

А. С. Повх**A. Povkh****С. М. Романчук****S. Romanchuk**

*Державний науково-дослідний
експертно-криміналістичний центр МВС України
State Scientific Research Forensic Center,
MIA of Ukraine*

**ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛІЗУ
STR-ЛОКУСІВ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ
РЕАКТИВІВ AmpFISTR® IDENTIFILER® PLUS
ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ РЕАКЦІЇ АМПЛІФІКАЦІЇ
VALIDATION OF STR-LOCUS FRAGMENT ANALYSIS METHOD
BY USING A SET OF REAGENTS AmpFISTR® IDENTIFIER® PLUS
FOR CARRYING OUT THE AMPLIFICATION REACTION**

Мета статті – висвітлити результати внутрішньолaborаторної валідації методу фрагментного аналізу STR-локусів на генетичних аналізаторах АВ 3130 та 3100-Avant із використанням набору реактивів AmpFISTR® Identifiler® Plus для проведення реакції ампліфікації, надати певні рекомендації. У процесі дослідження перевірено в її межах кілька параметрів (точність і достовірність методу, його чутливість, оптимальна концентрація ДНК, гетерозиготний баланс, співвідношення статера та алеля в ДНК-профілі, додаткові піки (+A, -A) та нетипові алелі (артефакти), вплив інгібіторів на реакцію ампліфікації, якість реакції ампліфікації під час дослідження деградованої ДНК, достовірність результатів дослідження відповідно до стандартів ДНК NIST, ДНК-суміші за різних співвідношень концентрації ДНК, аналітичний і стахостичний порого). Підтверджено високоточність методу фрагментного аналізу STR-локусів із використанням набору реактивів Identifiler® Plus і високий рівень достовірності результатів дослідження; його цілковиту придатність та ефективність для встановлення генетичних ознак особи (трупа), а також біологічних слідів, у тому числі й за наявності інгібіторів (винятком є дослідження деградованої ДНК). Методологічну основу дослідження становлять закони і категорії теорії пізнання, зокрема положення матеріалістичної діалектики, що сприяли усвідомленню об'єкта, предмета, мети і завдань дослідження в контексті взаємообумовленості здобутків і потреб практики. При цьому методи формальної логіки (аналіз, синтез, дедукція, індукція, аналогія, абстрагування) дали змогу детальніше усвідомити зміст досліджуваного питання, системно-структурним методом з'ясовано сутність досліджуваних категорій і явищ. Метод моделювання використано під час висвітлення перебігу внутрішньолaborаторної валідації методу фрагментного аналізу STR-локусів на генетичних аналізаторах АВ 3130 та 3100-Avant з використанням набору реактивів AmpFISTR® Identifiler® Plus для проведення реакції ампліфікації.

Ключові слова: валідація; дезоксирибонуклеїнова кислота; короткий тандемний повтор; полімеразна ланцюгова реакція; фрагментний капілярний електрофорез.

Цель статьи – отобразить результаты внутриlaborаторной валидации метода фрагментного анализа STR-локусов на генетических анализаторах АВ 3130 и 3100-Avant с использованием набора реактивов AmpFISTR® Identifiler® Plus для проведения реакции амплификации, дать соответствующие рекомендации. В процессе исследования проверено в ее рамках несколько параметров (точность и достоверность метода, его чувствительность, оптимальная концентрация ДНК, гетерозиготный баланс, соотношение статера и аллеля в ДНК-профиле, дополнительные пики (+A, -A)

и нетипичные аллели (артефакты), влияние ингибиторов на реакцию амплификации, качество реакции амплификации в ходе исследования деградированной ДНК, достоверность результатов исследования в соответствии со стандартами ДНК NIST, ДНК-смеси при различных соотношениях концентрации ДНК, аналитический и стохастический пороги). Подтверждена высокоточность метода фрагментного анализа STR-локусов с использованием набора реактивов Identifiler® Plus и высокий уровень достоверности результатов исследования; его полную пригодность и эффективность для установления генетических признаков личности (трупа), а также биологических следов, в том числе и при наличии ингибиторов (исключением является исследование деградированной ДНК). Методологическую основу исследования составляют законы и категории теории познания, в частности положения материалистической диалектики, которые способствовали осознанию объекта, предмета, цели и задач исследования в контексте взаимообусловленности достижений и потребностей практики. При этом методы формальной логики (анализ, синтез, дедукция, индукция, аналогия, абстрагирование) позволили подробнее осознать содержание изучаемых вопросов, системно-структурным методом раскрыта сущность исследуемых категорий и явлений. Метод моделирования использован при освещении хода внутрилабораторной валидации метода фрагментного анализа STR-локусов на генетических анализаторах AB 3130 и 3100-Avant с использованием набора реактивов AmpFISTR® Identifiler® Plus для проведения реакции амплификации.

Ключевые слова: валидация; дезоксирибонуклеиновая кислота; короткий tandemный повтор; полимеразная цепная реакция; фрагментный капиллярный электрофорез.

The purpose of the article is to clarify the results of in-vitro validation method of the fragmentation analysis of the STR-locus on the AB 3130 and 3100-Avant genetic analyzers, using the AmpFISTR® Identifiler® Plus reagent kit for the amplification reaction, and to provide specific recommendations. During the study several parameters have been checked (accuracy and reliability of the method, its sensitivity, optimal DNA concentration, heterozygous balance, stator-allele ratio in the DNA profile, additional peaks (+ A, -A) and atypical alleles (artifacts) were tested within the study, the effect of the inhibitors on the amplification reaction, the quality of the amplification reaction during the degradation DNA study, the reliability of the results according to NIST DNA standards, the DNA mixture at different ratios of DNA concentration, analytical and stochastic thresholds). The accuracy of the method of fragment analysis of STR-loci using the set of Identifiler® Plus reagents and the high level of reliability of the results of the study, its complete suitability and efficacy for establishing the genetic traits of a person (corpse), as well as biological traces, were confirmed including the confirmation of the method in the presence of inhibitors (with the exception of degraded DNA studies). The methodological basis of the study includes laws and categories of the theory of cognition, particularly the provisions of materialistic dialectics, which contributed to the awareness of the object, subject, purpose and objectives of the study in the context of the interdependence of achievements and needs of practice. At the same time, formal logic methods (analysis, synthesis, deduction, induction, analogy, abstraction) made it possible to understand in more detail the content of the investigated issues, and the essence of the studied categories and phenomena was clarified by the system-structural method. The simulation method was used to outline the flow of in vitro laboratory validation of the fragment analysis of STR loci method on genetic analyzer AB 3130 and 3100-Avant using the AmpFISTR® Identifiler® Plus reagent kit for carrying out the amplification reaction.

Keywords: validation; deoxyribonucleic acid; short tandem repetition; polymerase chain reaction; fragment capillary electrophoresis.

Застосування високотехнологічних методів аналізу ділянок дезоксирибонуклеїнової кислоти (далі – ДНК), у послідовності яких є tandemні повтори, стало проривом у криміналістичній ідентифікації особи (трупа), адже їх набір унікальний для кожного індивідуума, крім однойцевих близнюків (Butler, 2006). Залежно від розміру повтори поділяють на мікро- та мінісателіти (Pimenov, Kultin, & Kondrashov, 2001, s. 22). Мікросателіти – це локуси (ділянки ДНК) із короткими tandemними повторами, які містять від двох до шести пар нуклеотидів; мінісателіти – локуси з перемінною кількістю tandemних повторів із семи і більше пар нуклеотидів.

Уперше думку про доцільність використання гіперваріабельних мінісателітів (Variable Number Tandem Repeat, далі – VNTR-локуси) висловив видатний англійський генетик Джеффріс у 1985 р. (Jeffreys, Wilson, & Thein, 1985, vol. 314; 316). Активного розвитку в цей

період набули і мікросателіти (Short Tandem Repeat, далі – STR-локуси), застосування яких забезпечувало більш точну ідентифікацію особи (трупа) (Fregeau, & Fournery, 1993; Wang et al., 1995). Саме з цього часу STR-локуси широко використовують у криміналістичному ДНК-аналізі. На їх основі створено бази даних геномної інформації людини, які сприяють вирішенню багатьох завдань кримінального судочинства.

Зазвичай експертові для дослідження надходять сліди біологічного походження, які могли піддаватися певному впливу зовнішнього середовища, як-то: різкі зміни температури, довготривале перебування у воді, ґрунті, снігу, дія хімічних і біологічних речовин тощо. Результатом такого впливу є деградація та інгібування ДНК, що ускладнює молекулярно-генетичні дослідження. У зразках біоматеріалу з деградованою ДНК більш імовірні збереження коротких фрагментів (STR-локусів) порівняно з довгими (VNTR-локусами), що дає змогу встановити генетичні ознаки біологічних слідів.

Під час молекулярно-генетичної експертизи для генотипування зразків крім сучасних наборів реактивів на практиці іноді використовують набір реактивів для проведення реакції ампліфікації AmpFlSTR® Identifiler® Plus (далі – Identifiler® Plus) (AmpFlSTR® Identifiler® Plus, 2015; Wang, Chang, Lagace, Calandro, & Hennessy, 2012). Непоодинокими є завдання провести порівняльну експертизу, у якій генетичні ознаки особи (трупа) або слідів біологічного походження встановлені з використанням набору реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifiler® Plus.

Кожна лабораторія, в якій проводять дослідження, повинна мати експериментальний доказ придатності набору реактивів, використовуваних для вирішення поставлених завдань, шляхом його валідації (*Zahalni vymohy do kompetentnosti*, 2006), засвідчуючи тим самим актуальність вивчення цієї проблеми.

Результати валідаційних досліджень набору реактивів Identifiler® Plus опубліковані безпосередньо виробником (AmpFlSTR® Identifiler® Plus, 2015; *Artifacts Identified*, 2018), а також деякими науковцями, зокрема (Wang, Chang, Lagace, Calandro, & Hennessy, 2012; Gapinski, 2015).

Мета статті – висвітлити перебіг проведеної в Державному науково-дослідному експертно-криміналістичному центрі МВС України внутрішньолабораторної валідації методу із зазначеним набором реактивів, проаналізувати отримані результати і надати певні рекомендації.

Валідацію методу проводили на автоматичних генетичних аналізаторах (далі – ГА) Applied Biosystems 3130 (далі – АВ 3130) та ABI PRISM® 3100-Avant (далі – 3100-Avant) компанії Applied Biosystems, США, відповідно до вимог Наукової робочої групи методів ДНК-аналізу (SWGDM) (*Applied Biosystems 3130*, 2010; *ABI PRISM® 3100*, 2010; *Scientific Working Group*, 2015). Під час цього дослідження тестували набір реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifiler® Plus (AmpFlSTR® Identifiler® Plus, 2015). Об'єктами були:

- геномна ДНК людини;
- алельний леддер Identifiler® Plus;
- стандарти ДНК NIST 2391b;
- стандарти ДНК NIST 2391c.

Геномну ДНК виділено зі зразків крові людини загальноприйнятим методом із використанням іонообмінної смоли Chelex 100 (Pimenov, Kultin, & Kondrashov, 2001, s. 47). Реакційну суміш для проведення реакції ампліфікації, стандарти ДНК NIST 2391b та NIST 2391c готували згідно з відповідними протоколами (*Certificate of Analysis Standard*

Reference Material® 2391b; 2391c). Кількість та якість виділеної ДНК визначали за допомогою набору реактивів Quantifiler® Human (Applied Biosystems, США) для проведення полімеразної ланцюгової реакції (далі – ПЛР) в реальному часі (*Quantifiler Kits*, 2012). Для об'єктів кожного блоку досліджень проводили реакції ампліфікації, розділення та детекцію продуктів ампліфікації. Показники чутливості набору реактивів Identifiler® Plus порівнювали з показниками чутливості набору реактивів AmpFISTR® Profiler® (далі – Profiler®) (Dayton et al., 2009).

Кількість аналітичних (дублювання реакційних лунок) і біологічних (дослідження в різні дні) повторів для кожного досліджуваного була індивідуальною. Результати аналізували на програмному комплексі GeneMapper ID v. 3.2 із використанням програмного забезпечення Data Collection v. 2.0 (*Hate Crime*, 2015; *GeneMapper ID*, 2005), вважаючи їх статистично достовірними за похибки $P < 0,05$. Статистичний аналіз проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel.

Усі реактиви та обладнання, використані в цьому методі дослідження, відповідають вимогам міжнародного стандарту системи управління якістю ДСТУ ISO/IES 17025 (*Zahalni vymohy do kompetentnosti*, 2006).

Розглянемо перебіг внутрішньолабораторної валідації методу фрагментного аналізу STR-локусів на генетичних аналізаторах АВ 3130 та 3100-Avant із використанням набору реактивів AmpFISTR® Identifiler® Plus для проведення реакції ампліфікації.

Визначення точності та достовірності зазначеного методу дослідження

Молекулярну масу алелів леддера Identifiler® Plus визначали за висотами піків алелів на електрофореграмах (далі – висота піків алелів), отриманих під час фрагментного аналізу. Аналіз проводили для кожного із чотирьох (3100-Avant) та восьми (АВ 3130) капілярів ГА, реакційні лунки дублювали п'ять разів, дослідження повторювали тричі в різні дні. Для кожного локусу розраховували відхилення молекулярних мас алелів від їх середнього значення.

З'ясування чутливості методу

Геномну ДНК, виділену зі зразка крові людини, титрували з бідистильованою деіонізованою водою у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 та аналізували з використанням системи 7500 PCR Real Time / Quantifiler Human (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017). Потім проводили реакції ампліфікації з концентраціями ДНК 0.74; 0.65; 0.58; 0.32; 0.17; 0.05; 0.04 та 0.03 нг/мкл. Фрагментний аналіз здійснювали при п'яти- та десятисекундних ін'єкціях. Аналітичний поріг інтенсивності становив 50 відносних одиниць флуоресценції (relative fluorescence units, далі – RFU).

Кількість аналітичних і біологічних повторів була кратною трьом. Найменшу концентрацію ДНК, яку слід використати в реакції ампліфікації для отримання якісного результату, визначали, оцінюючи такі критерії, як повнота ДНК-профілів, гетерозиготний баланс, висота піків алелів, поява побічних піків.

Визначення оптимальної концентрації ДНК

Геномну ДНК виділили з п'яти зразків крові людини, кожен зразок нормалізували до концентрацій 0,075; 0,1 та 0,2 нг/мкл. З кожним із розведень проводили реакції ампліфікації та фрагментний аналіз, тричі повторюючи ці дослідження. Оптимальну концентрацію ДНК, яку потрібно додати до проби для отримання якісного результату реакції ампліфікації, визначали за показниками гетерозиготного балансу та за висотами піків алелів, які обраховували в RFU.

Дослідження гетерозиготного балансу в ДНК-профілях

Кожен зразок виділеної з 20 зразків крові людини геномної ДНК нормалізували до концентрації 0,1 нг/мкл, після чого проводили реакції ампліфікації та фрагментний аналіз. Аналітичні дослідження повторювали тричі, біологічні – двічі. Співвідношення між гетерозиготними алелями в кожному локусі обраховували за отриманими показниками висоти піків. Основним критерієм оцінки гетерозиготного балансу була різниця висот піків гетерозиготних алелів.

Дослідження співвідношення висоти хибного алеля (статера) та істинного алеля в ДНК-профілі

Постановка цього досліду була подібною до попереднього. У кожному локусі на електрофореграмах, отриманих під час фрагментного аналізу, вираховували співвідношення висот піків статерів та алелів.

Дослідження додаткових піків (+A, -A), а також нетипових алелів (артефактів) у ДНК-профілі

Концентрацію геномної ДНК визначали полімеразною ланцюговою реакцією в реальному часі, нормалізуючи її до 0,2 нг/мкл (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017). Після цього проводили реакції ампліфікації з тривалістю останньої стадії 10, 20, 30 і 40 хв, а також фрагментний аналіз. Аналітичні дослідження повторювали тричі в різні дні. Визначали величину позаматричного нуклеотидного додатка $\pm A$.

Дослідження показників інгібування реакції ампліфікації

Змодельювали процес інгібування реакції ампліфікації (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017). Аналітичні та біологічні дослідження повторювали тричі. Аналізуючи отримані результати, оцінювали повноту ДНК-профілів, висоту піків алелів, гетерозиготний баланс алелів.

Дослідження деградованої ДНК

Підготували зразки деградованої ДНК (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017), провели з кожним із них реакції ампліфікації та фрагментний аналіз. Для оцінки ступеня деградації ДНК у кожній часовій точці оцінювали повноту ДНК-профілів при п'яти- та десятисекундних ін'єкціях. Аналітичні та біологічні дослідження повторювали тричі.

Визначення достовірності результатів дослідження з використанням стандартів ДНК NIST

Для аналізу використовували вісім компонентів стандартів ДНК NIST 2391b (№ 1, 2, 3, 4, 5, 7, GM09947A, GM09948) та чотири компоненти стандартів ДНК NIST 2391c (A, B, C, D). Кожний стандарт нормалізували до концентрації 0,1 нг/мкл. З кожним компонентом стандартів проводили реакції ампліфікації та фрагментний аналіз, тричі повторюючи ці дослідження. Достовірність отриманих результатів визначали, порівнюючи отримані дані зі значеннями у свідоцтвах проведення аналізу стандартів ДНК NIST 2391b та NIST 2391c (*Certificate of Analysis Standard Reference Material*® 2391b; 2391c).

Дослідження ДНК-сумішей за різних співвідношень концентрації ДНК із використанням стандартів ДНК NIST 2391c

Компоненти А, В, С стандартів ДНК NIST 2391c нормалізували до концентрації 0,1 нг/мкл, потім змішували, дотримуючись певного співвідношення (табл. 1).

Таблиця 1

Співвідношення компонентів стандартів ДНК NIST 2391с у сумішах

Комп.	A:B	A:B	A:B	A:B	A:B	A:C	A:C	A:C	A:C	A:C	B:C	B:C	B:C	B:C	
X:X	1:1	1:4	1:8	4:1	8:1	1:1	1:4	1:8	4:1	8:1	1:1	1:4	1:8	4:1	8:1
V _к , мкл	5+5	2+8	2+16	8+2	16+2	5+5	2+8	2+16	8+2	16+2	5+5	2+8	2+16	8+2	16+2

Примітка. Комп. – компоненти стандарту ДНК NIST 2391с; X:X – співвідношення сумішей; V_к – об'єм компонентів.

Для кожної суміші проводили реакції ампліфікації та фрагментний аналіз, тричі повторюючи ці дослідження. За одержаними результатами визначали суміші, в яких можна відокремити основну (домінуючу) та другорядну особу, враховуючи показники висоти піків алелів і статерів.

Визначення аналітичного та стахостичного порогів ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant

Для визначення аналітичного порога проаналізовано значення фонового шуму, яке детектували упродовж усіх етапів валідаційних досліджень.

Вихідними даними для розрахунку стахостичного порога слугували результати всіх етапів досліджень у процесі внутрішньолабораторної валідації, у межах якої перевірено кілька параметрів.

Точність і достовірність методу

Стандартне відхилення молекулярних мас алелів леддера Identifiler® Plus під час дослідження на ГА АВ 3130 становило 3,7 %. Максимальне +0,12 п. о. (8,83 %) спостерігали в локусі D2S1338 (рис. 1).

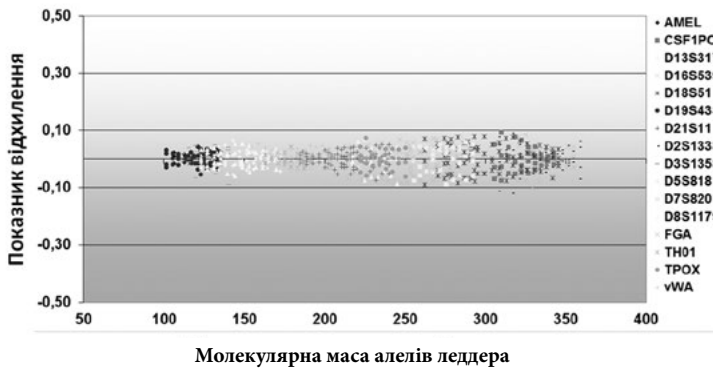


Рис. 1. Стандартне відхилення молекулярних мас алелів леддера Identifiler® Plus у кожному локусі під час фрагментного аналізу на ГА АВ 3130

З використанням ГА 3100-Avant відповідне стандартне відхилення становило 3,8 %. Максимальне, в локусі CSF1PO, –0,13 п. о. (9,93 %) (рис. 2). Відхилення молекулярних мас алелів леддера, досліджених на обох ГА, – у межах $\pm 0,5$ п. о., що збігається з результатами валідаційних досліджень ального леддера Profiler® (Dayton et al., 2009).

Таким чином, метод фрагментного аналізу на ГА АВ 3130 і 3100-Avant з використанням набору реактивів Identifiler® Plus для реакції ампліфікації високоточний, з високим рівнем достовірності отриманих результатів.

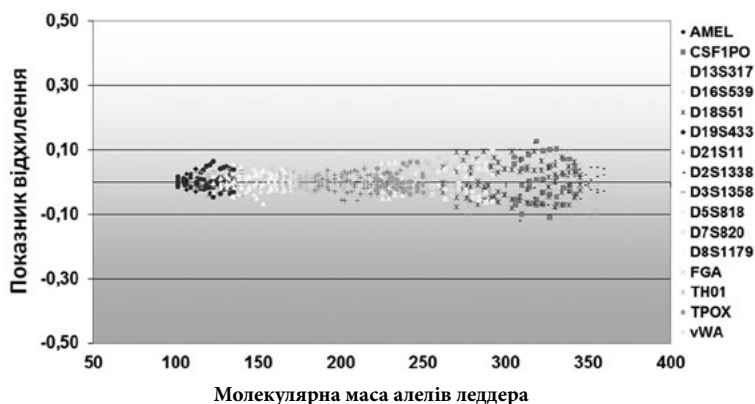


Рис. 2. Стандартне відхилення молекулярних мас алелів леддера Identifiler® Plus у кожному локусі під час фрагментного аналізу на ГА 3100-Avant

Чутливість методу

Мінімальна концентрація ДНК, яку додавали до реакції ампліфікації для отримання повних ДНК-профілів після фрагментного аналізу на обох ГА, при п'ятисекундній ін'єкції становила 0,17 нг/р., а для отримання ДНК-профілів, які придатні для ідентифікації, але мають алелі не за всіма локусами (далі – неповні ДНК-профілі) – 0,05 нг/р. (табл. 2).

Таблиця 2

Чутливість генетичних аналізаторів

Параметри	Концентрація ДНК у зразках, нг/р.							
	0,74	0,65	0,58	0,32	0,17	0,05	0,04	0,03
	П'ятисекундна ін'єкція ГА АВ 3130							
ГБ, %	88,61	89,32	89,01	86,65	82,48	81,43	—	—
СВ, %	9,85	6,25	8,65	8,33	10,22	16,76	—	—
Мін., %	69,38	78,36	72,03	71,84	68,03	48,33	—	—
RFU	601	593	523	299	127	82	65	57
К-сть алелів	27	27	27	27	27	26	5	2
Повнота ДНК-профілів, %	100	100	100	100	100	96	19	7
ГА 3100-Avant								
ГБ, %	89,51	89,78	88,57	86,14	85,37	87,34	—	—
СВ, %	8,99	5,05	7,71	10,53	12,34	8,79	—	—
Мін., %	72,46	82,72	72,57	68,21	66,93	73,68	—	—
RFU	626	590	332	253	116	65	65	64
К-сть алелів	27	27	27	27	27	17	2	1
Повнота ДНК-профілів, %	100	100	100	100	100	63	7	4

	Десятисекундна ін'єкція ГА АВ 3130							
	ГБ, %	89,41	89,54	89,38	86,12	84,77	78,00	72,49
СВ, %	9,25	5,94	8,73	10,67	11,26	16,48	24,24	—
Мін., %	71,59	78,12	71,52	69,67	69,04	49,34	37,86	—
RFU	1336	1151	940	584	259	145	80	80
К-сть алелів	27	27	27	27	27	27	17	5
Повнота ДНК-профілів, %	100	100	100	100	100	100	63	19
	ГА 3100-Avant							
ГБ, %	89,79	89,08	90,39	85,51	84,23	80,23	—	—
СВ, %	8,62	5,03	8,16	10,05	11,45	16,11	—	—
Мін., %	72,25	82,32	73,38	69,89	67,67	52,94	—	—
RFU	1230	864	783	530	298	119	86	87
К-сть алелів	27	27	27	27	27	27	9	4
Повнота ДНК-профілів, %	100	100	100	100	100	100	33	15

Примітка. ГБ – гетерозиготний баланс; СВ – стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу; Мін. – мінімальне значення гетерозиготного балансу; RFU – висоти піків алелів на електрофореграмі; нг/р. – нг/на реакцію.

Мінімальна концентрація ДНК, яку додавали до реакції ампліфікації для отримання повних ДНК-профілів після фрагментного аналізу на обох ГА, при десятисекундній ін'єкції становила 0,05 нг/р., а для отримання неповних ДНК-профілів, придатних для ідентифікації, – 0,04 нг/р. (табл. 2).

За зазначеної концентрації повнота ДНК-профілів, отриманих після фрагментного аналізу на ГА 3100-Avant, становила 33 %, що недостатньо для ідентифікації особи (група). На обох ГА при десятисекундній ін'єкції висота піків алелів на 80–90 % перевищувала цей показник порівняно з п'ятисекундною ін'єкцією. При цьому зростала кількість побічних піків (артефактів), що заважало інтерпретації результатів.

При концентраціях ДНК у реакції ампліфікації 0,03 нг/р. і 0,04 нг/р. значення гетерозиготного балансу знижувалося, зумовлюючи стахостичний ефект, який не залежав від тривалості ін'єкції.

Чутливість набору реактивів Identifiler® Plus удев'ятеро перевищила чутливість набору реактивів Profiler®, оскільки порогом чутливості набору реактивів Profiler® є, засвідчили результати валідаційних досліджень, концентрація 0,4 нг/р. (Dayton et al., 2009).

Отже, встановлено, що ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant мають достатню чутливість при використанні для реакції ампліфікації набору реактивів Identifiler® Plus. Чутливість ГА АВ 3130 на 13 % перевищує чутливість ГА 3100-Avant.

Оптимальна концентрація ДНК

За всіх концентрацій ДНК, підтверджено результатами дослідження, загальні характеристики ДНК-профілів були в межах норми (табл. 3). Лише при концентрації ДНК 0,2 нг/мкл на електрофореграмах з'явилися побічні піки, які не дозволили точно інтерпретувати отримані результати.

Таблиця 3

**Показники гетерозиготного балансу та висот алелів піків
на електрофореграмах за різних концентрацій ДНК**

Локуси	Конц. ДНК, 0,75 нг/р.			Конц. ДНК, 1 нг/р.			Конц. ДНК, 2 нг/р.		
	ГБ, %	СВ, %	RFU	ГБ, %	СВ, %	RFU	ГБ, %	СВ, %	RFU
AMEL	96	3	1057	92	6	1555	94	4	2310
CSF1PO	88	8	674	92	6	919	95	5	1487
D13S317	89	6	1232	87	6	1667	91	8	2672
D16S539	93	2	1342	94	3	1957	92	0	2944
D18S51	95	3	772	93	8	1041	91	4	1613
D19S433	89	7	692	88	6	972	95	5	1592
D21S11	93	4	720	89	6	1083	94	4	1691
D2S1338	90	2	781	95	3	1139	90	3	1744
D3S1358	92	1	1172	79	7	1671	92	11	2641
D5S818	87	7	861	92	6	1245	98	0	1972
D7S820	96	3	635	84	6	928	85	4	1481
D8S1179	92	7	785	92	3	1128	98	1	1852
FGA	89	6	641	92	5	880	93	2	1415
TH01	89	2	1056	98	2	1477	94	4	2293
TPOX	92	4	1043	95	1	1471	98	1	2260
vWA	91	2	938	94	5	1235	97	3	1960
Середні значення, %	91	4	900	91	5	1273	94	4	1995

Примітка. Конц. – концентрація, ГБ – гетерозиготний баланс, СВ – стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу; RFU – висоти піків алелів на електрофореграмах.

Таким чином, ураховуючи похибку системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human, яка становить $\pm 0,025$ нг/мкл (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017) у разі проведення реакції ампліфікації з використанням набору реактивів Identifiler® Plus, кількість геномної ДНК доцільно нормалізувати до концентрації 0,1 нг/мкл.

Гетерозиготний баланс

Результати дослідження засвідчили показники гетерозиготного балансу в ДНК-профілях, отримані після фрагментного аналізу на ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant, у межах однакових значень (рис. 3).

Найбільшу різницю висот піків гетерозиготних алелів – у середньому $89,5\% \pm 8,5\%$ – спостерігали в локусі D21S11. При значеннях стандартних відхилень –3 гетерозиготний баланс дорівнював приблизно 64%. Найстабільніший був локус Amelogenin (AMEL). Середнє значення різниці висот гетерозиготних алелів становило в середньому $94\% \pm 5\%$. При значеннях стандартних відхилень –3 гетерозиготний баланс дорівнював приблизно 79%.

Співвідношення статера до алеля в ДНК-профілі

Найбільшу різницю висот піків статерів і висот піків алелів ($8\% \pm 1,7\%$) спостерігали в локусі D19S433 (рис. 4). За стандартних відхилень +3 на ГА АВ 3130 співвідношення зазначених піків досягало приблизно 13%, на ГА Avant-3100 у локусі vWA – приблизно 14%.

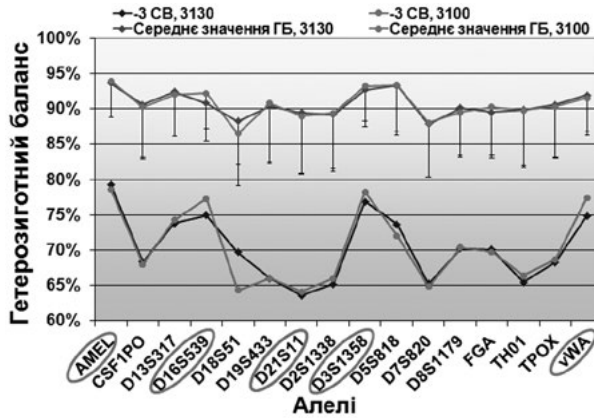


Рис. 3. Гетерозиготний баланс у ДНК-профілях, отриманих після фрагментного аналізу на ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant, де: СВ – стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу; ГБ – гетерозиготний баланс; 3130 – ГА АВ 3130; 3100 – ГА 3100-Avant; вертикальні лінії характеризують співвідношення висот піків статерів і висот піків алелів

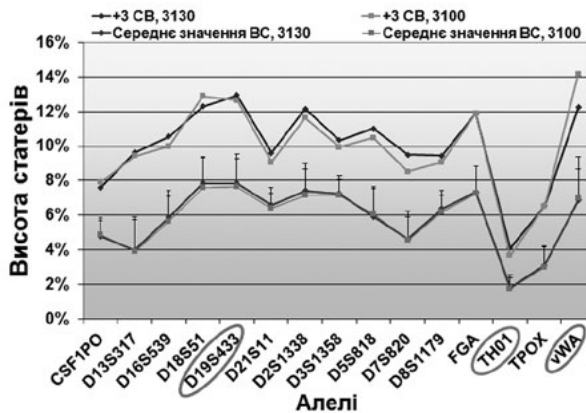


Рис. 4. Співвідношення висот піків статерів і висот піків алелів у ДНК-профілях, отриманих після фрагментного аналізу на ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant, де: СВ – стандартне відхилення показників висот піків статерів і висот піків алелів; ВС – висоти піків статерів; 3130 – ГА АВ 3130; 3100 – ГА 3100-Avant; вертикальні лінії характеризують співвідношення висот піків статерів і висот піків алелів

Найменше значення співвідношення піків, про які йдеться, під час дослідження на обох ГА спостерігали в локусі TH01: воно становило $1,7 \% \pm 0,65 \%$ на ГА АВ 3130 та $1,8 \% \pm 0,77 \%$ на ГА 3100-Avant. При значеннях стандартних відхилень +3 співвідношення висот піків статерів і висот піків алелів досягало лише приблизно 4%.

Додаткові піки (+A, -A) і нетипові алелі (артефакти)

На останній стадії ампліфікації, засвідчили дослідження позаматричного нуклеотидного додатка $\pm A$, упродовж 10 хв спостерігали ефект роздвоєних піків алелів; за наступних 10 хв (у разі подовження останньої стадії до 20 хв) цей ефект зник, а висоти піків алелів на електрофореграмах стали вищими (рис. 5).

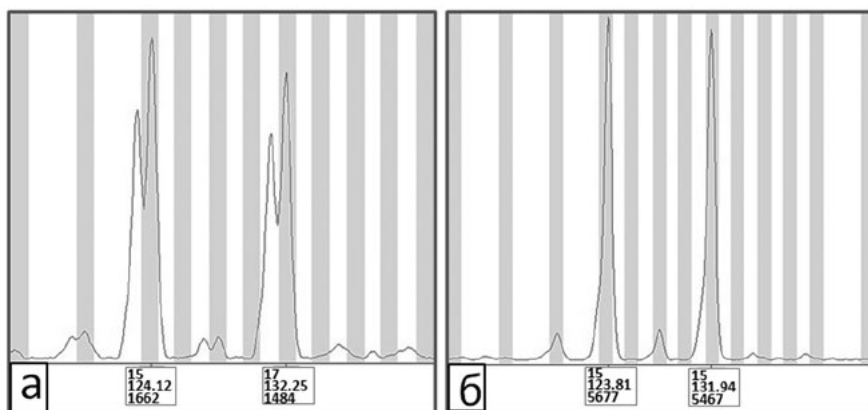


Рис. 5. Піки алелів на електрофореграмах на останній стадії ампліфікації упродовж 10 хв (а) та 20 хв (б)

Отже, остання стадія реакції ампліфікації з використанням набору реактивів Identifier® Plus має тривати 20 хв.

Вплив інгібіторів на реакцію ампліфікації

Результати досліджень засвідчили повноту ДНК-профілів у титрі інгібітора в разі його розведення у співвідношенні від 1:1 до 1:8. Водночас за розведення інгібітора у співвідношенні 1:8 показники висот піків алелів і гетерозиготного балансу суттєво відрізнялися від тих, що були в зразках ДНК без інгібіторів (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив інгібіторів на реакцію ампліфікації

7500 PCR-RealTime / QН				ГА АВ 3130				ГА 3100-Avant			
Титр ПЧ	Конц. ДНК, нг/мкл	Ст ДНК	Ст ІРС	ГБ, %	СВ, %	RFU	Алелі	ГБ, %	СВ, %	Висота алелів	Алелі
—	0,101	32,16	27,60	91,33	6,47	1054	27	90,45	7,41	511	27
1:1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:4	—	—	—	78,70	16,42	145	4	81,20	14,80	133	4
1:8	—	—	—	88,42	9,32	469	27	88,29	9,65	405	27
1:16	—	—	—	90,48	6,76	626	27	91,96	5,90	618	27
1:32	0,012	35,18	34,97	87,93	9,26	773	27	89,55	6,37	501	27
1:64	0,038	33,52	31,65	86,26	13,40	910	27	88,59	9,42	656	27
1:128	0,064	32,79	28,95	89,65	11,67	701	27	92,05	3,46	550	27

Примітка. QН – Quantifiler® Human; ПЧ – принтерне чорнило; Конц. – концентрація; Ст – показник граничного циклу; Ст ДНК – середнє значення Ст ДНК; Ст ІРС – середнє значення Ст ІРС; ГБ – гетерозиготний баланс; СВ – стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу; RFU – висоти піків алелів на електрофореграмах; алелі – кількість виявлених алелів.

Під час визначення стабільності системи 7500 PCR Real Time / Quantifiler Human (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017) було з'ясовано, що найбільша концентрація інгібіторів в ПЛР, за якої ампліфікується мінімальна порогова кількість продуктів реакції, відповідає розведенню інгібітора 1:32, удвічі більшому, за якого використання набору реактивів Identifiler® Plus ефективне.

Таким чином, використання набору реактивів Identifiler® Plus для реакції ампліфікації під час проведення фрагментного аналізу на ГА 3130 та ГА 3100-Avant є ефективним при розведенні інгібітора (принтерного чорнила) у співвідношенні мінімум 1:8.

Якість реакції ампліфікації при дослідженні деградованої ДНК

Під дією високої температури упродовж перших 10 хв кількість ДНК у зразках вища за контрольну (Dombrovskiy, Povkh, Petrychuk, & Romanchuk, 2017). Крім того, якість отриманих ДНК-профілів деградованої ДНК вища ніж ДНК-профілів зразків, які не піддавали деградації (табл. 5, рис. 6 і 7).

Таблиця 5

Результати дослідження деградованої ДНК

Параметри		ГА АВ 3130						ГА 3100-Avant					
		П'ятисекундні ін'єкції			Десятисекундні ін'єкції			П'ятисекундні ін'єкції			Десятисекундні ін'єкції		
Т, хв	Конц. ДНК, нг/р.	ГБ, %	СВ, %	Алелі	ГБ, %	СВ, %	Алелі	ГБ, %	СВ, %	Алелі	ГБ, %	СВ, %	Алелі
0	0,90	91,61	5,66	28/28	91,80	5,62	28/28	91,98	5,64	28/28	92,49	5,43	28/28
10	1,20	93,46	5,55	28/28	93,60	5,22	28/28	93,43	5,62	28/28	93,95	5,12	28/28
20	1,10	90,22	5,48	28/28	89,64	5,85	28/28	89,85	6,03	28/28	90,02	5,15	28/28
30	0,55	86,46	9,77	28/28	86,06	9,28	28/28	86,50	9,76	28/28	85,39	9,87	28/28
40	0,19	81,11	11,36	27/27	78,92	11,91	28/28	83,90	10,78	25/23	81,45	11,44	28/28
50	0,60	84,78	10,76	25/27	83,04	11,24	28/28	83,76	11,12	24/26	83,35	11,02	28/28
60	0,50	85,72	14,36	28/27	82,51	12,13	28/28	83,36	12,31	28/24	85,18	12,27	28/28
70	0,54	87,07	9,36	28, 20	84,66	11,30	28/28	85,58	9,75	28/25	85,24	11,75	28/28
80	0,83	87,37	9,94	28, 26	86,77	10,46	28/28	89,18	8,23	28/23	86,80	10,41	28/28
90	1,20	84,71	8,44	26, 22	72,68	16,18	26,27	80,52	10,83	19/17	80,28	15,19	26/27

Примітка. ГБ – гетерозиготний баланс; СВ – стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу; алелі – кількість виявлених алелів; нг/р. – нг/на реакцію.

Подальша дія температури упродовж 20 хв призводила до поступового зниження якості ДНК-профілів, що проявилось у зменшенні висоти піків алелів. При цьому гетерозиготний баланс не змінювався.

Витримування на водяній бані упродовж 30 хв призвело до зниження показників гетерозиготного балансу та його стандартних відхилень, удвічі зменшилася й середня висота піків алелів. Подальший вплив високої температури суттєво змінював стандартне відхилення показників гетерозиготного балансу.

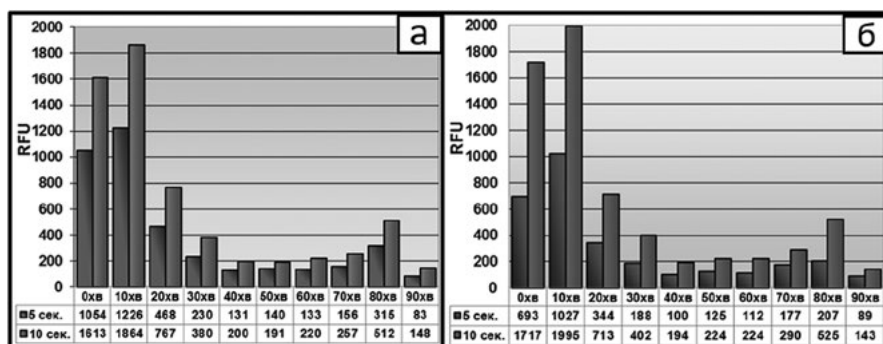


Рис. 6. Залежність висоти піків алелів від різних ступенів деградації ДНК при п'яти- та десятисекундних ін'єкціях: ГА АВ 3130 (а); ГА 3100-Avant (б)

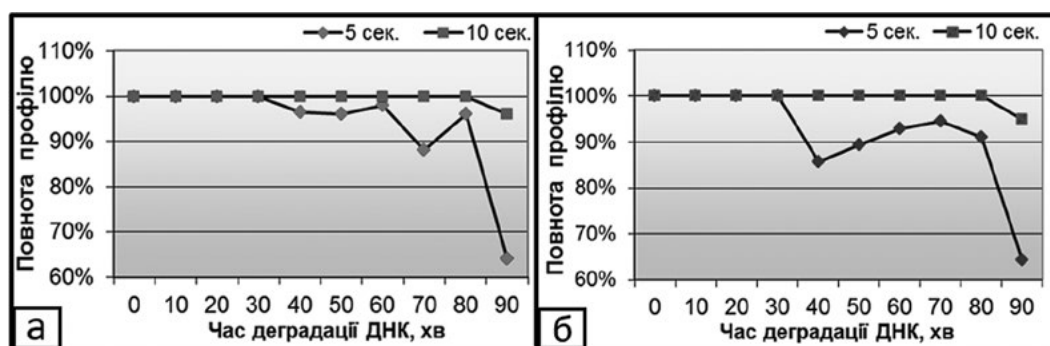


Рис. 7. Повнота ДНК-профілів за різних ступенів деградації ДНК: ГА АВ 3130 (а); ГА 3100-Avant (б)

Оцінка повноти ДНК-профілів засвідчила, що при п'ятисекундній ін'єкції неповні ДНК-профілі з'являлися за впливу температури від 40 до 90 хв, а при десятисекундній ін'єкції – від 90 хв.

Отже, під час дослідження деградованої ДНК фрагментним аналізом з використанням набору реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifiler® Plus на ГА АВ 3130 та ГА 3100-Avant ефективним є капілярний електрофорез при десятисекундній ін'єкції.

Достовірність результатів дослідження відповідно до стандартів ДНК NIST

Зважаючи на результати попередніх валідаційних досліджень системи 7500 PCR Real Time / Quantifiler Human (*GeneMapper ID*, 2005), було досліджено стандарти ДНК NIST 2391b № 1–5, 7, GM09947A, GM09948. Оскільки стандарти ДНК NIST 2391c є похідними стандартів ДНК NIST 2391b і вдосконаленими (*DNA Profiling*), стандарт NIST 2391b протестовано на ГА АВ 3130, а NIST 2391c – на ГА 3100-Avant. Результати досліджень, отримані на обох приладах, збіглися з показниками, зазначеними у свідоцтвах проведення аналізу стандартів ДНК NIST 2391b і ДНК NIST 2391c (*Certificate of Analysis Standard Reference Material® 2391b; 2391c*).

Отже, результати досліджень на ГА АВ 3130 та ГА 3100-Avant, отримані з використанням набору реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifiler® Plus, є достовірними.

ДНК-суміші з різними співвідношеннями концентрації ДНК

Під час дослідження сумішей ДНК у різних співвідношеннях визначено, що основну (домінуючу) та другорядну особу можна відокремити в сумішах ДНК зі співвідно-

шеннями 1:4 або 4:1 та 1:8 або 8:1. Але у співвідношенні 1:8 або 8:1 висота піків алелів другорядного постачальника наближалася до стохастичного порогового мінімуму, коли окремі алелі не виявлятимуться, що може призвести до їх випадіння. Крім того, висота піків статерів основного постачальника в деяких локусах була на одному рівні з висотами піків алелів другорядного постачальника, що може спричинити хибну інтерпретацію результатів.

Таким чином, сумішами ДНК, у яких можна відокремити основну (домінуючу) особу від другорядної, досліджуючи їх фрагментним аналізом на ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant із використанням набору реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifier® Plus, є суміші зі співвідношеннями ДНК 1:4 або 4:1.

Аналітичний та стахастичний порого

Дослідженням встановлено, що значення фонового шуму при фрагментному аналізі вдвічі перевищує його максимальний рівень, тобто 50 RFU (рис. 8).

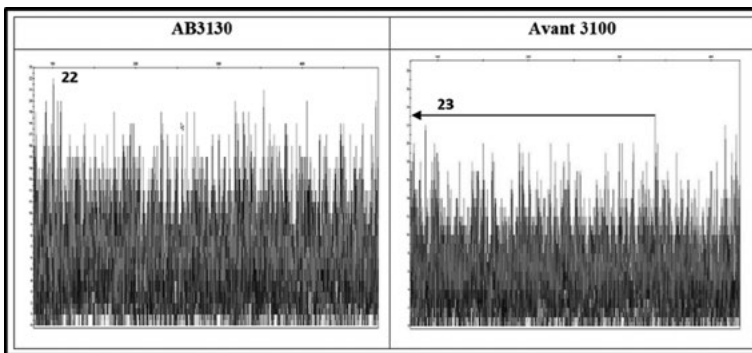


Рис. 8. Фоновий шум ГА під час фрагментного аналізу, де: АВ 3130 – ГА 3130; Avant 3100 – ГА 3100-Avant

До того ж засвідчено, що за висот піків, які є нижчими за 150 RFU, алелі можуть не виявлятися. Відповідно гомозиготну алель у такому разі вважати достовірною неможливо (табл. 6).

Таблиця 6

Результати досліджень стохастичного ефекту

Конц. ДНК (нг/р.)	П'ятисекундні ін'єкції			Десятисекундні ін'єкції		
	RFU	К-сть алелів	Повнота ДНК-профілів	RFU	К-сть алелів	Повнота ДНК-профілів
0,65	771	29, 29, 29	100 %	1562	29, 29, 29	100 %
0,21	400	29, 29, 29	100 %	793	29, 29, 29	100 %
0,11	154	29, 29, 29	100 %	411	29, 29, 29	100 %
0,038	92	26, 24, 28	90 %	212	29, 29, 29	100 %
0,013	84	17, 1, 0	21 %	89	18, 17, 0	40 %

Примітка. Конц. – концентрація; нг/р. – нг/на реакцію; RFU – висоти піків алелів на електрофореграмі.

Отже, інтерпретацію результатів фрагментного аналізу на ГА АВ 3130 і ГА 3100-Avant із використанням набору реактивів для проведення реакції ампліфікації Identifiler® Plus слід здійснювати за висоти піків алелів від 150 RFU.

Висновки. Застосування методу фрагментного аналізу STR-локусів із використанням набору реактивів Identifiler® Plus є цілком придатним та ефективним для встановлення генетичних ознак особи (трупа), а також біологічних слідів, у тому числі й за наявності інгібіторів. Виняток становлять дослідження деградованої ДНК, які можна використовувати для внутрішньої валідації в молекулярно-генетичних лабораторіях.

References

- ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer: User's Manual. (2010) / Applied Biosystems. Foster City, USA: Life Technologies Corporation, 340 p.
- AmpFLSTR® Identifiler® Plus (2015); PCR Amplification Kit: User Guide / Applied Biosystems. Carlsbad, USA: Life Technologies Corporation, 148 p.
- Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers: Getting Started Guide. (2010). Foster City, USA: Applied Biosystems, 196 p.
- Artifacts Identified Post-Developmental Validation: AmpFLSTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit. Technical note. ThermoFisher Scientific (2018). Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Technical-Notes/ampflstr-identifiler-plus-kit-artifacts-tech-note.pdf>.
- Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing, *J Forensic Sci* (Vol. 51(2)). P. 253–265. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.
- Certificate of Analysis Standard Reference Material® 2391b. PCR-based DNA profiling standard. Retrieved from <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archive/2391b.pdf>.
- Certificate of Analysis Standard Reference Material® 2391c. PCR-based DNA profiling standard. Retrieved from: <https://www.labmix24.com/files/info/10057.pdf>.
- Dayton, M., Koskinen, M. T., Tom, B. K., Mattila, A. M., Johnston, E., Halverson, J. ... Kanthaswamy, S. (2009). Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material, *Croat Med Journal* (Vol. 50 (3)), p. 268–285. doi: 10.3325/cmj.2009.50.268.
- DNA Profiling Standard Reference Materials. Retrieved from <https://www.nist.gov/programs-projects/dna-profiling-standard-reference-materials>.
- Dombrovskiy, I. V., Povkh, A. S., Petrychuk, S. V., & Romanchuk, S. M. (2017). Validatsiia metodu kilkisnoho ta yakisnoho vyznachennia DNK z vykorystanniam naboru reahentiv Quantifiler Human dlia polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii v realnomu chasi. *Kryminalistychnyi visnyk*. № 1 (27). S. 172–183.
- Fregeau, C. J., & Fourney, R. M. (1993). DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification, *Article in Bio Techniques* (Vol. 15 (1)), p. 100–119.
- Gapinski, A. (2015). *Internal Validation of the AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit and Comparison to Identifiler® for the Boston Police Department Crime Laboratory*. Retrieved from <http://www.marshall.edu/forensics/files/Gapinski-Allison-Final-Internship-Paper.pdf>. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01963.x.
- GeneMapper ID Software Version 3.2 for Human Identification Applications: Product Bulletin. (2005) / Applied Biosystems. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040259.pdf.
- Hate Crime Data Collection Guidelines And Training Manual. Version 2.0. (2015) / Criminal Justice Information Services (CJIS) Division Uniform Crime Reporting (UCR) Program. USA: Law Enforcement Support Section (LESS). Crime Statistics Management Unit (CSMU). 74 p.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA, *Nature* (Vol. 314, p. 67–73). DOI: 10.1038/314067a0.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific «fingerprints» of human DNA, *Nature*. (Vol. 316, p. 76–79).
- Pimenov, M. G., Kultin, A. Iu., & Kondrashov, S. A. (2001). *Nauchnye i prakticheskie aspekty kriminalisticheskogo DNK-analiza: ucheb. posobie*. M.: GU EKTc MVD Rossii, 144 s.
- Quantifiler Kits User's Manual: Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit. (2012) / Applied Biosystems. Foster City, USA: Life Technologies Corporation, 216 p.

- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*. Guidelines for the validation of probabilistic genotyping systems. (2015). Retrieved from http://media.wix.com/ugd/4344b0_22776006b67c4a32a5ffc04fe3b56515.pdf.
- Wang, D. Y., Chang, C. W., Lagace, R. E., Calandro, L. M., & Hennessy, L. K. (2012). Developmental validation of the AmpF Φ STR ® Identifiler ® Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance, *Journal of Forensic Sciences* (Vol. 57 (2), p. 453–465). doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01963.x.
- Wang, Y., Ju J., Carpenter, B. A., Atherton, J. M., Sensabaugh, G. F., & Mathies, R. A. (1995). Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers, *Analytical Chemistry* (Vol. 67 (7), p. 1197–1203). doi: 10.1021/ac00103a010.
- Zahalni vymohy do kompetentnosti vyprobuvalnykh ta kalibruvalnykh laboratorii*: DSTU ISO/IES 17025:2006. [Chynnyi vid 2006-12-27]. Kyiv: Derzhspozhyvstandart Ukrainy. 25 s. (Natsionalnyi standart Ukrainy).

Список використаних джерел

- ABI PRISM ® 3100 Genetic Analyzer: User's Manual*. (2010) / Applied Biosystems. Foster City, USA: Life Technologies Corporation, 340 p.
- AmpF Φ STR ® Identifiler ® Plus* (2015); PCR Amplification Kit: User Guide / Applied Biosystems. Carlsbad, USA: Life Technologies Corporation, 148 p.
- Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers: Getting Started Guide*. (2010). Foster City, USA: Applied Biosystems, 196 p.
- Artifacts Identified Post-Developmental Validation: AmpF Φ STR ™ Identifiler ™ Plus PCR Amplification Kit. Technical note*. ThermoFisher Scientific (2018). Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Technical-Notes/ampflstr-identifiler-plus-kit-artifacts-tech-note.pdf>.
- Butler, J. M. (2006). Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing, *J Forensic Sci* (Vol. 51(2), p. 253–265). doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.
- Certificate of Analysis Standard Reference Material ® 2391b. PCR-based DNA profiling standard*. Retrieved from <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archive/2391b.pdf>.
- Certificate of Analysis Standard Reference Material ® 2391c. PCR-based DNA profiling standard*. Retrieved from: <https://www.labmix24.com/files/info/10057.pdf>.
- Dayton, M., Koskinen, M. T., Tom, B. K., Mattila, A. M., Johnston, E., Halverson, J. ... Kanthaswamy, S. (2009). Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material, *Croat Med Journal* (Vol. 50 (3), p. 268–285). doi: 10.3325/cmj.2009.50.268.
- DNA Profiling Standard Reference Materials*. Retrieved from <https://www.nist.gov/programs-projects/dna-profiling-standard-reference-materials>.
- Домбровський, І. В., Повх, А. С., Петричук, С. В., & Романчук, С. М. (2017). Валідація методу кількісного та якісного визначення ДНК з використанням набору реагентів Quantifiler Human для полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. *Криміналістичний вісник*. № 1 (27). С. 172–183.
- Fregeau, C. J., & Fourney, R. M. (1993). DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: A sensitive and accurate approach to human identification, *Article in Bio Techniques* (Vol. 15 (1), p. 100–119).
- Gapinski, A. (2015). *Internal Validation of the AmpF Φ STR ® Identifiler ® Plus PCR Amplification Kit and Comparison to Identifiler ® for the Boston Police Department Crime Laboratory*. Retrieved from <http://www.marshall.edu/forensics/files/Gapinski-Allison-Final-Internship-Paper.pdf>. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01963.x.
- GeneMapper ID Software Version 3.2 for human identification applications*: Product Bulletin. (2005) / Applied Biosystems. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_040259.pdf.
- Hate Crime Data Collection Guidelines And Training Manual. Version 2.0*. (2015) / Criminal Justice Information Services (CJIS) Division Uniform Crime Reporting (UCR) Program. USA: Law Enforcement Support Section (LESS). Crime Statistics Management Unit (CSMU). 74 p.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA, *Nature* (Vol. 314, p. 67–73). doi: 10.1038/314067a0.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific «fingerprints» of human DNA, *Nature*. (Vol. 316, p. 76–79).
- Пименов, М. Г., Кульгин, А. Ю., & Кондрашов, С. А. (2001). *Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа*: учеб. пособие. М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 144 с.

- Quantifiler Kits User's Manual: Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit.* (2012) / Applied Biosystems. Foster City, USA: Life Technologies Corporation, 216 p.
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.* Guidelines for the validation of probabilistic genotyping systems. (2015). Retrieved from http://media.wix.com/ugd/4344b0_22776006b67c4a32a5ffc04fe3b56515.pdf.
- Wang, D. Y., Chang, C. W., Lagace, R. E., Calandro, L. M., & Hennessy, L. K. (2012). Developmental validation of the AmpFℓSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit: an established multiplex assay with improved performance, *Journal of Forensic Sciences* (Vol. 57 (2), p. 453–465). doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01963.x.
- Wang, Y., Ju J., Carpenter, B. A., Atherton, J. M., Sensabaugh, G. F., & Mathies, R. A. (1995). Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers, *Analytical Chemistry* (Vol. 67 (7), p. 1197–1203). doi: 10.1021/ac00103a010.
- Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій: ДСТУ ISO/IEC 17025:2006.* [Чинний від 2006-12-27]. Київ: Держспоживстандарт України. 25 с. (Національний стандарт України).

Стаття надійшла до редакції 31.01.2019