость осторожно удалить.
13. Добавить к осадку 90 мкл 5%-ной суспензии Челекс-100, 5 мкл 1 М дитиотрейтола (до конечной концентрации 50 mM), 4 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл, до конечной концентрации 800 мкг/мл).
14. Перемешать на Вортексе в течение 5-10 секунд.
15. Инкубировать в течение 90 минут при 56°C.
16. Продолжить с п. 10 методики выделения ДНК из крови.

## Приготовление основных растворов

### Концентрированный раствор бромистого этидия (EtBr), 10 мг/мл

Растворяют 1,0 г бромистого этидия (Ethidium bromide,  $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) в 100 мл деионизованной воды при комнатной температуре при перемешивании. Хранят в темноте (в бутылки темного стекла) при комнатной температуре. Варианты навесок: 100 мг EtBr на 10 мл воды, 500 мг EtBr на 50 мл воды.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорт безопасности на этот реагент. Работать в перчатках. Возможно, бромистый этидий является мутагеном.

### Рабочий раствор бромистого этидия (EtBr), 0,5 мкг/мл

Растворяют 50 мкл концентрированного раствора бромистого этидия (10 мг/мл) в 1,0 литре дистиллированной воды. Хранят в темноте, в бутылки темного стекла или в закрытой кювете для окраски гелей при комнатной температуре. Для ускорения окраски гелей допустимо использование повышенных концентраций бромистого этидия, до **1,25 мкг/мл** (100 мкл концентрированного раствора на 800 мл воды). Раствор используется многократно, до истощения эффективности окраски гелей.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорт безопасности на этот реагент. Работать в перчатках. Возможно, бромистый этидий является мутагеном.

### Фенол, pH 8,0

Кристаллический фенол расплавляют при 65-70°C и перегоняют при 180°C под деионизованную воду. После перегонки водную фазу оставляют в количестве 1/10 от объема получившегося фенола. Добавляют 8-гидрооксихинолин (до конечной концентрации 0,1% = 1 г на 1 л фенола) и 2-меркаптоэтанол (до конечной концентрации 0,02% = 0,2 г на 1 л фенола). Эти соединения являются антиоксидантами, 8-гидрооксихинолин дополнительно придает фенолу желтый цвет. Получившийся на этом этапе «кислый фенол» относительно стабилен, его следует хранить при -20°C в темноте до одного года.

Насыщение фенола. Полученный на предыдущей стадии «кислый фенол» смешивают с равным объемом 1 М Трис-НСl (pH 7,5-8,0). Перемешивают смесь в течение 30-60 минут. Верхнюю водную фазу удаляют. К фенолу добавляют 1/10 объема 0,1 М Трис-НСl (pH 7,5-8,0) и перемешивают смесь в течение 30-60 минут. Если pH водной фазы оказывается больше 7,5, то процедура насыщения закончена. В противном случае удаляют верхнюю водную фазу и повторяют насыщение с 0,1 М Трис-НСl (pH 7,5-8,0) до тех пор, пока pH водной фазы не станет больше 7,5. Фенол под слоем буфера хранят в темноте (в бутылки темного стекла) при 2-8°C в течение одного месяца.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на все используемые реагенты. Фенол является едкой жидкостью и может вызвать тяжелые ожоги. Работать следует в защитной одежде, очках и перчатках, под вытяжкой. При попадании на кожу нужно как можно быстрее смыть фенол под струей воды, затем промыть поврежденное место водой с мылом и только затем протереть 70-96%-ным спиртом. Сразу смывать большим объемом спирта нельзя.

### Смесь хлороформ / изоамиловый спирт (24:1)

Смешивают 240 мл хлороформа и 10 мл изоамилового спирта.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на эти реагенты. Хлороформ оказывает токсическое действие на внутренние органы, особенно на печень. Негорюч. Изоамиловый спирт обладает раздражающим действием, поражает нервную систему. При попадании смеси на кожу нужно смыть под струей воды.

### Смесь фенол / хлороформ / изоамиловый спирт (25:24:1)

Смешивают 250 мл насыщенного фенола, 240 мл хлороформа и 10 мл изоамилового спирта.

Добавляют 1/10 объема 0,01 М Трис-НСl (pH 7,5-8,0). Хранят в темноте (в бутылки темного стекла) при 2-8°C.

**Меры предосторожности.** Как для фенола.



*0,5М раствор ЭДТА, рН 8,0*

Растворяют 186,1 г дигидрата динатриевой соли ЭДТА {Na<sub>2</sub>ЭДТА\*2H<sub>2</sub>O} в 800 мл деионизованной воды. Доводят рН до 8,0 с помощью 10 М раствора едкого натра (NaOH, около 50 мл) при постоянном перемешивании. *ЭДТА не растворяется в воде при кислых значениях рН. Доводят объём раствора водой до 1 л. Разливают на порции, стерилизуют автоклавированием, хранят при 2-8°C.*

*1М раствор Трис-НСl, рН 8,0*

Растворяют 121,1 г трис-основания в 800 мл деионизованной воды, затем концентрированной соляной кислотой (около 45 мл) доводят рН до 8,0. Доводят объём раствора водой до 1 л. Хранят при 2-8°C. *рН растворов Трис-НСl уменьшается на 0,28 ед. при увеличении температуры на 10°C. Также рН буферов на основе Трис-НСl уменьшается при снижении его концентрации.*

*100mM раствор Трис-НСl, рН 8,0*

К 100 мл 1 М раствора Трис-НСl, рН 8,0 добавляют 900 мл деионизованной воды. Хранят при 2-8°C.

*1X Трис-ЭДТА буфер (ТЕ), рН 8,0*

Смешивают 10 мл 1 М Трис-НСl (рН 8,0), 2 мл 0,5 М ЭДТА (рН 8,0) и 988 мл деионизованной воды. Хранят при 2-8°C. *Состав буфера: 10 mM трис-НСl, рН 8,0; 1 mM ЭДТА.*

*1М раствор дитиотрейтола (ДТТ)*

Растворяют 3,09 г ДТТ в 18 мл 10 mM раствора ацетата натрия (рН 5,2) или деионизованной воды. Стерилизуют фильтрованием, разливают на порции по 1 мл и хранят при -20°C.

*10%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS)*

Растворяют 10 г SDS (sodium dodecyl sulfate) в 80 мл деионизованной воды при перемешивании и нагревании до 60-80°C. При необходимости доводят рН раствора до нейтрального (7,5) разбавленной кислотой или щелочью. Доводят объём раствора водой до 100 мл.

**Меры предосторожности.** *Перед началом работы прочтите паспорт безопасности на этот реагент. Работать следует под вытяжкой, в маске, поскольку сухой SDS чрезвычайно летуч.*

*3М раствор ацетата натрия*

Растворяют 246,1 г безводного ацетата натрия CH<sub>3</sub>COONa или 408,2 г тригидрата ацетата натрия {CH<sub>3</sub>COONa \* 3H<sub>2</sub>O} в 500 мл деионизованной воды. Доводят рН раствора до 5.0-6.0 ледяной (безводной) уксусной кислотой, до 7.0 – разбавленной уксусной кислотой. Доводят объём раствора водой до 1 л. Стерилизуют автоклавированием.

*70%-ный этанол*

К 140 мл 96%-ного этилового спирта добавляют 52 мл деионизованной воды. Хранят в плотно закрытой посуде, поскольку раствор сильно гигроскопичен.

*Раствор протеиназы К, 20 мг/мл*

Растворяют 200 мг сухой протеиназы К в 10 мл деионизованной воды. Разливают на порции по 1 мл и хранят при -20°C.

### 10X ТБЕ буфер (10X TBE buffer), pH 8,3

Готовят следующие навески реактивов:

Трис-основание	107,8 г
0,5М ЭДТА, pH 8,0	40 мл
Борная кислота	~ 55 г

Для приготовления 1,0 литра 10X ТБЕ (десятикратный трис-боратный буфер с ЭДТА) в 800 мл деионизованной воды растворяют трис-основание, ЭДТА и немного меньше требуемого количества борной кислоты. После полного растворения компонентов доводят pH до 8,3 остатками борной кислоты. Затем доводят объём раствора до 1л деионизованной водой.

Вместо 0,5М раствора ЭДТА можно использовать сухой дигидрат динатриевой соли ЭДТА {Na<sub>2</sub>ЭДТА\*2H<sub>2</sub>O} в количестве 7,44 г.

Приготовленный раствор 10X ТБЕ устойчиво хранится при комнатной температуре (до 6 месяцев), если его профильтровать через 0,22-0,40 µm фильтр.

В англоязычной литературе используется термин *10X TBE buffer* (Tris/Borate/EDTA).

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на все используемые реагенты.

### Рабочие растворы Трис-боратного буфера (1X и 0,5X ТБЕ)

Для приготовления 1л 1X ТБЕ растворяют 100 мл 10X ТБЕ в 900 мл деионизованной воды.

Для приготовления 1л 0,5X ТБЕ растворяют 50 мл 10X ТБЕ в 950 мл деионизованной воды.

Также для приготовления 0,5X ТБЕ можно смешать 1X ТБЕ с равным объёмом деионизованной воды.

При работе с полиакриламидными гелями используют как 1X, так и 0,5X растворы, при работе с агарозными гелями обычно используют 0,5X разведение.

Для агарозных гелей Трис-боратный буфер эффективен при работе с маленькими (< 200 п.н.) фрагментами ДНК (в сравнении с Трис-ацетатным буфером).

### 10%-ный раствор персульфата аммония (ПСА)

500 мг ПСА (надсерноокислый аммоний, ammonium persulfate, APS, PSA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) растворяют в деионизованной воде при перемешивании, доводя водой объём финального раствора до 5,0 мл. Варианты навесок: 1,0 г ПСА на 10 мл раствора, 2,0 г ПСА на 20 мл раствора. Разливают приготовленный раствор на порции по 0,5-1,0 мл и хранят при -20°C.

ПСА разлагается в водных растворах. Распространено мнение, что срок хранения 10%-го раствора ПСА составляет не более недели при комнатной температуре. Однако на практике раствор может успешно работать и через месяц такого хранения.

Также возможно приготовление **40%-ного раствора** ПСА: 2,0 г ПСА на 5,0 мл раствора.

При приготовлении ПАГ можно в раствор акриламида ПСА добавлять и в сухом виде (несколько кристаллов на кончике шпателя, количество подбирается опытным путём).

Расчётные количества ПСА: 250 мкл 10%-го раствора (или 25 мг сухого порошка) на 40 мл раствора акриламида для ПАГ.

**Вариант для «минигелей» 10x10 см: 40 мкл 40%-го раствора ПСА, 8 мкл TEMED на 10 мл раствора акриламида (6%, 29:1)**

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорт безопасности на этот реагент. Сухой ПСА достаточно гигроскопичен и требует хранения в плотно закрытой упаковке.

### Дезинфицирующие растворы

- 1N водный раствор соляной кислоты.
- 6-10%-ный водный раствор гипохлорита натрия.
- 10%-ный водный раствор хлорной извести (белильной извести).  
Смесь CaCl(ClO), Ca(ClO)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> и Ca(OH)<sub>2</sub> и более сложных соединений на их основе.  
Главная составная часть – CaCl(ClO).

### Приготовление 2%-го агарозного геля

В термостойкую стеклянную коническую колбу или стакан вносят 2,0 г агарозы, добавляют 100 мл рабочего раствора буфера (можно использовать 0,5X TBE, 1X TBE, 1X TAE).

Помещают колбу в микроволновую печь (на 600-800 Вт), на электрическую плитку или в водяную баню. Доводят содержимое колбы до кипения, кипятят до полного расплавления агарозы (30-60 секунд). Готовая агароза должна быть прозрачной и не содержать нерасплавленных частиц. При необходимости повторяют кипячение.

В процессе приготовления раствор агарозы в разной мере выкипает, поэтому его объём желательно довести до исходных 100 мл деионизованной водой. Для этого взвешивают раствор агарозы до кипячения, сбрасывают весы на «0», но не выключают, после кипячения возвращают колбу на весы и доводят теплой деионизованной водой (60°C) вес колбы до «0». Перемешивают раствор, аккуратно вращая колбу.

Охлаждают агарозу до 50-60°C при комнатной температуре или под проточной струей воды (что быстрее), покачивая колбу. При этой температуре уже можно держать колбу в руках без боязни обжечься. Можно также поместить колбу в термостат на 65°C – в этом случае агарозу можно будет использовать в течение дня в любое время.

Заливают агарозу в заранее приготовленную гелевую форму с установленной в ней платформой и гребёнкой (в одну форму можно установить несколько гребёнок, в зависимости от размеров геля и количества анализируемых образцов).

Зубцы гребёнки ни в коем случае не должны касаться дна платформы, должен оставаться зазор около 2 мм. Толщина слоя агарозы должна быть около 4-5 мм.

После застывания агарозы (примерно через 20-30 минут) платформу с застывшим агарозным гелем вынимают из гелевой формы и переносят в камеру для электрофореза. В камеру заливают соответствующий рабочий буфер (того же типа и той же кратности, что был использован при приготовлении геля: 0,5X TBE, 1X TBE, 1X TAE). Буфер в камере должен покрывать гель сверху слоем примерно 5 мм (на толщину геля). Аккуратно, чтобы не повредить лунки геля, вынимают гребёнку.

Готовый гель под слоем буфера можно хранить при 2-8°C до 12 месяцев и более.

## Приготовление растворов акриламид-бисакриламид (общие сведения)

Основной характеристикой полиакриламидных гелей (ПАГ) является размер пор, которые образуются при его полимеризации. Этот показатель определяет относительную скорость продвижения макромолекул ДНК внутри геля в процессе электрофореза и выражается через такие величины, как (%Т) и (%С).

Для приготовления концентрированных (стоковых) растворов для ПАГ используют два мономерных компонента: **акриламид** и **бисакриламид**. Последний отвечает за образование поперечных сшивок в геле.

Процентное содержание мономеров (%Т) соответствует суммарному объёмному числу граммов акриламида и бисакриламида в растворе. Например, в 100 мл раствора **40%Т** содержится **40 г** этих компонентов (акриламид и бисакриламид в любых пропорциях по отношению друг к другу).

Количество сшивающего агента (бисакриламида) в процентах от общего количества мономеров соответствует (%С). Например, показатель **5%С** говорит о том, что на **5** весовых частей бисакриламида приходится  $100-5 = 95$  частей акриламида. Соответственно, соотношение этих компонентов составляет  $5:95 = 1:19$ , а суммарный их вес составляет 20 частей.

В общем случае формулы вычислений следующие:

$$\%T = \{\text{вес в граммах (акриламид + бисакриламид)} / \text{общий объём раствора в мл}\} * 100\%$$
$$\%C = \{\text{вес бисакриламида в граммах} / \text{вес в граммах (акриламид + бисакриламид)}\} * 100\%$$

Соотношение между сшивающим агентом (бисакриламидом) и акриламидом (%С) является очень важным, так как оно существенно влияет на свойства геля. Чем выше содержание акриламида в растворе, тем ниже должно быть содержание бисакриламида. Одновременное увеличение содержания обоих компонентов приводит к образованию гелей с повышенной жесткостью и хрупкостью, а одновременное снижение – к возрастанию мягкости и эластичности.

При приготовлении ПАГ из концентрированных растворов акриламид-бисакриламид происходит разбавление этих растворов, то есть %Т уменьшается. А вот %С (соотношение мономеров между собой) при этом остается неизменным.

Для анализа **микросателлитных** локусов рекомендуется использовать гели с показателями **6-12%Т, 5%С**.

Для приготовления концентрированного раствора акриламид-бисакриламид (**20%Т, 5%С**) растворяют 19 г акриламида и 1 г бисакриламида в 70 мл деионизованной воды. Доводят объём раствора до 100 мл. Варианты навесок: 114 г акриламида и 6 г бисакриламида на 600 мл раствора.

Для анализа **минисателлитных** локусов следует использовать гели с другими показателями: **4-6%Т, 3,3%С**. Для приготовления концентрированного раствора акриламид-бисакриламид (**30%Т, 3,3%С**) растворяют 29 г акриламида и 1 г бисакриламида в 60 мл деионизованной воды. Доводят объём раствора до 100 мл.

Чтобы компоненты быстрее растворились, готовящиеся растворы можно нагреть до +40-50°C при перемешивании на магнитной мешалке.

Готовые растворы следует профильтровать через фильтровальную бумагу и хранить при +4°C, предпочтительно – в темноте (в бутылках темного стекла). Срок стабильного хранения готовых растворов составляет до 12 месяцев и более.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на используемые реагенты.

## Электрофорез в неденатурирующих ПАГ (микросателлитные локусы)

Готовят 10%-ный рабочий раствор для ПАГ следующего состава:

Раствор акриламид-бисакриламид (19:1), 20%-ный водный	400 мл
10X Трис-боратный буфер	80 мл
Раствор глицерина, 50%-ный водный	120 мл
Деионизованная вода	200 мл
<b>Общий объём</b>	<b>800 мл</b>

Раствор следует хранить не более шести месяцев при +4°C в темноте (в бутылки темного стекла).

Для заливки геля между чистыми стёклами (одно с вырезом, второе – без) помещают боковые и нижнюю прокладки (спейсеры) и закрепляют их зажимами. Возможно использование спейсеров толщиной как 0,75 мм, так и 1,0 мм. Сдвоенные в сборе стёкла кладут горизонтально на штатив для наконечников.

Указанные ниже объёмы достаточны для заливки одного ПАГ размером **20x20x0,1 см**.

К **40 мл 10%-го рабочего раствора для ПАГ** добавляют ПСА, перемешивают, добавляют 40-60 мкл ТЕМЕД (тетраметилэтилендиамин, tetramethylethylenediamine, TMEDA, TEMED, C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>) и перемешивают ещё раз. После этого быстро заливают раствор между стёклами и вставляют гребёнку для формирования карманов (лунок геля). Толщина гребёнки должна совпадать с толщиной прокладок.

После окончания полимеризации геля (5-30 минут, в зависимости от количества ПСА, ТЕМЕД и температуры) аккуратно вынимают гребёнку, карманы промывают водой из шприца (струёй, под давлением). Окончание полимеризации геля можно определить по образованию плотного контура вокруг карманов гребёнки.

Сдвоенные стёкла с гелем, удалив зажимы, помещают в аппарат для электрофореза и фиксируют зажимами уже в аппарате. При этом стекло с вырезом должно быть расположено внутри камеры.

Заливают в аппарат для электрофореза **1X или 0,5X Трис-боратный буфер**. Подключают электрофоретическую камеру к источнику питания таким образом, чтобы анализируемые фрагменты ДНК двигались в направлении от катода (-) к аноду (+). Проводят «предфорез» в течение 10-20 минут при 500В.

По окончании предфореза вносят в карманы геля по 3-5-10 мкл амплификата. Как минимум одну дорожку в геле используют для нанесения нелокусного высокомолекулярного стандарта ДНК (по 1,0-1,5 мкл поставляемых растворов). Аллельные «лестницы» наносят по 6-7 мкл таким образом, чтобы каждый анализируемый образец находился рядом с соответствующей аллельной «лестницей».

Проводят электрофорез при следующих условиях:

Напряжение	до 700В
Температура буфера	Не выше 50°C

Основным критерием завышенных предельных условий (мощности) электрофореза является перегрев геля и буфера (более 50°C), а также появление выраженного эффекта «улыбки» для фронта красителя.

При указанных условиях и длине геля 20 см для большинства «коротких» локусов *TPOX*, *UGT1A1-STR*, *D3S1358*, *FGA*, *D7S820*, *LPL*, *D8S1179*, *D10S1248*, *TH01*, *vWFII*, *D13S317*, *D16S539*, *D18S51*, *D19S253*, *D19S433*, *D20S482*, *D21S11*, *D22S1045*, *Амелогенин*, *Y-микросателлиты* электрофорез проводят в течение приблизительно 2,5 – 3,0 часов, до достижения верхним красителем (*xylene cyanol*) нижнего края геля.

Для «среднего» по размеру ПЦР-продуктов локуса *CSF1PO* (и аналогичных ему по диапазону ПЦР-фрагментов) общее время электрофореза следует увеличить на один час (до 3,5 – 4,0 часов).

Для «длинного» локуса *PAH* (и аналогичных ему по диапазону ПЦР-фрагментов) общее время электрофореза следует увеличить на 1,5-2 часа (до 4,5 часов).

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на используемые реагенты.

### Окончание электрофореза в неденатурирующих ПАГ

По окончании электрофореза выключают источник питания, отсоединяют провода от камеры, сливают буфер (его можно использовать несколько раз), вынимают из камеры стёкла с находящимся между ними гелем и кладут на плоскую поверхность. Используя шпатель в качестве рычага, аккуратно разъединяют стекла, удаляют боковые спейсеры. Если одно из стёкол предварительно было обработано *Bind Silane* (реагент для ковалентного прикрепления полиакриламидных гелей к поверхности стекла), то на этой стадии гель должен остаться прилипшим к этому стеклу. Все дальнейшие манипуляции по окраске геля следует проводить с этим стеклом, поместив его в кювету для окраски таким образом, чтобы гель находился сверху стекла.

Если обработка *Bind Silane* не использовалась, то разъединять стекла нужно таким образом, чтобы гель остался на нижнем стекле. Это стекло помещают гелем вниз в кювету для окраски. Заливают в кювету деионизованную воду и при покачивании отделяют стекло от геля. Стекло убирают, воду сливают через край кюветы, аккуратно придерживая гель. На всех последующих стадиях окраски следует манипулировать с гелем максимально аккуратно во избежание разрывов, а также контролировать ровное (без складок) расположение геля внутри кюветы при смене растворов.

Для окраски гелей размером до 20x20 см достаточно использовать по 150-300 мл каждого раствора (в зависимости от размеров кюветы). На всех стадиях рекомендуется помещать кювету с гелем на качалку для аккуратного перемешивания, также необходимо контролировать, чтобы гель был полностью погружён в раствор.

### Окраска ПАГ бромистым этидием

Залить в кювету *рабочий раствор бромистого этидия* (0,5 мкг/мл) на 10-20 минут. Раствор слить (его можно использовать несколько раз), залить в кювету воду для отмывки избыточной фоновой окраски на 10-20 минут. Поместить гель на стекло трансиллюминатора (302 нм) и включить прибор. Фрагменты ДНК должны быть видны как светящиеся оранжево-красные полосы. Зафиксировать результаты анализа фотосъемкой или видеовводом изображения.

**Меры предосторожности.** Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на используемые реагенты.

## Окраска ПАГ нитратом серебра

Все стадии с использованием формалина следует проводить под вытяжкой. Формалин следует хранить при только комнатной температуре, поскольку он инактивируется при хранении на холоде. Формалин является раствором формальдегида (газ) в воде, поэтому зачастую при длительном хранении раствора его точная концентрация не известна. Также при длительном хранении в формалине в виде осадка обнаруживается параформальдегид (полимер формальдегида). В растворе соды параформ разлагается на формальдегид, а в воде обратно растворяется плохо (при нагревании до 50-60°C и помешивании). Поэтому использование на стадии восстановления параформа (также продается в готовой форме) позволяет точнее контролировать рабочую концентрацию формалина.

Часто на стадии проявления (развития окраски) в растворе выпадает мелкодисперсный осадок восстановленного серебра. Во избежание прилипания этого осадка к гелю (что может существенно ухудшить качество изображения), возможно добавление в восстанавливающий раствор детергентов (твин) до конечной концентрации 0,05%.

После окраски гель промывают деионизованной водой в течение 15 минут, переносят на фильтровальную бумагу и высушивают под вакуумом или фотографируют.

### Способ №1. Первоисточник (модифицированный): *Budowle et al., 1991.*

1. Гель ополаскивают деионизованной водой в течение 1 мин.
2. Проводят фиксацию ДНК в геле 10%-ным этанолом в течение 5-10 мин.  
*Раствор можно использовать до 10 раз.*
3. Гель промывают 1%-ным раствором азотной кислоты в течение 6 мин.  
*Раствор можно использовать до 30 раз.*
4. Гель ополаскивают деионизованной водой, затем промывают его в воде при интенсивном встряхивании в течение 5 мин.
5. Гель промывают в темноте 12 mM раствором ляписа (1,94 г на 1 л воды) в течение 20-40 мин.  
*Раствор следует хранить в посуде темного стекла, можно использовать до 10 раз (контролируется по мере истощения окраски гелей).*
6. Гель дважды промывают при интенсивном встряхивании деионизованной водой (по 1 мин.).
7. Гель промывают холодным (+4°C) восстанавливающим раствором, приготовляемым непосредственно перед использованием: {к 0,28M раствору Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (30 г безводной соды на 1л воды) добавляют формальдегид до конечной концентрации 0,019%}. Для покраски геля размером 15x15 см к 200 мл заранее приготовленного раствора соды добавляют 100 мкл формалина.  
*Раствор используется однократно. Отмывку проводят до проявления полос ДНК нужной интенсивности, при необходимости меняют восстанавливающий раствор свежим. Как правило, необходимо от 10 до 20 мин.*
8. Фиксируют гель 10%-ной уксусной кислотой в течение 3-5 мин.  
*Раствор можно использовать до 10 раз.*

### Способ №2. Первоисточник: *Bassam et al., 1991.*

*Более контрастный и чувствительный способ по сравнению с предыдущим.*

1. Гель промывают деионизованной водой в течение 2 мин.
2. Фиксируют гель 7,5÷10%-ной уксусной кислотой при комнатной температуре в течение 5-20 мин.  
*Раствор можно использовать повторно в п. 7.*
3. Гель трижды промывают деионизованной водой, каждый раз в течение 2-5 мин.
4. Импрегнируют гель свежеприготовленным раствором серебра в течение 10-60 мин.  
{К 200 мл раствора ляписа (1÷1,5 г/л воды) за 15 мин до использования добавляется 280÷300 мкл формалина (конечная концентрация 0,056%)}. *Раствор следует хранить в посуде темного стекла. Импрегнирующий раствор используется однократно.*
5. Гель быстро ополаскивают водой в течение 5-20 сек.  
*Время ополаскивания критично. При промедлении (свыше 20 сек) следует повторить п. 4.*
6. Гель промывают охлажденным (до 4-8°C, температура критична) восстанавливающим раствором, приготовляемым непосредственно перед использованием (смешиваются три компонента). {К 200 мл раствора соды (30 г безводного Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> на 1л воды, допустимо уменьшение концентрации до 5 г/л) добавляется 300 мкл формалина (конечная концентрация 0,056%, допустимый диапазон от 0,028 до 0,111%) и 40 мкл свежего раствора пятиводного тиосульфата натрия (10 мг/мл, конечная концентрация 400 мкг/л)}.  
*Восстанавливающий раствор используется однократно. Отмывку проводят до проявления полос ДНК нужной интенсивности. Как правило, необходимо от 2 до 10 мин.*

- 
7. Немедленно фиксируют гель 7,5÷10%-ной уксусной кислотой (оставшейся после п. 2 и охлажденной до 4°C) в течение 1-5 мин. Использование более концентрированного раствора кислоты может привести к потемнению геля. *Фиксирующий раствор используется однократно.*

**Способ №3. Первоисточник: персональное сообщение (Беликов Сергей Иванович, [belikov@lin.irk.ru](mailto:belikov@lin.irk.ru))**

*Контрастный и чувствительный способ.*

1. Фиксируют гель в 0,1% растворе СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide, или второе название hexadecyl-trimethylammonium bromide) при комнатной температуре в течение 5-20 мин.  
*Раствор можно использовать многократно.*
2. Гель трижды промывают в 0,25% растворе аммиака (NH<sub>4</sub>OH, 1мл 25%-ного аптечного раствора на 100 мл воды), каждый раз в течение 2-3 мин.  
*Можно отмывать деионизованной водой, если чувствительность не особо важна.*
3. Импрегнируют гель в течение 10 мин. следующим раствором: к 1л 0,1%-ного раствора ляписа (1г AgNO<sub>3</sub> на 1л воды) последовательно добавляют 4мл 1М NaOH и 4мл 25%-ного аммиака.  
*При добавлении к раствору ляписа щелочи в осадок выпадает гидроокись серебра (наблюдается побурение раствора), затем при добавлении аммиака гидроокись серебра переходит в аммиакат (раствор осветляется). Раствор можно использовать многократно, если хранить в посуде темного стекла и не добавлять восстановителей.*
4. Гель быстро ополаскивают деионизованной водой или 2%-ным раствором соды в течение 30-60 сек.
5. Отмывают гель на свету в 2%-ном растворе соды, содержащем 0,1% параформа (1г параформа на 1 литр соды Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).  
*Восстанавливающий раствор используется однократно. Иногда нужно, чтобы восстанавливающий раствор состарился на сутки. Отмывку проводят до проявления полос ДНК нужной интенсивности. Как правило, необходимо от 5 до 10 мин.*
6. Немедленно фиксируют гель 1%-ной щавелевой кислотой в течение 5-10 мин.  
*Раствор можно использовать до 10 раз.*

***Меры предосторожности.*** *Перед началом работы прочтите паспорта безопасности на используемые реагенты.*





**Электрофорезная карта**

Дата постановки электрофореза:

Электрофорез в \_\_\_\_% ПАГ (19:1 или 29:1) или в ПА-\_\_\_\_ (готовые агарозные гели). **Ненужное зачеркнуть.**

Маркировка дорожек в геле	Маркировка ПЦР-пробирок	Объём ПЦР-смеси, наносимый на гель, мкл	Номер исследования / исследуемый образец	Примечания / фото геля
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Вольтаж:

Время электрофореза:

Примечания:

Фамилия и подпись исполнителя:

**Карта генотипов**

Дата начала и номер исследования	
Предполагаемый отец	
Ребёнок	
Мать	

Концентрация выделенной ДНК, нг/мкл:	отец		ребёнок		мать		Фото геля (дата)	Примечания
	Ал.1	Ал.2	Ал.1	Ал.2	Ал.1	Ал.2		
Генотипы по локусам								
<i>TPOX</i>								
<i>UGT1A1-STR</i>								
<i>D3S1358</i>								
<i>FGA</i>								
<i>CSF1PO</i>								
<i>D7S820</i>								
<i>LPL</i>								
<i>D8S1179</i>								
<i>D10S1248</i>								
<i>TH01</i>								
<i>vWFII</i>								
<i>PAH</i>								
<i>D13S317</i>								
<i>D16S539</i>								
<i>D18S51</i>								
<i>D19S253</i>								
<i>D19S433</i>								
<i>D20S482</i>								
<i>D21S11</i>								
<i>D22S1045</i>								

Дата окончания исследования	
Фамилия и подпись исполнителя	

**Таблица возможного неравновесия по сцеплению между полиморфными локусами, используемыми для идентификации личности и установления родства**

№	Локус	Хромосомная локализация (*)	Использование (**)	НС (***)
<b>1</b>	<i>DIS80</i>	1p36.32 (2,391 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
	<i>DIGATA113</i>	1p36.23 (7,442 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>RHD (+/- blood group D antigen)</i>	1p36.11 (25,599 – 25,656 Mb)	БД (резус-фактор)	
	<i>DIS7 (MS1)</i>	1p35.2 (31,904-31,906 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Terpel	
	<i>DIS1627</i>	1p21.1 (106,963 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>DIS1677</i>	1q23.3 (163,559 Mb)	NIST (NC02), AGCU	
	<i>DIS111</i>	1q24.2 (167,404 Mb)	моноплексы	
	<i>FI3B</i>	1q31.3 (197,007 Mb)	Promega	
	<i>DIS1656</i>	1q42.2 (230,905 Mb)	БД	
	<i>DIS8 (MS32)</i>	1q42.3 (236,260 Mb)	ПДРФ, Cellmark	
<b>11</b>	<i>TPOX</i>	2p25.3 (1,493 Mb)	БД	
	<i>D2S1360</i>	2p24.2 (17,492 Mb)	Chimera, Qiagen	
	<i>ApoB-3'VNTR</i>	2p24.1 (21,224 Mb)	моноплексы	
	<i>D2S441</i>	2p14 (68,239 Mb)	БД	
	<i>IL1RN-VNTR</i>	2q14.1 (113,888 Mb)	моноплексы	
	<i>D2S44 (YNH24)</i>	2q21.2 (133,150-133,153 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Promega	
	<i>D2S1776</i>	2q24.3 (169,645 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D2S1338</i>	2q35 (218,879 Mb)	БД	
	<i>UGT1A1-STR</i>	2q37.1 (234,669 Mb)	Qiagen, моноплексы	
	<i>D3S1358</i>	3p21.31 (45,582 Mb)	БД	
	<b>21</b>	<i>CCR5-delta32</i>	3p21.31 (46,415 Mb)	InDel, моноплексы
<i>D3S4529</i>		3p12.1 (85,852 Mb)	NIST, AGCU	
<i>D3S1744</i>		3q24 (147,092 Mb)	Chimera, Qiagen	
<i>D3S3053</i>		3q26.31 (171,751 Mb)	NIST	
<i>D4S43</i>		4p16.3 (2,336 Mb)	моноплексы	
<i>D4S2366</i>		4p16.1 (6,484 Mb)	Chimera, Qiagen	
<i>D4S2408</i>		4p15.1 (31,304 Mb)	NIST, AGCU	
<i>GC</i>		4q13.3 (72,618 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
<i>D4S2364</i>		4q22.1 (93,517 Mb)	NIST (NC02)	
<i>GYPA</i>		4q31.21 (145,042 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
<b>31</b>	<i>FGA</i>	4q31.3 (155,509 Mb)	БД	
	<i>D5S110 (MS621)</i>	5p15.33 (1,070-1,074 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Terpel	
	<i>DAT-3'VNTR</i>	5p15.33 (1,394 Mb)	моноплексы	

Таблица возможного неравновесия по сцеплению между полиморфными локусами, используемыми для идентификации личности и установления родства (продолжение)

№	Локус	Хромосомная локализация (*)	Использование (**)	НС (***)
	<i>D5S2500</i>	5q11.2 (58,697 Mb)	AGCU, Chimera, Qiagen	
	<i>D5S818</i>	5q23.2 (123,111 Mb)	БД	
	<i>CSF1PO</i>	5q32 (149,456 Mb)	БД	
	<i>F13A01</i>	6p25.1 (6,321 Mb)	Promega	
	<i>HLA-DQA1</i>	6p21.32 (32,609 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
	<i>D6S1017</i>	6p21.1 (41,677 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>SE33</i>	6q15 (88,985 Mb)	БД	
41	<i>D6S366</i>	6q15 (90,812 Mb)	моноплексы	
	<i>D6S1043</i>	6q15 (92,450 Mb)	БД (КНР)	
	<i>D6S474</i>	6q21 (112,879 Mb)	AGCU, Chimera, Qiagen	
	<i>D7S21 (MS31)</i>	7p22.3 (1,311-1,314 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Terpel	
	<i>D7S820</i>	7q21.11 (83,789 Mb)	БД	
	<i>D7S8</i>	7q31.31 (117,862 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
	<i>D7S1517</i>	7q31.32 (123,497 Mb)	Chimera, Qiagen	
	<i>NOS3-VNTR</i>	7q36.1 (150,694 Mb)	моноплексы	
	<i>D7S22 (G3)</i>	7q36.3 (157,944 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Terpel	
	<i>LPL</i>	8p21.3 (19,787 Mb)	Promega	
51	<i>D8S1115</i>	8p11.21 (42,536 Mb)	NIST	
	<i>D8S1132</i>	8q23.1 (107,329 Mb)	Chimera, Qiagen	
	<i>D8S1179</i>	8q24.13 (125,907 Mb)	БД	
	<i>Penta C</i>	9p13	Promega	
	<i>D9S1122</i>	9q21.2 (79,688 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D9S2157</i>	9q34.2 (136,035 Mb)	NIST	
	<i>ABO blood group</i>	9q34.2 (136,130 – 136,150 Mb)	БД	
	<i>D10S1435</i>	10p15.3 (2,243 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D10S2325</i>	10p13 (12,793 Mb)	Chimera, Qiagen	
	<i>D10S1248</i>	10q26.3 (131,092 Mb)	БД	
61	<i>DRD4-VNTR</i>	11p15.5 (0,639 Mb)	моноплексы	
	<i>TH01</i>	11p15.5 (2,192 Mb)	БД	
	<i>HBGG</i>	11p15.4 (5,275 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
	<i>D11S4463</i>	11q25 (130,872 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>vWA</i>	12p13.31 (6,092 Mb)	БД	
	<i>vWFII</i>	12p13.31 (6,092 Mb)	моноплексы	
	<i>CD4</i>	12p13.31 (6,897 Mb)	моноплексы	
	<i>D12S391</i>	12p13.2 (12,450 Mb)	БД	

Таблица возможного неравновесия по сцеплению между полиморфными локусами, используемыми для идентификации личности и установления родства (продолжение)

№	Локус	Хромосомная локализация (*)	Использование (**)	НС (***)
	<i>COL2A1-VNTR</i>	12q13.11 (48,365 Mb)	моноплексы	
	<i>PAH</i>	12q23.2 (103,283 Mb)	моноплексы	
<b>71</b>	<i>D12ATA63</i>	12q23.3 (108,322 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>PLA2A</i>	12q24.31 (120,764 Mb)	моноплексы	
	<i>D12S11 (MS43A)</i>	12q24.33 (132,811-132,821 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Tepnel	
	<i>RBI-VNTR</i>	13q14.2 (49,003 Mb)	моноплексы	
	<i>D13S317</i>	13q31.1 (82,722 Mb)	БД	
	<i>D14S1434</i>	14q32.13 (95,308 Mb)	NIST (NC01), AGCU	
	<i>IgH-VNTR</i>	14q32.33 (106,333 Mb)	моноплексы	
	<i>CYAR04</i>	15q21.2 (51,520 Mb)	моноплексы	
	<i>FESFPS</i>	15q26.1 (91,432 Mb)	Promega	
	<i>Penta E</i>	15q26.2 (97,374 Mb)	Promega	
<b>81</b>	<i>D16S309 (MS205)</i>	16p13.3 (1,233-1,237 Mb)	ПДРФ, Cellmark, Tepnel	
	<i>D16S539</i>	16q24.1 (86,386 Mb)	БД	
	<i>D17S5</i>	17p13.3 (1,956 Mb)	моноплексы	
	<i>D17S974</i>	17p13.1 (10,518 Mb)	NIST	
	<i>5-HTT-LPR</i>	17q11.2 (28,564 Mb)	моноплексы	
	<i>D17S1301</i>	17q25.1 (72,681 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D18S853</i>	18p11.31 (3,990 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D18S51</i>	18q21.33 (60,949 Mb)	БД	
	<i>DC-SIGN-VNTR</i>	19p13.2 (7,810 Mb)	моноплексы	
	<i>LDLR</i>	19p13.2 (11,231 Mb)	Perkin-Elmer, моноплексы	
<b>91</b>	<i>D19S253</i>	19p13.12 (15,728 Mb)	моноплексы	
	<i>D19S433</i>	19q12 (30,417 Mb)	БД	
	<i>D20S482</i>	20p13 (4,506 Mb)	NIST, AGCU	
	<i>D20S1082</i>	20q13.2 (53,865 Mb)	NIST	
	<i>D21S11</i>	21q21.1 (20,554 Mb)	БД	
	<i>D21S2055</i>	21q22.2 (41,191 Mb)	Chimera, Qiagen	
	<i>Penta D</i>	21q22.3 (45,056 Mb)	Promega	
	<i>D22S1045</i>	22q12.3 (37,536 Mb)	БД	

**Таблица возможного неравновесия по сцеплению между полиморфными локусами, используемыми для идентификации личности и установления родства (окончание)**

№	Локус	Хромосомная локализация (*)	Использование (**)	НС (***)
	<i>Amelogenin</i>	Xp22.2 (11,315 Mb) Yp11.2 (6,738 Mb)	БД	
100	<i>ZFX / ZFY</i>	Xp22.11 (24,229 Mb) Yp11.31 (2,847 Mb)	моноплексы	
	<i>DXZI</i>	Xp11.1 (58,561 – 58,581 Mb) Xq11.1 (61,683 – 61,853 Mb)	моноплексы	
	<i>DYZ3</i>	Yp11.2 (10,088 – 10,102 Mb) Yq11.1 (13,106 – 13,131 Mb)	моноплексы	
103	<i>HPRTB</i>	Xq26.3 (133,615 Mb)	Promega	

(\*) по данным *BLAT* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>; Kent, 2002), версия Feb.2009 (GRCh37/hg19).

(\*\*) указано использование соответствующих локусов в международных и национальных Базах Данных (БД), а также в ряде коммерческих наборов.

**Моноплексы** – локусы, в различное время использовавшиеся (используемые) в монолокусном формате.

**ПДРФ** – локусы, метод детекции полиморфизма которых основан на сочетании рестрикции с последующей гибридизацией с соответствующими зондами.

**AGCU** – коммерческий набор *AGCU 21+1 STR Kit* (производства «AGCU ScienTech Incorporation», КНР).

**Cellmark** – коммерческие наборы производства корпораций «Cellmark Diagnostics» (Великобритания) и / или «Lifecodes Corporation – Orchid Cellmark» (США). В настоящее время сняты с производства.

**Chimera** – коммерческий набор *Mentype® Chimera® PCR Amplification Kit* (производства «Biotype Diagnostic GmbH», Германия).

**NIST** – микросателлитные локусы, апробированные в формате различных некоммерческих мультиплексов в *National Institute of Standards and Technology*, США.

**Perkin-Elmer** – коммерческие наборы производства «Perkin-Elmer Corporation», США: *AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit* и *AmpliFLP<sup>(tm)</sup> DIS80 PCR Amplification Kit*. В настоящее время сняты с производства.

**Promega** – коммерческие наборы производства «Promega Corporation», США.

**Terpel** – коммерческие наборы производства «Terpel Diagnostics Ltd.», Великобритания. В настоящее время сняты с производства.

**Qiagen** – коммерческие наборы производства «Qiagen», Германия.

(\*\*\*) **НС – неравновесие по сцеплению.** Следует полагать наличие НС между всеми локусами в выделенной цветом группе, если нет достоверных литературных данных, доказывающих обратное. В приведённой таблице сцепление полагается для всех маркёров, которые локализованы на одном плече хромосомы и физическое расстояние между ними меньше 50 миллионов оснований (**50 Mb**).

Приведённая таблица не претендует на полноту изложения и является обновляемой.