

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Біологічний факультет
Кафедра генетики та рослинних ресурсів**

**Кваліфікаційна робота
магістра**

на тему: **СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПРОФІЛЮ ЛЮДИНИ ІЗ
ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

Виконав: студент 2 курсу, групи 8.0912-б
спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Ведмеденко В.О.

Керівник доцент, к.б.н. Войтович О.М

Рецензент зав.каф., д.б.н., проф. Лях В.О.

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

Біологічний факультет
Кафедра генетики та рослинних ресурсів
Освітньо-кваліфікаційний рівень магістр
Напрямок підготовки 091 Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Зав. кафедрою В.О. Лях

«___» _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

1. Тема роботи Створення генетичного профілю людини із використанням методу полімеразної ланцюгової реакції Creating a Genetic Profile of a Person Using the Polymerase Chain Reaction Method

керівник роботи Войтович Олена Миколаївна, к.б.н., доцент

затверджена наказом вищого навчального закладу від «01» травня 2023 року № 644-с

2. Строк подання студентом роботи грудень 2023 року

3. Вихідні дані до роботи _

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) : 1) виділення ДНК з клітин букального епітелію; 2) визначення концентрації і стану отриманої ДНК в розчині за допомогою методу ПЛР у реальному часі; 3) встановлення необхідної мінімальної кількості клітин для отримання генетичного профілю з повним набором локусів.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) Рисунки 1.1,1.2, 1.3, 1.4, 2.1; Таблиці 2.1, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5; Додаток А.1, А.2, А.3, Б.1, Б.2, Б.3, В.1, В.2, В.3, Г.1, Г.2, Г.3, Д.1, Д.2, Д.3, Е.1, Е.2, Е.3, Є.1, Є.2, Є.3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
4	Гороховський Є.Ю., доцент, к.б.н.		

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів дипломної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1	Огляд літературних джерел. Написання відповідного розділу роботи.	квітень 2023	Виконано
2	Вивчення, засвоєння методик дослідження. Написання відповідного розділу роботи.	травень 2023	Виконано
3	Засвоєння правил техніки безпеки під час виконання експериментальної частини. Написання відповідного розділу роботи.	травень-червень 2023	Виконано
4	Проведення експериментальних досліджень. Оформлення результатів експерименту.	липень-вересень 2023	Виконано
5	Оформлення кваліфікаційної роботи. Передзахист роботи.	жовтень-листопад 2023	Виконано
6	Рецензування кваліфікаційної роботи.	листопад 2023	Виконано
7	Захист кваліфікаційної роботи.	грудень 2023	Виконано

Студент _____ В.О. ВедмеденкоКерівник роботи _____ О.М. ВойтовичНормоконтроль пройдено _____ Є.Ю.Гороховський

РЕФЕРАТ

У роботі 90 сторінок, 5 рисунків, 6 таблиць, 21 додаток, було використано 51 літературних джерел, із них 29 іноземною мовою.

Об'єктом дослідження є букальний епітелій.

Предметом дослідження є ретельний аналіз та розгляд ключових аспектів виділення ДНК.

Методи досліджень: капілярний електрофорез, метод полімеразної ланцюгової реакції, гематологічний аналіз, електронна мікроскопія, екстракція ДНК (виділення ДНК).

Метою кваліфікаційної роботи є створення генетичного профілю людини за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з метою подальшого розширення розуміння та можливостей генетичного аналізу, включаючи ідентифікацію генетичних маркерів та їх характеристик.

Теоретично та експериментально визначено, що трудомісткий процес визначення генетичного профілю з методом ПЛР є ключовим етапом у сучасних генетичних дослідженнях та застосування його, як у медицині, судової генетики і інших. Ці методи є дуже важливими у криміналістиці, так як дозволяють зробити докладний аналіз генетичних варіацій, створити генетичний профіль особи для ідентифікації та вивчення родоводу.

ГЕНЕТИЧНИЙ ПРОФІЛЬ, ДНК-ПРОФІЛЮВАННЯ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ГЕНЕТИЧНА АУТЕНТИФІКАЦІЯ, ГЕНОМНІ МАРКЕРИ, ГЕНЕТИЧНА СХЕМА

ABSTRACT

In this work 90 pages, 5 figures, 6 tables, 21 appendices, were used 51 literature sources, including 29 in a foreign language.

The object of the research is the buccal epithelium.

The subject of the study is a thorough analysis and consideration of key aspects of DNA extraction.

Research methods capillary electrophoresis, polymerase method chain reaction, hematological analysis, electron microscopy, DNA extraction (isolation DNA).

The purpose of the qualification work is to create a genetic profile of a person using the metho of polymerase chain reaction (PCR) with the aim of further expanding the understanding and capabilities of genetic analysis, including the identification of genetic markers and their characteristics.

Theoretically and experimentally determined: that the tome-consuming process of determining the genetic profile using the PCR method is a key stage in modern genetic research and application as in medicine, forensic genetics and others. These methods are very important in forensics, as they allow for a detailed analysis of genetic variations, to create a genetic profile of a person for identification and studying the pedigree.

GENETIC PROFILE, POLYMERASE CHAIN REACTION, GENETIC AUTHENTICATION, GENOMIC MARKERS, GENETIC SCHEME

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Основні поняття в генетиці та полімеразній ланцюговій реакції.....	11
1.2 Історія розвитку ПЛР та його застосування в генетичних дослідженнях .	13
1.3 Принципи функціонування ПЛР	23
1.4 Застосування генетичного профілю	26
1.1.4 Визначення основних параметрів генетичного профілю	30
1.2.4 Використання генетичного профілю в судовій медицині.....	31
1.3.4. Генетичний профіль у генеалогічних та популяційних дослідженнях .	35
1.4.4 Етичні аспекти використання генетичного профілю	37
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1 Вибір об'єкта дослідження та вибір зразків ДНК	39
2.2 Підготовка зразків для ПЛР	39
2.3 Проведення ПЛР та ампліфікація ДНК.....	40
3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	43
3.1 Підготовка і проведення ПЛР.....	43
3.2 Аналіз отриманих результатів	48
4 ОХОРОНА ПРАЦІ	56
ВИСНОВКИ	62
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	63
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ	64
ДОДАТКИ	70
Додаток А.1	70
Додаток А.2	71
Додаток А.3	72
Додаток Б.1	73

Додаток Б.2	74
Додаток Б.3	75
Додаток В.1	76
Додаток В.2.....	77
Додаток В.3.....	78
Додаток Г.1	79
Додаток Г.2.....	80
Додаток Г.3.....	81
Додаток Д.1.....	82
Додаток Д.2.....	83
Додаток Д.3.....	84
Додаток Е.1	85
Додаток Е.2.....	86
Додаток Е.3	87
Додаток Є.1.....	88
Додаток Є.2.....	89
Додаток Є.3.....	90

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ
І ТЕРМІНІВ

ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція

ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота

ВІЛ-інфекція – вірус імунодефіциту людини

ЗТ-ПЛР – ПЛР зі зворотною транскрипцією

РЧ-ПЛР – Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

мРНК – Матрична рибонуклеїнова кислота

NGS – Секвенування нового покоління (англ. nextgenerationsequencing)

LAMP – Петльова ізотермічна ампліфікація loop-mediated isothermal amplification

COVID – COronaVirus Disease

SARS–Cov–2 – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

FDA – Управління продовольства та медикаментів, УПМ (англ. Food and Drug Administration)

ФЕП – Фотоелектричні помножувачі

ПЗЗ – Прилади з зарядовими зв'язком

ПНК – Пептидні нуклеїнові кислоти

ВСТУП

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – це потужний метод ампліфікації фрагментів ДНК, який дозволяє копіювати та збільшувати кількість конкретних генетичних послідовностей. Цей метод відкрив широкі можливості для дослідження генетичного матеріалу, створення генетичних профілів і визначення індивідуальних генетичних характеристик людини.

Актуальність цієї теми полягає в тому, що генетичні дані можуть бути використані в різних сферах, включаючи медицину, судову експертизу, генеалогію, а також дослідження еволюційних та популяційних процесів. Створення генетичного профілю людини за допомогою ПЛР стає важливим інструментом для ідентифікації осіб, вивчення спадкових хвороб та спадкового ризику, а також встановлення генеалогічних зв'язків.

Основними перевагами використання саме методу мультилокусного мікросателітного ПЛР у визначеному напрямку є його точність і швидкість; глибоке покриття генома, ампліфікація генетичних регіонів з високою ефективністю; ефективна ідентифікація змішаних і деградованих зразків; зменшення витрат на реактиви та високоефективна робота при високій специфічності, тобто впровадження мультиплексної ампліфікації одночасно підсилюючи генетичні маркери; широкий спектр застосування генетичного профілювання у медицині та криміналістиці.

Ця дипломна робота присвячена детальному вивченню методу ПЛР та його застосуванню для створення генетичних профілів людини.

Основною метою роботи є оцінка ефективності та можливостей використання методу мультилокусної ПЛР для створення і аналізу генетичних профілів.

Для досягнення поставленої мети було сформовано та виконано такі завдання:

- 1) виділення ДНК з клітин букального епітелію;

- 2) визначення концентрації і стану отриманої ДНК в розчині за допомогою методу ПЛР у реальному часі;
- 3) встановлення необхідної мінімальної кількості клітин для отримання генетичного профілю з повним набором локусів;
- 4) скласти генетичний профіль людини за 26 мікросателітними локусами.

Об'єктом дослідження є букальний епітелій.

Предметом дослідження є ДНК.

Методи дослідження – визначення кількості клітин, виділення ДНК, мультилокусна ПЛР в реальному часі, капілярний електрофорез.

Наукова новизна: встановлена мінімальна кількість клітин, яка необхідна для отримання генетичного профілю та ідентифікації особи.

Апробація роботи: результати роботи представлені на XVI університетській науково-практичній конференції студентів, аспірантів, докторантів і молодих вчених «МОЛОДА НАУКА-2023» (тези – МОЖЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ПЛР У ГЕНЕТИЧНОМУ ПРОФІЛЮВАННІ)

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Основні поняття в генетиці та полімеразній ланцюговій реакції

Основні поняття генетики, терміни:

Ген – основна одиниця спадковості, ділянка молекули ДНК, яка кодує інформацію про первинну структуру білка або РНК.

Алелі – альтернативні стани одного і того ж гена, що визначають альтернативні ознаки (кожен ген може мати кілька форм - алелів). Алелі гена знаходяться в одному місці (локусі) на гомологічних хромосомах.

Домінантний алель - це алель, який завжди виражений у присутності інших алелів → А.

Рецесивний алель - це алель, який не виражений → а.

Локус - це положення гена на хромосомі.

Домінування - явище, при якому експресія одного алеля пригнічується іншим алелем (алель, що визначає карий колір очей, домінує над блакитним алелем).

Кодомінування - участь обох алелів гена у визначенні певних станів гетерозиготної ознаки (успадкування груп крові людини → I A і B - IV групи крові).

Гомозигота - алелі гена в гомологічних хромосомах ідентичні → (AA, aa).

Гетерозигота - алелі гена в гомологічних хромосомах різні → Aa; один і той самий організм може бути гомозиготним за одними генами і гетерозиготним за іншими.

Генотип - набір генів в організмі. Фенотип - сукупність усіх ознак і властивостей організму, які є результатом взаємодії генотипу з навколишнім середовищем.

Генофонд - сукупність генів особин популяції або виду [1].

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - це метод молекулярної біології, який підсилює одну копію фрагмента ДНК на кілька порядків для створення тисяч або мільйонів копій певної послідовності ДНК. ПЛР використовується в широкому спектрі застосувань, включаючи клонування ДНК для секвенування, картографування генів, дактилоскопію ДНК та діагностику генетичних захворювань.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовує термостабільні ферменти ДНК-полімерази і специфічні праймери для багаторазового копіювання певних ділянок ДНК протягом температурного циклу, кількість специфічних фрагментів ДНК патогенів багаторазово збільшується, а метод ПЛР володіє високою аналітичною чутливістю і специфічністю. Ще однією перевагою є швидкість тестування.

Основні етапи ПЛР:

1. Виділення ДНК

Клінічні зразки обробляють лізатами в присутності частинок кремнеземного адсорбенту. При цьому вивільняється ДНК, яка зв'язується з частинками адсорбенту. Інші компоненти розчиненого клінічного матеріалу залишаються в розчині і видаляються центрифугуванням і подальшим промиванням. Коли до адсорбента додають ДНК-елюент, ДНК переноситься з поверхні кремнезему в розчин і відокремлюється від частинок адсорбенту центрифугуванням. Ця процедура дозволяє отримувати високоочищені препарати ДНК, що не містять інгібіторів реакцій ампліфікації, забезпечуючи високу аналітичну чутливість для ПЛР-тестування.

2. Ампліфікація ДНК

Процес багаторазового копіювання певної ділянки ДНК, зв'язаної праймером. Для ампліфікації необхідна низка компонентів реакційної суміші та обладнання, яке може точно досягти і підтримувати певну температуру протягом короткого часу. Склад реакційної суміші:

1) ДНК-матриця, що містить ту ділянку ДНК, який потрібно ампліфікувати;

- 2) праймери–короткі синтетичні олігонуклеотиди, комплементарні протилежним кінцях різних ланцюгів необхідного фрагмента ДНК;
- 3) термостабільная ДНК - полімераза – фермент, що каталізує реакцію полімеризації ДНК;
- 4) дезоксирибонуклеозидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- 5) буферний розчин, що забезпечує необхідні умови реакції.

Якщо в реакційній суміші присутня шукана ДНК, то відбувається ампліфікація специфічної ділянки ДНК, яка складається з:

- 1) денатурація;
- 2) відпал;
- 3) елонгація.

В процесі ампліфікації відбувається багаторазове збільшення кількості специфічних фрагментів ДНК. При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовольняє заданим умовам, і тільки в тому випадку, якщо він присутній в досліджуваному зразку.

3. Детекція

Детекцію проводять за допомогою спеціалізованого приладу – детектора ALA-1/4 та програмного забезпечення. Флуориметр дозволяє реєструвати флуоресцентний сигнал зразків безпосередньо після проведення ПЛР через стінку пробірок, що зводить до мінімуму ризик контамінації лабораторії продуктами ПЛР [2].

1.2 Історія розвитку ПЛР та його застосування в генетичних дослідженнях

Основний принцип ПЛР полягає в багаторазовому нагріванні та охолодженні зразка ДНК, що спричиняє денатурацію (поділ на одинарні ланцюги) та відпалу (рекомбінацію в подвійні ланцюги). Під час кожного

циклу кількість молекул ДНК подвоюється. Наприклад, після 30 циклів залишиться понад мільярд копій вихідної молекули ДНК.

Хоча ПЛР є дуже потужним методом, слід також зазначити, що він не ідеальний: ПЛР вносить помилки в послідовності ДНК та інші джерела, такі як бактерії та грибки. Тому для отримання точних результатів важливо використовувати ПЛР у поєднанні з іншими методами, такими як секвенування ДНК.

ПЛР була вперше розроблена Керрі Маріс в 1983 році і отримала Нобелівську премію з хімії в 1993 році, і ПЛР мала великий вплив у багатьох галузях, таких як медицина, криміналістика та сільськогосподарські науки.

У медицині ПЛР використовується для діагностики генетичних захворювань, виявлення інфекційних агентів та відстеження поширення захворювань. Наприклад, ПЛР використовується для діагностики ВІЛ-інфекції шляхом визначення наявності вірусного генетичного матеріалу; ПЛР також використовується для ідентифікації бактерій та вірусів, що викликають харчові отруєння, таких як сальмонела та кишкова паличка.

У криміналістиці ПЛР використовується для ідентифікації людей шляхом порівняння профілів ДНК. Наприклад, ПЛР використовується для ідентифікації жертв злочинів та зіставлення зразків ДНК, взятих з місць злочинів, із зразками ДНК підозрюваних, тоді як ПЛР також використовується для встановлення батьківства та ідентифікації останків у масових похованнях.

У сільському господарстві ПЛР використовується для підвищення врожайності та захисту сільськогосподарських культур від шкідників і хвороб. Наприклад, ПЛР використовується для ідентифікації генів, відповідальних за стійкість сільськогосподарських культур до гербіцидів та інсектицидів, а ПЛР також використовується для ідентифікації генів, що забезпечують високу врожайність сільськогосподарських культур.



Рисунок 1.1 – Прибор для визначення ПЛР [3]

Оскільки технологія продовжує вдосконалюватися, ПЛР буде використовуватися для діагностики та лікування ширшого спектру захворювань, виявлення та відстеження ширшого спектру патогенних мікроорганізмів, а також для підвищення безпеки та надійності поставок продуктів харчування [3].

Новаторська розробка [4] призвела до останніх широких досліджень ПЛР-криміналістики та сприяла відтворенню, де потрібен аналіз генетичного матеріалу однієї або кількох клітин.

У 1986 році, який є першою моделлю, яка вбудовує контролер програмного циклу в блок термоциклу; (В) ПЛР у просторовій області; (С) ПЛР у часовій області; (D) Використання специфічного для прив'язки до аллеля і помічені праймери для колориметричного виявлення мутацій у гені НВВ; (Е) Одне з перших застосувань мультиплексної ПЛР, виявлення делецій у гені DMD у пацієнтів, уражених м'язовою дистрофією Дюшена; (F) Є центральною версією мультиплексної ПЛР із флуоресцентними міченими праймерами та розділенням ампліконів із застосуванням капілярного електрофорезу, яка зараз використовується в рутинному судово-медичному

аналізі; (G) Використання ПЛР для ампліфікації локусів кількох алельних мінісателітів, сріблення ампліконів у поліакриламідному гелі та порівняння їх довжини з маркерами алелей.

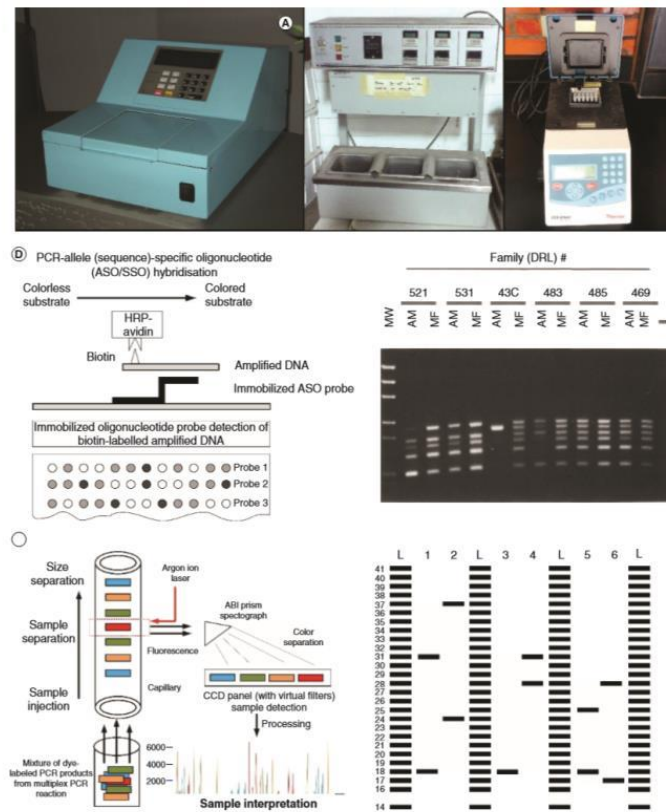


Рисунок 1.2 – Розробка системи ПЛР та її додатків: (А) Прототип термоциклу ПЛР, розроблений Cetus Corporation [4]

ПЛР увійшла в сферу судової медицини, коли дослідники успішно продемонстрували мультиплексування шести високополіморфних мінісупутникових локусів в одній ПЛР-пробірці [5]. Цей успіх був досягнутий завдяки високій відтворюваності результатів, отриманих з нанограм людської ДНК. Подальше вдосконалення цих принципів призвело до впровадження множинного мікросателітного аналізу, фарбування ампліконів срібла в поліакриламідних гелях та схеми порівняння їх довжини з алельними маркерами (рис.1.3) [6]. Амплікон з флуоресцентною міткою з використанням капілярного електрофорезу. Ця розробка дозволила вченим працювати з меншими ампліконами та аналізувати матеріали з високим

ступенем розкладання [7]. Ця методологія в даний час являє собою основний робочий процес інституту судової експертизи (рис. 1.2) [8].

З 1993 року розробляється метод моніторингу динаміки в режимі реального часу [9], цей метод називається кількісним (QPCR). Включення зворотної транскрипції (RT) в якості першого кроку при перенесенні термічних циклів дозволило використовувати метод дослідження МРНК (RT-PLRaboqRT-PCR). Це вдосконалення базового методу з використанням некарбонізованого стандарту кількості аналізованих нуклеїнових кислот [10]. На сьогоднішній день існує список основних систем: pcrzkintsev з точками, kplrtatsifvaplr (рис. 1.4) [11]. Однак існує безліч інших варіацій базового методу ПЛР, однією з яких є Мостова ПЛР (рис. 1.2) [12].

Незважаючи на великий діагностичний потенціал ПЛР, успіх її практичного застосування багато в чому залежить від якості зразка, що містить нуклеїнові кислоти для ампліфікації. Охарактеризовано спектр різних інгібіторів ПЛР, що ускладнює роботу з реальними зразками з хибнонегативними результатами та високими межами виявлення [13]. Були розроблені процедури, які призводять до належного очищення зразків, і були розроблені ДНК-полімерази, стійкі до інгібіторів. Повідомлялося, що DPCR є більш стійким до присутності інгібіторів. Іншою проблемою є успішна ПЛР-ампліфікація Hz-багатих послідовностей ДНК. Це ускладнюється утворенням вторинної структури, яка запобігає повній денатурації та відпалу праймера, але для вирішення цієї проблеми було розроблено кілька методів [14]. Мініатюризація пристроїв для ПЛР повинна бути вирішена аналітично заздалегідь, щоб досягти чутливості, порівнянної з відомими лабораторіями. Це висуває на перший план ще одну проблему, яку потрібно вирішити. Оскільки невеликі пристрої працюють з невеликими обсягами проб, кожна реальна біологічна проба повинна бути ефективно відокремлена і попередньо концентрована перед аналізом за допомогою таких приладів.

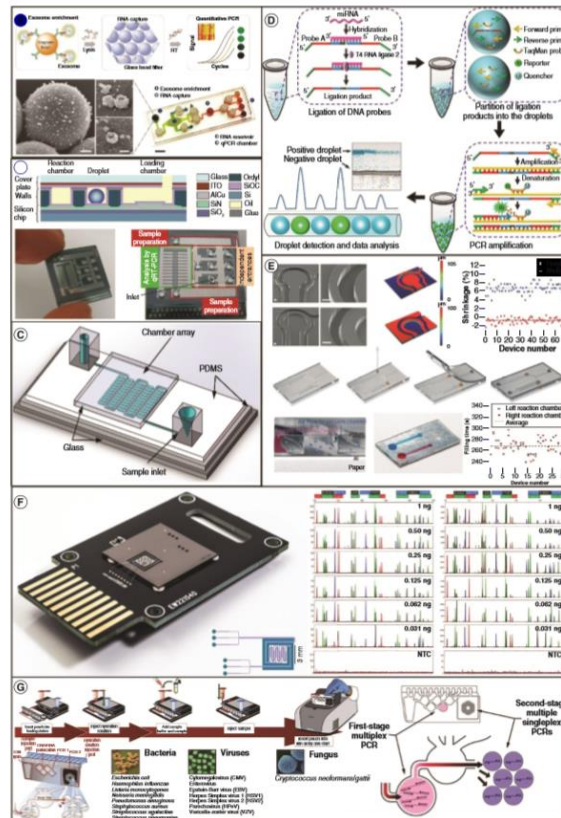


Рисунок 1.3 – Застосування мікрорідин у масовопаралельних і ручних системах догляду: (А) Інтегрована платформа ПЛР зворотної транскрипції в режимі реального часу на основі чіпа для аналізу геймової імуномагнітної екзосомальної РНК; (В) Кількісна ПЛР на основі крапель для очищення одноклітинної РНК та аналізу генної експресії; (С) Чіп цифрова РТ-ПЛР на основі абсолютної кількісної оцінки мРНК в окремих клітинах; (D) ДПЛР на основі крапель для кількісного аналізу мікроРНК; (Е) Система LAMP на основі паперу, виготовлена за допомогою полідиметилсилоксану для молекулярної діагностики; (F) Криміналістика, профілі ДНК на чіпі; (G) BioFire, виявлення бактерій і вірусів на чіпі [4]

Комерціалізація ПЛР : є два аспекти комерціалізації, які зробили рчаgold стандартом молекулярної діагностики. Одним з них є розробка автоматизованих інструментів для заміни ручних процедур, а іншим - Набір реагентів, які підвищують специфічність ПЛР за рахунок усунення перехресної контамінації та інгібування, скорочення часу реакції і збільшення багаторазового обсягу.

Існує кілька способів, в яких ПЛР відіграє важливу роль, наприклад, NGS, і в найближчому майбутньому ця роль буде зростати. Кріонічні пристрої також можуть виконувати ПЛР для аналізу імуномагнітної екзосомальної РНК (рис. 1.4). Найближчим часом ще одним важливим застосуванням мікрофлюїдики буде крапельна ПЛР для очищення клітинної мРНК та аналізу експресії генів (рис. 1.4). В даний час емульсійна ПЛР (рис. 1.3) дозволяє паралельне секвенування всіх молекул РНК або ДНК, що належать до однієї клітини у більшій популяції клітин. Системи ПЛР на паперовій основі та LAMP також користуються великим попитом для молекулярної діагностики (рис. 1.4).

Судово-медичний аналіз стане звичайною справою на місцях злочинів завдяки профілюванню ДНК на чіпах [15]. Системи виявлення, такі як BioFire для виявлення бактерій та вірусів, уже доступні в продаж.

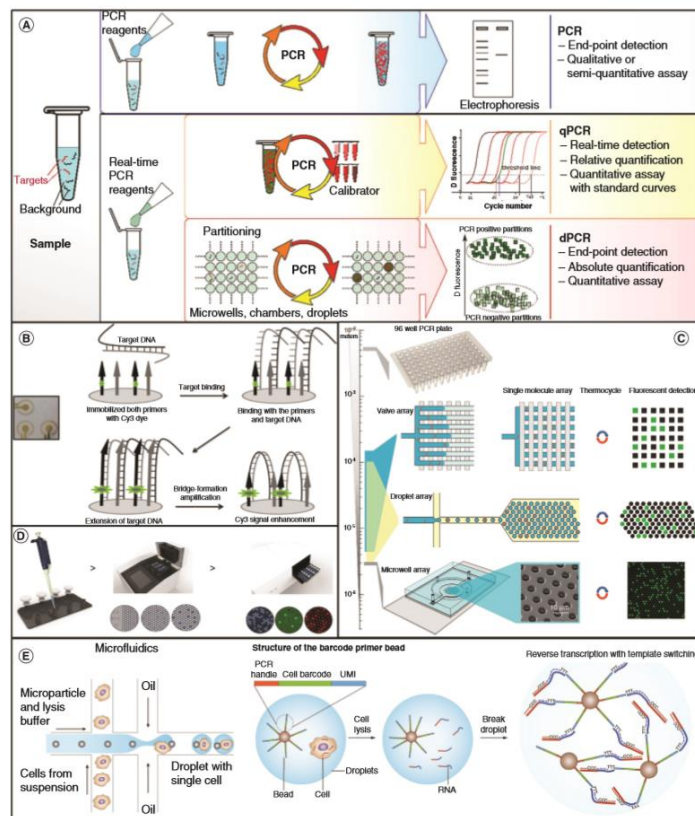


Рисунок 1.4 – Поточні приклади комерційно доступних методів: кількісна ПЛР, цифрова ПЛР на основі крапель, кристалічна цифрова ПЛР

(cdPCR), ПЛР, мостова ПЛР для наступних поколінь секвенування та секвенуванням РНК з окремих клітин із використанням мікрорідин; (А) Порівняння ПЛР кінцевої точки, qPCR та ddPCR; (В) Схематичне зображення принципу ампліфікації ДНК твердофазного містка; (С) Різні методи розщеплення зразків; (D) Кристалографічна ПЛР–утворення краплинних кристалів; (Е) Генерація бібліотеки на основі ПЛР і крапель для секвенування одноклітинної РНК. ddPCR: цифрова ПЛР на основі крапель; qPCR: кількісна ПЛР [4]

Згідно з авторами [16] розроблені та комерціалізовані додаткові системи на основі мікрофлюїдної ПЛР, оскільки мініатюризація ПЛР прогресує зробкою нових систем, що поєднують підготовку зразків і qPCR, рухаючись до дійсно портативних систем реагування на зразки для застосування в точках доступу до інформації (POC). Пандемія COVID прискорила цей розвиток і спричинила бум систем POC, перетворивши існуючі інструменти, такі як IDNO наоснові LAMP, спочатку розроблений для грипу, в інструмент для діагностики SARS-CoV-2 шляхом зміни праймерів.

Станом на 26.05.2020 FDA США затвердила 81 набір та систему в рамках "дозволу на екстрене використання", більшість з яких базуються на молекулярній біології, як правило, використовуючи RT-PCR в режимі реального часу, як правило, використовуючи RT-PCR в режимі реального часу. Оскільки цей метод успішно застосовується в різних областях біології, можливий подальший розвиток методів виявлення та розрізнення продуктів ампліфікації на основі Csis.

Діагностична система в кінцевому підсумку може бути об'єднана з "Інтернетом речей", як було продемонстровано раніше на прикладі ПЛР. Ця нова система може працювати автономно або на базі Android-смартфона. Її перевага полягає в тому, що камерою можна керувати як зовні, так і всередині, а також вона може взаємодіяти з контролерами температури і

освітлення через Bluetooth. Після отримання зображень система Android може обробити їх і передати в центр управління по бездротовій мережі.

Інші методи реплікації ДНК, такі як LAMP та ампліфікація рекомбінантною полімеразою, є більш енергоефективними, ніж ПЛР. Портативні системи ПЛР також використовуються для клінічної діагностики [17], судово-медичної експертизи та екологічних досліджень, щоб уникнути тривалого транспортування зразків до великих установ, де існує ризик деградації зразків та швидкого завершення робіт [18].

Медичні застосування полімеразної ланцюгової реакції включають:

1) інфекційні захворювання; ПЛР є золотим стандартом для швидких та високоспецифічних методів діагностики інфекційних захворювань, включаючи бактеріальні та вірусні захворювання [19]. Він також може ідентифікувати бактерії, які важко культивувати і повільно ростуть, такі як мікобактерії туберкульозу й аеробні бактерії, і вчені можуть використовувати цей метод для ідентифікації вірусів з культур тканин.

ПЛР є найбільш прийнятний та ефективний метод діагностики [20]. Цей метод може виявити лише один вірусний ген у ДНК більш ніж 50 000 клітин-хазяїв. За допомогою цього методу можна виявити інфекцію вірусу імунодефіциту людини на ранній стадії, протестувати донорську кров безпосередньо на наявність вірусу імунодефіциту людини, а новонароджених - на наявність вірусу ВІЛ одразу після народження. Як відомо, нещодавно всі країни світу пережили спалах гострого респіраторного синдрому, викликаного COV-2 (SARSCO₂), а полімеразна ланцюгова реакція є найбільш чутливим і специфічним тестом для діагностики цього захворювання. Збудників деяких захворювань, таких як туберкульоз, важко виявити в зразках пацієнта, які повільно ростуть в лабораторії (час подвоєння для туберкульозу становить 18 годин, а результати культурального дослідження займають від чотирьох до шести тижнів), може виявити як невелику кількість мертвих, так і життєздатних бактерій у простих зразках. Чутливість ПЛР в діагностиці туберкульозу коливається в межах 55-90%, специфічність - 99%.

Кашлюк (коклюш) та інші захворювання, викликані бактеріями *Bordetellapertussis*. Ці бактерії викликають серйозні гострі респіраторні інфекції, які можуть інфікувати широкий спектр тварин і людей та призводити до смерті у маленьких дітей. *B. pertussis* виробляє білок, що складається з двох частин (активної та зв'язуючої субодиниць), і цей токсин перешкоджає транспортуванню лімфоцитів до селезінки та лімфатичних вузлів, викликаючи лімфопенію.

ПЛР-найкращий спосіб виявлення токсинів гена коклюшу. Якщо порівнювати полімеразну ланцюгову реакцію з культуральним методом, то вона більш чутлива, специфічна, швидше і простіше, ніж культуральний метод [21]. Сибірська виразка є джерелом зброї (біотероризм), що використовується як джерело зброї (біотероризм), оскільки вона викликається *BacillusAnthracis*, великою грампозитивною спороутворюючою паличкою, і виробляє 2 кумулятивні екзотоксини (фактор набряку та летальний фактор). Сибірська виразка поширена серед тварин, але рідко вражає людей. У людей сибірська виразка має 3 клінічні форми: шкірну, легеневу і шлунково-кишкову.

ПЛР може бути використана для діагностики вісцерального лейшманіозу (кала-Азара), що викликається лейшманіозом, з високою точністю. Цей тип лейшманіозу є найсерйознішим видом лейшманіозу, і якщо його не лікувати, смертність становитиме понад 90%.

Огляд застосування: вкладена ПЛР, поряд з ДНК-дактилоскопією в судово-медичних і генетичних дослідженнях, є відмінним інструментом для багатьох генетичних лабораторій і дослідницьких центрів [22].

1.3 Принципи функціонування ПЛР

Це може бути усереднено за обсягом і частотою реакції. Ця комбінація називається сенсорним підсилювачем.

Оптична частина детектуючого підсилювача. Спектральні властивості барвників та оптичних систем. В даний час в ПЛР-тест - системах реального часу використовуються флуоресцентні барвники зі спектрами поглинання і випускання у всій видимій області, а також в "ближній" УФ-і ІЧ-областях. Оскільки більшість завдань вимагають одночасного використання декількох каналів вимірювання флуоресценції, важливо вибрати правильну комбінацію флуоресцентних барвників з точки зору спектральних характеристик.

Схема світлофільтрації і перенесення світла. Через відносно низьку концентрацію флуоресцентних барвників в реакційній суміші сигнал флуоресценції становить лише малу частину інтенсивності збудливого світла. Ще менше світла відбивається від стінок трубок і колодязів, досягаючи каналу виявлення підсилювача. У всіх пристроях безперервного виробництва завдання блокування збудливого світла (щоб він не потрапляв на детектор пристрою) вирішується за допомогою оптичного інтерференційного фільтра.

Перший фільтр розміщується між джерелом збудження і реакційною трубкою для перемішування. Він обмежує спектр збудження, блокуючи проходження довжин хвиль, близьких до області випромінювання (цей фільтр недоступний при використанні лазерного джерела). 2-й фільтр розміщується між трубкою і детектором. Він не пропускає відбитий збудливий світло і виключає "нецільові" довжини хвиль.

Оптичні блоки сучасних детекторних підсилювачів використовують різні джерела світла (в залежності від принципу роботи), зокрема лазери, лампи і світлодіоди. Кожен тип джерела світла має свої переваги і недоліки і, відповідно, використовується в світлових схемах різного компонування.

Фотоприймачі включають фотоелектронні множники (ФЕР), фотодіоди та пристрої із зарядним зв'язком (ссд). Оптико-електронні перетворювачі і сенсорні підсилювачі характеризуються низьким світловим потоком і обмеженим часом вимірювання (особливо при мультиплексній ПЛР).

Усі сучасні системи, які безпосередньо виявляють накопичення продуктів ПЛР у реакції, базуються на вимірюванні флуоресценції реакційної суміші. Крім того, системи виявлення ДНК сконструйовані таким чином, що інтенсивність флуоресценції пропорційна кількості ДНК, що утворюється в ході реакції.

Згідно з цим правилом, вивільнення флуоресцентних молекул (флуорофорів) відбувається на довжинах хвиль, більших за довжину хвилі поглинання. Довжина хвилі поглинання та випромінювання, а також інтенсивність світла під час поглинання та випромінювання характерні для кожного флуорофору і можуть значно відрізнитися від сполуки до сполуки (так що кілька флуорофорів у суміші можна виявити незалежно).

Коли флуорофор поглинає світло, електрони окремих атомів сполуки переходять на більш високий енергетичний рівень (збудження) і залишаються там приблизно на 10^{-8} секунд.

Потім флуорофор повертається до свого нормального стану і випромінює фотони. Частина енергії збуджених електронів розсіюється у вигляді тепла, тому довжина хвилі фотона завжди менша за довжину хвилі поглинутого фотона (різниця в довжині хвилі між поглинутим і випромінюваним фотонами називається стоксовим зсувом).

Таким чином, процес флуоресценції складається з багаторазового поглинання та випромінювання фотонів, що в кінцевому підсумку призводить до руйнування флуоресцентного барвника (фотознебарвлення).

Флуорофори: більшість флуоресцентних сполук, що використовуються в ПЛР у реальному часі, є гетероциклічними або поліциклічними ароматичними вуглеводами. Придатність конкретного флуорофору для цілей ПЛР залежить головним чином від ефективності поглинання та

випромінювання фотона та його здатності повторювати цикл поглинання-випромінювання (кількість циклів перед фотоцвітінням).

За принципом використання ПЛР у реальному часі флуоресцентні барвники можна розділити на дві групи: біспецифічні інтеркальовані барвники та мічені олігонуклеотидами барвники.

Перша група флуорохромів, після зв'язування з дволанцюговими молекулами ДНК або РНК, значно збільшила квантовий вихід (відношення кількості випромінюваних фотонів до кількості поглиненого флуорохрому). До них відносяться такі сполуки, як бромід етидію, SYBR green та sybr gold. Ці флуоресцентні барвники в даний час використовуються для виявлення неспецифічного фарбування ДНК та моментів гібридизації між міченими синтетичними олігонуклеотидами та ампліфікованою ДНК. Останнім часом для цих цілей стало особливо популярним використання так званих пептидних нуклеїнових кислот (PNA).

Інша група флуоресцентних барвників складається із сполук, квантовий вихід яких не залежить від утворення комплексів з ДНК і зручно зв'язується з синтетичними олігонуклеотидами під час синтезу праймерів і зондів (основна відмінність між зондами і праймерами полягає в тому, що вони блокують краї зразка від подовження ДНК-полімеразою (зразок і праймер (основна відмінність полягає в тому, що він блокує розтягнення країв зразка ДНК-полімеразою.)

Оскільки інтенсивність флуоресценції барвника, що використовується для мічення олігонуклеотиду, по суті не залежить від зв'язування з ДНК, для визначення моменту "активації" міченого флуоресценцією олігонуклеотиду використовується один із двох наступних підходів. З репортерного (донорного) люмінофора отримують інший (акцепторний) люмінофор з більш довгим спектром випромінювання ("флуоресцентний вогнегасник") або "темний флуоресцентний вогнегасник" (який ефективно знижує інтенсивність флуоресценції барвника і зменшує спектр випромінювання).

Дослідники часто стикаються з проблемою поєднання флуоресцентних барвників (наприклад, при проведенні багаторазової ПЛР), які вони використовують для незалежної реєстрації накопичення декількох продуктів ПЛР в одній пробірці.

У цьому випадку, щоб запобігти перетину окремих каналів детектування флуоресценції, дуже складно звести до мінімуму перекриття спектрів поглинання і випромінювання різних флуоресцентних барвників, як правило, виробники підсилювачів детектування рекомендують набір флуорохрому, який оптимальний для фільтра, встановленого в пристрої.

Гаситель флуоресценції: коли мова йде про взаємодію різних флуоресцентних сполук, гасіння зазвичай відноситься до будь-якого процесу, який призводить до зменшення квантового виходу одного процесу флуоресценції, а сполука, що впливає на флуоресценцію інших сполук, називається вогнегасником. Гасителі використовуються при розробці олігонуклеотидних систем, у випадку барвників, що не змішуються, таким чином, що гасіння (флуоресценція) відповідає утворенню ДНК під час ПЛР.

Всі вогнегасники діляться на 2 групи: флуоресцентні і темні. Флуоресцентний барвник сам по собі є відмінним флуоресцентним барвником, він також має здатність перетворювати енергію, поглинену при гасінні, в світло і знижувати квантовий вихід флуоресцентного барвника. Темні барвники використовують поглинену енергію по-різному [23].

1.4 Застосування генетичного профілю

Тестування на батьківство набуває все більшого значення в країнах, де це дозволено законодавством. Такі тести можуть проводитися особисто і останнім часом стають все більш популярними.

Перший генетичний тест для встановлення оспорюваного батьківства був заснований на антигенних мутаціях в еритроцитах. В даний час дослідження, спрямовані на судово-медичну ідентифікацію, засновані на аналізі так званих генетичних маркерів - мікросателітних послідовностей ДНК, характерних і персональних для кожної людини.

На основі цих маркерів визначається генетичний профіль кожної досліджуваної особи, наприклад, порівнюються профілі батьків і дітей. Це порівняння та статистичний аналіз можуть в кінцевому підсумку підтвердити або виключити, чи є чоловік, який бере участь у дослідженні, біологічним батьком дитини, яка бере участь у дослідженні. Найбільш повний тест на батьківство, Київський тест, може дати або 100%-ву ймовірність виключення батьківства, або надійність більш 99,9999% при його підтвердженні 24 генетичними тестами.

Аналізуючи генетичні характеристики статевих хромосом X і Y, ми можемо встановити генетичні зв'язки як між жінками (наприклад, між сестрами), так і між сім'ями чоловіків (наприклад, між дідусями і прадідусями по батьківській лінії). Такі дослідження часто використовуються для цілей заповіту та ідентифікації. Здатність ідентифікувати генетичні ознаки в статевих хромосомах та мітохондріальній ДНК також використовується в комерційних генеалогічних тестах. У разі тестування чоловіків дослідження, засновані на Y-хромосомі, дозволяють нам віднести походження досліджуваної людини до певної чоловічої популяції.

Генетичне тестування є однією з основних форм доказів у процесі встановлення батьківства та спорідненості, а можливість генетичної ідентифікації за залишковою ДНК також дозволила використовувати генетичне профілювання в криміналістиці, наприклад, зубних щіток, жувальної гумки, використаних серветок, льодяників, недопалків, яблучних гнітів і навіть нижньої білизни людини.¹ Це можна порівняти з так званим trace trace.

Встановлення батьківства і спорідненості між матір'ю і дитиною - ДНК-тести (Київ, Вінниця, Харків, Львів). Ці медичні тести були розроблені для тих, хто хоче вирішити проблеми з батьківством або материнством. Ці тести не вимагають проведення будь-яких процедур, за винятком наявності відповідних генетичних зразків дитини і батька або дитини і матері.

Генетичне тестування на батьківство базується на аналізі клітинної ДНК, включаючи клітинне ядро. Тому можуть використовуватися різні зразки. Генетичний аналіз включає наступні етапи

Виділення ДНК: першим етапом є виділення, яке передбачає "вилучення" ДНК із зразків, відправлених у лабораторію. Для цього використовується велика кількість ферментів, які розчиняють клітинні мембрани, що оточують ДНК. Зразок багаторазово центрифугують для осадження, щоб отримати чисту ДНК. Він використовується для подальшого аналізу або кріоконсервується до відновлення тесту.

Реакція ПЛР: якщо концентрація ДНК після поділу занадто низька, тест Неможливий. Отже, наступним етапом є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), в ході якої зразок багаторазово нагрівають і охолоджують в присутності спеціальних органічних хімікатів. В результаті цієї реакції утворюються сотні тисяч копій ДНК, які можуть бути успішно використані на наступному етапі дослідження.

Секвенування ДНК: останній етап повністю автоматизований і використовує пристрій, який називається секвенсором. Підключений до комп'ютера, він використовує лазерний промінь для перевірки порядку розташування пар основ ДНК. Тести ДНК зазвичай аналізують лише вибрані ділянки ДНК, які називаються локусами, STR або генетичними маркерами, які використовують метод множинного STR для визначення батьківства. Маркер перевіряється на наявність декількох особливих нуклеотидних мотивів, які повторюються, в результаті чого в результаті тесту на цьому маркері з'являється число. Це так званий генетичний профіль випробуваної людини. Це особиста особливість людини. Оскільки кожен з нас успадковує

половину своїх генів від батька і половину від матері, кожен маркер представлений двома цифрами. Порівнюючи профілі за допомогою ДНК-тестів, українські експерти в галузі медичної геноміки можуть визначити можливі біологічні зв'язки між цими людьми і батьківством, щоб чітко підтвердити або виключити батьківство.

Мережа європейських дослідницьких центрів *Medical Genomics Ukraine* розташована в українських містах (Київ, Одеса, Львів, Луцьк, Рівне, Тернопіль, Хмельницький, Івано-Франківськ, Ужгород, Вінниця, Житомир, Чернігів, Чернівці, Черкаси, Суми, Запоріжжя, Миколаїв, Херсон, Дніпро, Кривий Ріг, Кропивницький, Маріуполь, Полтава, Харків), на основі багаторічного досвіду роботи лікарів-діагностів лабораторії та з фахівцями, що входять до переліку спеціалістів у галузі судово-медичної генетики. На основі співпраці з експертами в галузі судової генетики можна замовити широкий спектр ДНК-тестів на визначення батьківства та спорідненості як для особистих, так і для судових цілей [24].

Різні аспекти застосування генетичного профілю та його вплив на різні галузі науки та суспільства включає:

1) Медицина та генетичне профілювання.

Однією з важливих сфер застосування генетичного профілювання є медицина. Аналізуючи генетичні дані, можна визначити індивідуальні особливості пацієнта та його схильність до різних захворювань. Це дозволяє своєчасно виявляти спадкові захворювання, визначати ефективні методи лікування та розробляти персоналізовані підходи до охорони здоров'я.

2) Судово-медична експертиза та генетичне профілювання.

Генетичне профілювання зарекомендувало себе як невід'ємна частина кримінальних розслідувань, де аналіз ДНК дозволяє ідентифікувати злочинців, вирішувати непевні справи та встановлювати родинні зв'язки. Це значно покращує можливості правоохоронних органів у розкритті злочинів та запобіганні злочинності.

3) Генетичне профілювання в генетичних дослідженнях.

У сфері генетичних досліджень генетичні профілі використовуються для вивчення різноманітності генетичних властивостей у різних популяціях. Це дозволяє зрозуміти еволюційно-генетичні закономірності та ідентифікувати гени, відповідальні за певні фізіологічні та патологічні характеристики.

4) Етичні аспекти генетичного профілювання.

Використання генетичного профілювання також пов'язане з етичними проблемами та проблемами приватності. Важливо забезпечити належний рівень захисту приватності при використанні генетичної інформації особи та уникнути потенційного зловживання цією інформацією.

Тим не менш, правильне і розумне використання генетичного профілювання відкриває широкі перспективи для подальших удосконалень у багатьох сферах науки і суспільства.

1.1.4 Визначення основних параметрів генетичного профілю

Генетичний профіль - це унікальна характеристика генетичного матеріалу, яка містить інформацію про генетичні особливості людини та структуру ДНК. Основні параметри генетичного профілю визначаються на основі аналізу генетичної інформації та включають:

1) Генотип - визначає, які саме гени та алелі присутні в геномі людини. Це визначає генетичні характеристики та генетичний матеріал людини.

2) Алелі - це різні варіанти гена, які впливають на певні фізичні або біологічні характеристики людини. Алелі можуть бути домінантними або рецесивними.

3) Поліморфізм - це наявність різних варіантів гена або послідовності ДНК у різних людей. Це може впливати на фізіологічні та фенотипічні зміни.

4) Гомозиготні особини мають однаковий алель певного гена, тоді як гетерозиготні особини мають різні алелі цього гена.

5) Інформація про те, які гени та характеристики успадковуються від обох батьків, на основі конкретних алелей та законів успадкування.

6) Генетичні маркери - це специфічні ділянки або гени, які використовуються для ідентифікації осіб або популяцій, вивчення генетичних зв'язків або визначення схильності до певних захворювань.

7) Мутація - це зміна послідовності ДНК, яка спричиняє нову варіацію гена або змінює його функцію.

Визначення цих параметрів дозволяє не тільки зрозуміти генетичне походження людини, але й застосовувати для вирішення різноманітних проблем, включаючи питання охорони здоров'я, кримінальні розслідування та наукові дослідження.

1.2.4 Використання генетичного профілю в судовій медицині

Основне завдання полягає в тому, щоб виявити наявність цих виділень на об'єкті, визначити, чи мають вони людське або тваринне походження, а у випадку з людьми довести, що вони можуть належати конкретному об'єкту. Крім того, судово-медичні експерти стикаються з проблемою ідентифікації речових доказів імунологічного характеру на місцях злочинів. Тому судово-медичні експерти повинні володіти базовими знаннями в області судово-імунологічних досліджень.

Знання судово-медичної експертизи речових доказів є обов'язковим для всіх лікарів, які можуть бути залучені до огляду місця події, відповідно до Кримінально-процесуального кодексу України. При огляді місця події фахівець-криміналіст повинен допомогти слідчим органам у виявленні, належному зборі та упаковці речових доказів. Крім того, вони можуть надати

експертну консультацію слідчим органам щодо належного зберігання речових доказів до передачі на судово-медичну експертизу та роз'яснити можливість проведення судово-медичної експертизи речових доказів. Це дозволяє слідчому направити матеріали на експертизу у відповідний відділ і задати судово-медичному експерту відповідні питання. Слідчі повинні направити речові докази, вилучені на місці події, разом з постановою [25, 26, 27].

Особливістю молекулярно-генетичного дослідження є етап судово-медичної експертизи речових доказів. По-перше, дослідження високотехнологічне, складність висока, воно має більший потенціал, ніж імунологічне дослідження, і виконавець повинен володіти спеціальними знаннями і бути зрозумілим судово-медичними органами і суспільством.

Ядро соматичних клітин людини містить 23 пари хромосом. Кожна хромосома являє собою окрему молекулу ДНК, ланцюжок нуклеотидів.

ДНК 1 клітини людини містить 3,2 мільярда пар основ, що еквівалентно 800 мегабайтам інформації. Довжина 46 молекул ДНК в одній клітині людини становить майже два метри.

Ген - це фрагмент ДНК, який кодує структуру білка, синтезованого в клітині. Тільки 3% від загальної довжини ділянки ДНК містять гени, а функція інших 97% нуклеотидів ще не вивчена. Число генів у геномі людини перевищує 20 488 -20 588 (2007) на 100 000 (1995).

Судово-медичні цілі STR-локуси (короткі тандемні повтори): такі локуси мають короткі послідовності від 3 до 7 нуклеотидів і довжину алелів від 100 до 500 п.н. Тому STR-локуси найбільш перспективні для дослідження деградованої ДНК, яка може містити невелику кількість ділянок, придатних для аналізу.

Об'єктами дослідження є кров, сперма, слина, сеча, волосся, зуби, кістка, тканина, клітинний шар, гістологічні зразки.

Особливості алгоритмів поведінки судових експертів при проведенні молекулярно-генетичних досліджень:

- 1) оцінка можливості виділення ДНК з об'єкта;
- 2) визначення стану та кількості ДНК в об'єкті;
- 3) визначення умов зберігання доказового матеріалу, необхідних для врахування впливу деградації на ДНК.

Умовами проведення ПЛР є:

- 1) кількість ДНК в біологічному об'єкті;
- 2) стан ДНК (деградація, вплив інгібіторів);
- 3) кількість ДНК, виділеної з об'єкта, яка придатна для ПЛР.

ДНК можна виділити з будь-якої тканини або рідини, включаючи клітини з ядрами. Теоретично, ДНК може бути проаналізована навіть при виділенні з однієї клітини. Однак на практиці, якщо формат ПЛР є мультилокусним, потрібні десятки клітин з ядрами, що містять ДНК.

Вміст ДНК: вміст аутосомної ядерної ДНК 6-7 пг; вміст ДНК зародкової лінії 3-3,5 пг; ефективний вміст ДНК для ПЛР 0,5-1,5-2,5 нг; 0,5 нг ДНК виявляється приблизно в 70 ядровмісних клітинах (0,01 мкл крові).

Особливості проведення ПЛР-тестування;

- 1) запобігання контамінації;
- 2) виділення ДНК з ядровмісних клітин;
- 3) визначення ефективної кількості ДНК та кількісного вмісту в об'єкті;
- 4) використання ДНК-контролів;
- 5) правильна інтерпретація результатів.

Зміст експертного висновку повинен містити детальний опис проведеного дослідження, включаючи методи, використані в дослідженні, отримані результати та оцінку експерта; обґрунтовані відповіді на кожне поставлене питання.

Виділяють такі показники, які включені в експертний висновок:

- 1) кількість ядровмісних клітин, наявних у речовому доказі;
- 2) стан ядровмісних клітин (нормальні, розірвані, повторно поділені);

- 3) кількість ДНК, виділеної з об'єкта та використаної для ПЛР;
- 4) контролю для ПЛР;
- 5) частота алелів у локусі;
- 6) формула розрахунку;
- 7) кількість ідентичних особин у даній популяції, якій відповідає результат.

Отже, генетичне профілювання широко використовується в криміналістиці і є важливим для вирішення таких завдань, як ідентифікація особи, встановлення родинних зв'язків і розслідування злочинів. Серед аспектів використання генетичного профілювання в криміналістиці виділяють основні [26, 28, 29]:

1) Ідентифікація осіб. Наприклад, у випадках масштабних трагедій, авіакатастроф і невстановлених смертей генетичні дані можна порівнювати для ідентифікації осіб і встановлення родинних зв'язків.

2) Кримінальні розслідування. Аналіз генетичного профілю широко використовується в розслідуванні злочинів, де можуть бути присутні сліди ДНК, таких як сексуальне насильство і вбивства. Порівнюючи профіль особи з генетичним профілем, отриманим з місця злочину, можна встановити або виключити причетність до злочину.

3) Встановлення родинних зв'язків. При усиновленні, встановленні батьківства та в інших ситуаціях, коли важливо визначити генетичну спорідненість між людьми, генетичний аналіз може встановити родинні зв'язки.

4) Визначення вини чи невинуватості. Генетичний аналіз може допомогти вирішити питання вини або невинуватості в судових справах, коли іншими способами вирішити питання було б складно; аналіз ДНК може надати важливі докази, які приймаються в суді; аналіз ДНК також може бути використаний для встановлення особи людини, яка була визнана винною у скоєнні злочину.

5) Ексгумація тіл та визначення причини смерті. Для ідентифікації та визначення причини смерті. Це особливо важливо в ситуаціях, коли необхідно ідентифікувати осіб, які загинули в результаті трагедії або великої катастрофи.

6) Вирішення питань батьківства і материнства. Генетичний аналіз може вирішити питання батьківства та материнства і є важливим для визначення батьківства та юридичних прав.

7) Збереження доказів. Генетичне профілювання може слугувати важливим засобом збереження доказів у судових справах та уможливлення повторного використання інформації в майбутньому.

З огляду на етичні принципи, важливо, щоб використання генетичного профілювання в судовій медицині враховувало необхідність дотримання конфіденційності, забезпечення стандартів якості експертизи та врахування прав і свобод осіб, які піддаються генетичному профілюванню.

1.3.4. Генетичний профіль у генеалогічних та популяційних дослідженнях

Генетичні профілі відіграють важливу роль у генетичних та популяційних дослідженнях та надають важливу інформацію про генетику та походження індивідів та популяцій [27, 30, 31].

Загальною метою генетичного аналізу в генеалогії та популяційних дослідженнях є розуміння історії та еволюції різних популяцій, їх походження та взаємозв'язків між ними.

1) генеалогічні дослідження:

Визначення сімейних зв'язків. Генетичні профілі можуть бути використані для виявлення споріднених зв'язків між людьми, які вивчають походження генеалогії. Порівнюючи генетичні маркери, можна встановити ступінь спорідненості та створити генеалогічне дерево.

Маршрут міграції. Генетичний аналіз може служити інструментом для вивчення закономірностей міграції та розподілу різних популяцій у різних регіонах. Закономірності популяції, визначені за допомогою генетичних маркерів, можуть вказувати на історію міграції та регіони Походження певної популяції.

Реконструкція генеалогії. Генетичне профілювання може реконструювати генеалогію шляхом виявлення спільних предків та визначення того, як успадковуються певні генетичні ознаки [28, 30].

2) обстеження населення:

Визначення генетичного різноманіття. Генетичний аналіз використовується для визначення різноманітності геному в конкретній популяції. Це дозволяє нам вивчати генетичні відмінності між різними популяціями та визначати рівень генетичного різноманіття.

Генетичний поділ. Аналіз генетичного профілю може виявити генетично ізольовані популяції, які можуть мати унікальні генетичні ознаки через географічну або культурну ізоляцію.

Пошук загальних генетичних маркерів. Популяційні генетичні дослідження можуть допомогти виявити загальні генетичні маркери, пов'язані з певними фенотипами або характеристиками захворювання.

Ідентифікація етнічних груп. Генетичний аналіз може допомогти визначити генетичні характеристики різних етнічних груп та їх зв'язок з іншими популяціями [29, 31, 32].

1.4.4 Етичні аспекти використання генетичного профілю

Використання генетичного профілювання в сучасному суспільстві піднімає певні етичні проблеми та питання. Деякі з основних етичних міркувань при використанні генетичного профілювання включають [30, 33]:

1) Приватність і конфіденційність. Збір, зберігання та обробка генетичних даних пов'язані з питаннями конфіденційності та приватності. Важливо забезпечити, щоб генетичні дані особи не використовувалися без її дозволу і щоб були вжиті надійні заходи для захисту генетичних даних.

2) Дискримінація та стереотипи. Існує потенційний ризик того, що генетичні профілі можуть бути використані для дискримінації на основі генетичних характеристик. Наприклад, це може включати відмову в працевлаштуванні або страхуванні на основі певних генетичних аспектів, що може викликати соціальні та етичні проблеми.

3) Етнічні та расові питання. Використання генетичного профілювання може викликати питання, пов'язані з етнічною та расовою приналежністю. Нерегульоване використання генетичного профілювання може призвести до посилення стереотипів і розподілу ресурсів на основі расових та етнічних характеристик.

4) Медичне та особисте використання. Важливо враховувати етичні наслідки використання генетичного профілювання в медичних та особистих цілях. Люди мають право робити поінформований вибір щодо отримання, тестування та наслідків використання генетичної інформації для здоров'я.

5) Мораторій на дослідження та аналіз. Стрімкий розвиток технологій генетичного аналізу призвів до дискусій про можливість введення мораторію на певні види досліджень та аналізу, особливо коли це стосується ембріогенетики та генетичних модифікацій.

6) Етичні вимоги до досліджень та збору даних. При проведенні генетичних досліджень і зборі генетичних даних важливо дотримуватися

етичних стандартів. Це включає отримання інформованої згоди від учасників дослідження та врахування етичних міркувань на всіх етапах дослідження.

Балансування між важливістю генетичного аналізу для розвитку науки і медицини та захистом прав людини і приватного життя є ключовим викликом у вирішенні етичних питань у цій сфері [31, 34].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Вибір об'єкта дослідження та вибір зразків ДНК

Об'єктом дослідження був букальний епітелій з внутрішньої частини щоки. Потім з ватного кінця палички було зроблено вирізка та поміщено до 1,5 мл пробірки.

Аналіз виділення ДНК полягав у тому, що до об'єкту № 1 додавали 1 мл бідистильованої деіонізованої води, витримували при кімнатній температурі 30 хв., періодично струшуючи на вортексі. Центрифугували 2 хв. при 15 000 g при кімнатній температурі. Вилучали супернатант, окрім 25 мкл. До отриманого осаду додавали 5%-й розчин *Chelex* 100 до кінцевого об'єму 200 мкл та 2 мкл 10 мг/мл розчину протеінази К. Ретельно перемішували і витримували 30 хв. при температурі 56°C. Струшували на вортексі та коротко центрифугували. Далі витримували 8 хв. при температурі 100°C. Після центрифугування 3 хв. при 15 000 g при кімнатній температурі супернатант, що містить ДНК, переносили до нової пробірки. Розчин ДНК готовий до тестування на визначення кількості та якості виділеної ДНК.

Для контролю чистоти реакції виділенню ДНК за допомогою *Chelex* 100 піддавалися по 25 мкл 5%-го розчину *Chelex* 100 та бідистильованої деіонізованої води (негативні контролю).

2.2 Підготовка зразків для ПЛР

Кількісну та якісну оцінку виділеної ДНК (об'єкт № 1) проводили методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з використанням стандартного набору (набір специфічний тільки для ДНК людини) реактивів для проведення кількісного аналізу «*Quantifiler Human Plus DNA Quantification Kit*» виробництва фірми «*Applied Biosystems*» (США) у

відповідності до інструкції, наданої виробником реагентів на приладі «7500 *RealTime PCR Systems*» фірми «*Applied Biosystems*» (США). При постановці реакції використовували позитивний контроль (реакційна суміш містила контрольну ДНК 007, надану виробником реагентів із відомою концентрацією) та негативні контролю, які не містили ДНК (в реакційні суміші додавали бідистильовану деіонізовану воду та 5%-ий розчин *Chelex* 100).

У результаті тестування позитивного контролю спостерігається прийнятний рівень матричної активності.

У результаті тестування негативних контролів спостерігається відсутність матричної активності при наявності сигналу від внутрішнього стандарту.

У результаті тестування об'єкту № 1 спостерігається прийнятний рівень матричної активності.

2.3 Проведення ПЛР та ампліфікація ДНК

Постановка на капілярний електрофорез включала виділену ДНК (об'єкт 1), яку типували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням стандартного набору (набір специфічний тільки для ДНК людини) реактивів для ідентифікації «*PowerPlex® Fusion 6C System*» виробництва фірми «*Promega*» за локусами *Amelogenin*, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045, DYS391, FGA, DYS576, DYS570 у відповідності до інструкції, наданої виробником реагентів. Реакцію ампліфікації проводили з використанням ампліфікатора *GENEampPCR System 2720* фірми «*Applied Biosystems*» (США).

Загальні відомості щодо характеристики локусів наведено в таблиці 2.1

Таблиця 2.1 – Харатеристика локусів ДНК.

Локус	Хромосомна локалізація
Amel	Xp22.1-Xp22.3 and Yp11.2
D3S1358	3p21.31
D1S1656	1q42
D2S441	2p13-14
D10S1248	10q26.3.
D13S317	13q22-31
Penta E	15q26.2
D16S539	16q24-qter
D18S51	18q21.3
D2S1338	2q35-37.1
CSF1PO	5q33.3-49
Penta D	21q22.3
TH01	11p15.5
vWA	12p12-pter
D21S11	21q11.2-q21
D7S820	7q11.21-22
D5S818	5q21-31
TPOX	2p23-2pter
D8S1179	8q24.13
D12S391	12q13.2
D19S433	19q12-13.1
SE33	6q14
D22S1045	22q12.3. chr 22
DYS391	12
FGA	4q28
DYS576	Y - хромосома
DYS570	Y - хромосома

Розділення та детекцію флуоресцентно мічених ампліфікованих фрагментів проводили з використанням автоматичного аналізатору ДНК 3500 *Genetic Analyzer* фірми «*Applied Biosystems*» (США) в середовищі полімеру POP4, довжина капілярів – 36,0 см, час прогону – 45 хвилин, при температурі навколишнього середовища 20°C. Визначення довжин ампліфікованих фрагментів та встановлення номерів алелей проводили відповідно до внутрішнього розмірного стандарту *WEN ILS 500* та алельного

леддеру, що входить до набору реагентів, за допомогою програмного комплексу *GeneMapper ID-X v 1.6* (рисунк 2.1).

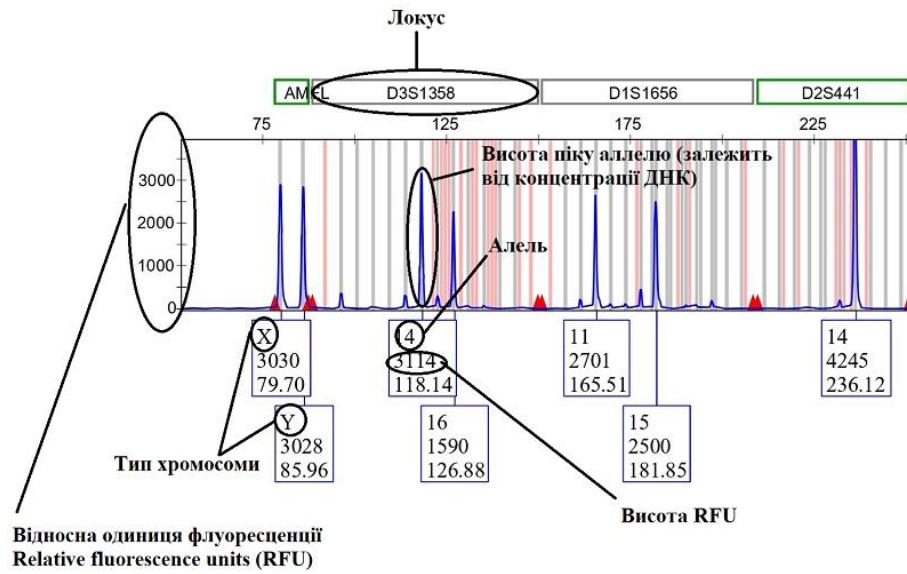


Рисунок 2.1 – Пояснення результатів фореограми програмного комплексу *GeneMapper ID-X v 1.6*.

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Підготовка та проведення ПЛР

Підготовка об'єктів дослідження та проведення ПЛР включало декілька етапів:

Етап №1. За допомогою ватної палички було відібрано зразки букального епітелію з внутрішньої частини щоки.

Потім з ватного кінця палички було зроблено вирізку та поміщено до 1,5 мл. пробірки.

Далі до пробірки додали 1 мл бідистильованої деіонізованої води, витримували при кімнатній температурі 30 хв., періодично струшуючи на вортексі. Центрифугували 2 хв. при 15 000 g при кімнатній температурі. Вилучали супернатант, окрім 25 мкл. До отриманого осаду додавали 5%-й розчин Chelex 100 до кінцевого об'єму 200 мкл та 2 мкл 10 мг/мл розчину протеїнази К. Ретельно перемішували і витримували 30 хв. при температурі 56°C. Струшували на вортексі та коротко центрифугували. Далі витримували 8 хв. при температурі 100°C. Після центрифугування 3 хв. при 15 000 g при кімнатній температурі супернатант, що містить ДНК, переносили до нової пробірки. Розчин ДНК готовий до тестування на визначення кількості та якості виділеної ДНК.

Етап №2. Кількісну та якісну оцінку виділеної ДНК проводили методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з використанням стандартного набору (набір специфічний тільки для ДНК людини) реактивів для проведення кількісного аналізу «Quantifiler Human Plus DNA Quantification Kit» виробництва фірми «Applied Biosystems» (США) у відповідності до інструкції, наданої виробником реагентів на приладі «7500 RealTime PCR Systems» фірми «Applied Biosystems» (США). При постановці реакції використовували позитивний контроль (реакційна суміш містила

контрольну ДНК 007, надану виробником реагентів із відомою концентрацією) та негативні контролю, які не містили ДНК (в реакційні суміші додавали бідистильовану деіонізовану воду та 5%-ий розчин *Chelex* 100).

У результаті тестування позитивного контролю спостерігається прийнятний рівень матричної активності.

У результаті тестування негативних контролів спостерігається відсутність матричної активності при наявності сигналу від внутрішнього стандарту.

У результаті тестування об'єкту № 1 спостерігається прийнятний рівень матричної активності.

У результаті було встановлено, що концентрація ДНК на 1 мкл речовини для досліджу:

№1 становить 52,15 нг/мкл

№2 становить 58,56 нг/мкл

№3 становить 44,24 нг/мкл

А знаючи що для ампліфікації 1 нг/мкл ДНК потрібно 2 клітини (згідно з характеристиками наданими виробником реактивів) можна зробити висновок, що в досліджах:

1) 52,15 нг/мкл відповідає 104,3 клітин

2) 58,56 нг/мкл відповідає 77,12 клітин

3) 44,24 нг/мкл відповідає 88,48 клітин

Етап нормалізації ДНК. Для кожного досліджу було зроблено по 6 розведень з нормалізованою ДНК що відповідає концентрації ДНК 3, 5, 10, 20, 30, та 40 клітин.

Для першого досліджу з концентрацією ДНК 52,15 нг/мкл було зроблено 6 розведень які відповідають концентрації ДНК 3, 5, 10, 20, 30, та 40 клітин. А саме було зроблено розведення:

1) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 34,7 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 3 клітинам.

2) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 20,8 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 5 клітинам.

3) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 10,4 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 10 клітинам.

4) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 5,2 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 20 клітинам.

5) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 3,4 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 30 клітинам.

6) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 2,6 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 40 клітинам.

Для другого дослідження з концентрацією ДНК 58,56 нг/мкл було зроблено 6 розведень, які відповідають концентрації ДНК 3, 5, 10, 20, 30, та 40 клітин. А саме було зроблено розведення:

1) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 39 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 3 клітинам.

2) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 23,4 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 5 клітинам.

3) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 11,7 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 10 клітинам.

4) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 5,8 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 20 клітинам.

5) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 3,9 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 30 клітинам.

6) 1 мкл. розчину з ДНК розведено в 2,9 мкл. бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 40 клітинам.

Для третього дослід з концентрацією ДНК 44,24 нг/мкл було зроблено 6 розведеньякі відповідають концентрації ДНК 3, 5, 10, 20, 30, та 40 клітин. А саме було зроблено розведення:

1) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 29,5 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 3 клітинам.

2) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 17,7 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК в розчині буде дорівнювати 5 клітинам.

3) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 8,8 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК буде дорівнювати 10 клітинам.

4) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 4,4 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК буде дорівнювати 20 клітинам.

5) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 2,9 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК буде дорівнювати 30 клітинам.

6) 1 мкл розчину з ДНК розведено в 2,2 мкл бідистильованої деіонізованої води. Концентрація ДНК буде дорівнювати 40 клітинам.

Узагальнені відомості щодо нормалізації ДНК наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Нормалізація ДНК

Варіант	Концентрація ДНК, нг/мкл	Кількість клітин	Нормалізація ДНК (розведення), мкл води до 1 мкл вихідного розчину ДНК					
			3 клітини	5	10	20	30	40
1	52,15	104,3	34,7	20,8	10,4	5,2	3,4	2,6
2	58,56	77,12	39	23,4	11,7	5,8	3,9	2,9
3	44,24	88,48	29,5	17,7	8,8	4,4	2,9	2,2

Етап №3. Виділену та нормалізовану ДНК типували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з використанням стандартного набору (набір специфічний тільки для ДНК людини) реактивів для ідентифікації «PowerPlex® Fusion 6C System» виробництва фірми «Promega» за локусами Amelogenin, D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, SE33, D22S1045, DYS391, FGA, DYS576, DYS570 у відповідності до інструкції, наданої виробником реагентів. Реакцію ампліфікації проводили з використанням ампліфікатора GENEampPCR System 2720 фірми «Applied Biosystems» (США).

При постановці реакції ампліфікації використовували позитивний контроль (реакційна суміш містила контрольну ДНК 2800M, надану виробниками реагентів із завідомим набором алелей по кожному локусу) та негативний контроль, який не містив ДНК (в реакційну суміш додавали бідистильовану деіонізовану воду).

Розділення та детекцію флуоресцентно мічених ампліфікованих фрагментів проводили з використанням автоматичного аналізатору фірми «Applied Biosystems» 3500 Genetic Analyzer HID в середовищі полімеру POP4, довжина капілярів – 36,0 см, час прогону – 45 хвилин, при температурі навколишнього середовища 20°C. Визначення довжин ампліфікованих фрагментів та встановлення номерів алелів проводили відповідно до

внутрішнього розмірного стандарту «GeneScan 600 LIZ Size Standard» та алельного леддери, що входить до набору реагентів, за допомогою програмного комплексу GeneMapper ID-X v 1.6.

3.2 Аналіз отриманих результатів

Результат проведеного дослідження представлений у вигляді фореограм (Додаток А-Є) та зведено у таблиці 3.2 – 3.4.

Таблиця 3.2 – Висота RFU для варіанту 1

Локус (Алелі)	Кількість клітин					
	3	5	10	20	30	40
Amel (X, Y)	884, 706	1284, 1353	1485, 1396	1901, 1879	2496, 1902	3030, 3028
D3S1358 (14,16)	1126, 676	1557, 1065	2005, 1491	1471, 1369	1942, 1985	3114, 1590
D1S1656 (11, 15)	634, 628	1066, 1027	1086, 1224	1368, 1549	1929, 2288	2701, 2500
D2S441(14, 14)	1131	1551	2252	2409	3219	4245
D10S1248 (16, 17)	909, 448	1359, 898	947, 1510	1104, 1657	1406, 2093	2461, 2428
D13S317 (10, 11)	432, 550	882, 1000	673, 977	1146, 983	1590, 1871	2383, 1868
Penta E (11, 13)	286, 268	736, 718	711, 676	1037, 1021	1274, 1827	1919, 1466
D16S539 (11, 11)	2428	2878	2585	4243	5055	6789
D18S51 (14, 18)	1256, 1402	1706, 1852	1872, 1628	1892, 2303	1983, 3210	3398, 3158
D2S1338 (20, 25)	360, 330	810, 780	1106, 1098	1047, 1301	1501, 1396	1957, 1610
CSF1PO (12, 12)	211	539, 661	1055, 983	1014, 996	2021, 1371	1560, 1826
Penta D (12, 14)	305, 377	755, 828	439, 709	1130, 1014	1859, 1486	1527, 1018
TH01 (9.3, 9.3)	266	774, 719	631, 765	1231, 794	638, 936	1302, 1414

Продовження таблиці табл. 3.2

vWA (15, 18)	385, 296	832, 748	886, 694	1130, 870	1069, 879	1348, 1117
D21S11 (29, 30.2)	853, 1069	1306, 1518	1468, 962	1460, 1819	828, 1997	1994, 1999
D7S820 (9, 11)	293, 421	747, 872	888, 796	1257, 1215	800, 1267	1393, 998
D5S818 (9, 12)	376, 794	828, 1243	943, 954	1419, 1837	938, 1224	1225, 1577
TPOX (8, 8)	371	822	1168	1585	895	1404
D8S1179 (10, 15)	-	461, 535	528, 878	685, 904	876, 704	932, 1132
D12S391 (15, 21)	850, 605	1299, 1056	1712, 1228	1720, 1240	2259, 1608	2403, 2089
D19S433 (13, 14.2)	702, 329	1153, 777	1216, 509	1890, 1089	2110, 1367	1668, 1527
SE33 (13, 27.2)	-	528, 391	895, 361	1003, 570	1047, 869	1145, 871
D22S1045 (15, 16)	-	430, 200	382, 364	390, 607	486, 646	709, 680
DYS391 (11, 11)	868	1320	1835	1593	2936	2792
FGA (20, 24)	692, 1199	1143, 1653	1243, 1462	2236, 2460	1524, 2287	2878, 3106
DYS576 (19, 19)	567	1018	1768	2084	2554	1789
DYS570 (18, 18)	492	943	1038	2015	1384	1781

Таблиця 3.3 - Висота RFU для варіанту 2

Локус (Алелі)	Кількість клітин					
	3	5	10	20	30	40
Amel (X, X)	661	833	1436	2235	2893	3248
D3S1358 (14, 16)	721, 520	1085, 1101	1519, 1611	1976, 2095	2451, 2555	2826, 2836
D1S1656 (11, 17)	109, 127	391, 469	860, 844	1518, 1124	2118, 1711	2753, 1987
D2S441 (13, 14)	1326, 1832	1957, 2661	2800, 3115	3515, 3766	3976, 4132	4569, 4431
D10S1248 (14,15)	-	202, 249	631, 674	1048, 1214	1589, 1836	2079, 2123
D13S317 (11,12)	-	-	212, 325	734, 657	1227, 1041	1780, 1351
Penta E (5, 17)	-	317, 121	619, 525	1124, 980	1661, 1411	2128, 1756

Продовження таблиці табл. 3.3

D16S539 (12, 12)	3118	4210	5139	5962	6366	7008
D18S51 (15, 18)	433, 354	888, 892	1121, 1166	1520, 1633	2089, 2211	2531, 2873
D2S1338 (19, 23)	-	232, 106	659, 420	1196, 940	1815, 1458	2150, 1928
CSF1PO (11, 12)	-	-	131, 235	602, 525	922, 810	1247, 1129
Penta D (9, 10)	-	133, 228	40, 517	691, 895	1267, 1423	1734, 2029
TH01 (8, 9.3)	-	110, 192	309, 521	711, 893	1119, 1310	1696, 1907
vWA (16, 16)	-	-	323	661	1253	1879
D21S11 (30, 32.2)	-	155, 181	400, 527	623, 1022	1096, 1524	1458, 1927
D7S820 (10, 11)	-	211, -	164, 493	340, 739	555, 1163	838, 1485
D5S818 (11, 14)	-	124, -	388, 196	655, 587	1076, 942	1509, 1360
TPOX (8, 8)	-	-	222	544	916	1395
D8S1179 (11, 12)	-	113, -	127, 485	412, 790	676, 1161	962, 1671
D12S391 (17, 18)	422, 381	984, 885	1440,11 84	1918, 1735	2549, 2298	3040, 2795
D19S433 (13, 14)	-	331, 251	621, 536	1055, 829	1547, 1185	1799, 1617
SE33 (14, 28.2)	-	138, -	377, 190	567, 499	990, 871	1476, 1102
D22S1045 (15, 17)	-	-	216, 229	414, 497	641, 720	897, 928
DYS391 (-)	-	-	-	-	-	-
FGA (25, 26)	212, 901	630, 1611	993, 2481	1463, 3033	1970, 3599	2451, 3864
DYS576 (-)	-	-	-	-	-	-
DYS570 (-)	-	-	-	-	-	-

Таблиця 3.4 - Висота RFU для варіанту 3

Локус (Алелі)	Кількість клітин					
	3	5	10	20	30	40
Amel (X, X)	831	1102	1739	2342	2835	3453
D3S1358 (12, 15)	752, 1028	1080, 1458	1557, 1781	1981, 2113	2349, 2466	3147, 3168

Продовження таблиці табл. 3.4

D1S1656 (12, 15)	312, 919	723, 1276	1249, 1528	1658, 1833	2079, 2244	3032, 2488
D2S441 (10, 15)	1193, 290	1734, 504	1962, 918	2437, 1449	2897, 2116	2473, 1959
D10S1248 (12, 16)	157, 188	469, 543	833, 725	1311, 1264	1764, 1521	2317, 1409
D13S317 (14, 15)	346, 411	647, 730	853, 931	1282, 1361	1634, 1681	1912, 1564
Penta E (9, 12)	-	112, 225	446, 617	740, 985	1097, 1353	1388, 1396
D16S539 (8, 11)	2129, 964	2709, 1466	3492, 2076	3957, 2466	4566, 2887	6891, 3456
D18S51 (16,19)	757, 1231	1270, 1658	1577, 2115	2043, 2614	2654, 2906	3088, 3417
D2S1338 (17, 18)	-	137, 219	531, 452	926, 722	1232, 1009	1386, 1391
CSF1PO (9, 9)	-	155	494	794	1141	1551
Penta D (13, 15)	-	106, 142	373, 322	663, 541	986, 892	1246, 1261
TH01 (8, 6)	-	276, 180	503, 461	711, 828	1073, 997	1250, 1381
vWA (18, 21)	126, -	329, -	639, 356	851, 594	952, 777	1119, 1041
D21S11 (27, 38)	542, 435	946, 854	1695, 1101	2008, 1755	2450, 2137	2718, 2405
D7S820 (11, 11)	-	362	529	859	1129	1563
D5S818 (13, 15)	-	192, 366	489, 366	871, 628	1010, 814	1501, 1073
TPOX (11, 11)	-	-	242	584	731	967
D8S1179 (9, 12)	-	176, -	248, 430	517, 611	663, 922	868, 1032
D12S391 (23, 25)	276, 180	859, 649	1088, 970	1638, 1544	2131, 1919	2593, 2316
D19S433 (15, 19)	133, -	451, 318	636, 520	861, 903	1072, 1153	1246, 1433
SE33 (18, 26)	-	172, -	369, 282	693, 527	988, 626	1009, 767
D22S1045 (10, 13)	-	136, -	421, 246	539, 507	806, 749	806, 749
DYS391 (-, -)	-	-	-	-	-	-
FGA (17, 19)	228, -	329, 745	657, 920	848, 1588	1319, 1977	1461, 2333

Продовження таблиці табл. 3.4

DYS576 (-, -)	-	-	-	-	-	-
DYS570 (-, -)	-	-	-	-	-	-

Згідно з інтерпретованими результатами у всіх трьох випадках при концентрації клітин в 3 одиниці на мікролітр (Додаток А.1–А.3) виникає випадіння алелів в локусах, при якому ідентифікація генетичних ознак неможлива.

У варіанті 1 це локуси D8S1179, SE33 та D22S1045. Для варіанта 2 не виявлено локуси D10S1248, D13S317, Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D19S433, SE33, D22S1045, DYS391, DYS576, DYS570. Тобто з 26 аналізованих локусів ідентифікувати вдалось лише 7. У варіанти 3 піки флуоресценції взагалі не спостерігались для 14 локусів: Penta E, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, SE33, D22S1045, DYS391, DYS576, DYS570.

При концентрації клітин в 5 одиниць на мікролітр у всіх трьох випадках (Додаток Б.1– Б.3) можна побачити збільшення висоти піків алелів та отримання достатньої мінімальної кількості повних локусів для ідентифікації особи.

При цьому у варіанті 1 ідентифікаційний генетичний спектр охопив весь набір застосованих локусів, а у варіантах 2 та 3 все ще спостерігалось випадіння окремих локусів або варіантів їх алелів: 8 повних локусів та 4 алелі по іншиц у варіанті 2 та 4 повних локуса та 4 алелі у інших для варіанту 3. Інтенсивність флуоресценції окремих ідентифікованих піків мінімальна (106-110 відносних одиниць).

У випадку дослідження 10 клітин на мікролітр (Додаток В.1–В.3) не було помічено випадіння алелів, але висота деяких піків не дає з впевненістю назвати їх істинними. Наприклад, у варіанті 2 локус Penta D має алель з піком лише 40 одиниць флуоресценції.

Водночас, вже для цієї концентрації стає зрозумілим належність 2 та 3 варіанту до жіночого геному (XX), бо відсутня ідентифікація всіх мікросателітних локусів Y- хромосоми: DYS391, DYS576 та DYS570.

При дослідженні 20-30 клітин на мікролітр (Додаток Г.1–Д.3) були отримані результати, що дають змогу з впевненістю ідентифікувати особу.

Ідеальний генетичний профіль було отримано при концентрації клітин в 40 одиниць на мікролітр (Додаток Е.1–Е.3) при цьому простежується мінімальний дисбаланс у висоті RFU (relativefluorescenceunit). Інтенсивність флуоресценції піків варіює у межах 1500-3000.

Результати негативного контролю (Додаток Є.1–Є.3) свідчать про те, що процес розділення та детекції флуоресцентно мічених ампліфікованих фрагментів пройшов нормально.

Таким чином, отримання достатньої для генетичної ідентифікації кількості клітин та інформативні результати проведеного ПЛР-аналізу дозволили нам побудувати генетичний профіль зразків за поліморфізмом алелів різних локусів (таблиця. 3.5).

Таблиця 3.5 – Поліморфізмом алелів різних локусів

Локус	Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3
Amel	X, Y	X, X	X, X
D3S1358	14,16	14, 16	12, 15
D1S1656	11, 15	11, 17	12, 15
D2S441	14, 14	13, 14	10, 15
D10S1248	16, 17	14,15	12, 16
D13S317	10, 11	11,12	14, 15
Penta E	11, 13	5, 17	9, 12
D16S539	11, 11	12, 12	8, 11
D18S51	14, 18	15, 18	16,19
D2S1338	20, 25	19, 23	17, 18
CSF1PO	12, 12	11, 12	9, 9
Penta D	12, 14	9, 10	13, 15
TH01	9.3, 9.3	8, 9.3	8, 6
vWA	15, 18	16, 16	18, 21
D21S11	29, 30.2	30, 32.2	27, 38
D7S820	9, 11	10, 11	11, 11

Продовження таблиці табл. 3.5

D5S818	9, 12	11, 14	13, 15
TPOX	8, 8	8, 8	11, 11
D8S1179	10, 15	11, 12	9, 12
D12S391	15, 21	17, 18	23, 25
D19S433	13, 14.2	13, 14	15, 19
SE33	13, 27.2	14, 28.2	18, 26
D22S1045	15, 16	15, 17	10, 13
DYS391	11, 11	-	-
FGA	20, 24	25, 26	17, 19
DYS576	19, 19	-	-
DYS570	18, 18	-	-

Аналізуючи відомості, наведені в таблиці, видно, що всі три варіанти мають унікальний генетичний профіль за 26 (варіант 1) та 23 (варіанти 2,3) ідентифікованими STR -локусами. Відмінності у кількості варіантів, як вже зазначено вище, пояснюються належністю варіанту 1 до ХУ, а варіантів 2 та 3 – до ХХ-геному.

Більшість локусів мають гетерозиготний стан, тобто представлені різними алелями. У варіанті 1 гомозиготних локусів – 5 (D2S441, D16S539, CSF1PO, TH01, TPOX), у варіанті 2 – 3 (D16S539, vWA, TPOX), у варіанті 3 – 3 (CSF1PO, D7S820, TPOX).

Звичайно, генетична вирівненість (гомозиготність) або поліморфність (гетерозиготність) окремих локусів має значення у порівняльному генетичному аналізі або з'ясуванні генетичних зв'язків і потребує репрезентативної вибірки варіантів. У нашому випадку це неможливо.

Але навіть по трьох наших варіантах видно, що абсолютна більшість локусів є поліморфними, представлені різними алельними варіантами, які навіть серед нашої обмеженої кількості зразків жодного разу не повторюються. Так, наприклад локус D13S317 має алельні типи:10,11,11,12,14,15. Або локус D2S1338: алелі 17,18,19,20,25 чи локус D12S391: алелі 15, 17, 18, 23, 25.

Узагалі, частоти зустрічальності алельних варіантів або варіабельності алелів для кожного локусу встановлюють шляхом популяційних досліджень референтної вибірки населення. Тому обмеженість аналізованих нами варіантів дозволяє лише зробити припущення о можливості використання методу в подібних дослідженнях.

Звичайно, схожість між окремими локусами за алельністю є абсолютно випадковою у нашому дослідженні. Але створені профілі завжди можна використати за потреби для аналізу з іншою метою, наприклад для пошуку родинних зв'язків, де схожість між алелотипом є визначальною.

Загалом, отримані результати та складені профілі дозволяють визначити аналізовані STR-локуси як зручний матеріал не лише для генетичної ідентифікації, але і для визначення спектру алельної мінливості та генетичної варіабельності.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Для створення здорових та безпечних умов праці організація обіцяє:
[32, 33]:

Створювати умови праці на робочому місці кожного структурного підрозділу відповідно до нормативно-правових актів та дотримуватися вимог законодавства про права працівників у галузі охорони праці.

Забезпечити функціонування системи управління охороною праці, а саме:

1) відповідальних за виконання своїх обов'язків, прав і функцій, створити відповідні служби та призначити посадових осіб, які забезпечуватимуть вирішення певних проблем охорони праці.;

2) розробити за участю сторін колективного договору, реалізувати комплексні заходи щодо досягнення встановлених стандартів та підвищення існуючого рівня охорони праці;

3) забезпечити прийняття необхідних запобіжних заходів у відповідь на зміни ситуації;

4) впроваджувати передові технології, науково-технічні досягнення, засоби механізації та автоматизації виробництва, вимоги ергономіки, позитивний досвід в області охорони праці і т. д.;

5) забезпечувати належне утримання будівель і споруд, контроль технічного стану виробничого обладнання та оснащення;

6) забезпечити усунення причин, що призводять до нещасних випадків, професійних захворювань, і здійснення профілактичних заходів, визначених комісією на підставі висновків про ці причини;

7) Аудит охорони праці, лабораторне дослідження умов праці, оцінка технічного стану виробничого обладнання та оснащення, інспекція охорони праці відповідно до процедур і термінів, визначених законом.;

8) розробляє і затверджує положення, інструкції та інші акти з охорони праці, що діють в межах центру, і відповідно до нормативних правових актів

з охорони праці, на будівельних майданчиках, на промислових об'єктах, на території установи;

9) дотримання працівниками технічного процесу, правил поводження з верстатами, механізмами, обладнанням та іншими засобами виробництва, використання засобів колективного та індивідуального захисту, вимог охорони праці;

10) організувати пропаганду безпечних методів роботи та співпрацю з працівниками в галузі охорони праці;

11) вживати екстрених заходів з надання допомоги постраждалим і, при необхідності, залучати спеціалізовані аварійно-рятувальні підрозділи в разі аварій або нещасних випадків на підприємстві.

1.3 згідно з медичним висновком, не укладайте трудовий договір з особою, якій протипоказана пропонована робота за станом здоров'я.

1.4. Проводити інструктажі з охорони праці, протипожежного захисту та вступні інструктажі з працівниками установ Запоріжжя відповідно до законодавства.

При прийнятті на роботу працівників обов'язково проводити вступний інструктаж та ознайомлювати (під підпис) з умовами праці та наявністю на робочому місці небезпечних і шкідливих виробничих факторів, їх можливим впливом на здоров'я, а також правами та пільгами за роботу в таких умовах.

1.5. Не допускати до самостійного виконання робіт з підвищеною небезпекою осіб, які не пройшли спеціальне навчання.

1.6. Забезпечувати безоплатно визначені законодавством категорії працівників спецодягом, спецвзуттям, засобами індивідуального захисту відповідно до встановлених законодавством норм та лікувально-профілактичним харчуванням, молоком або рівноцінними харчовими продуктами.

1.7. Утримувати в належному стані місця загального користування згідно із санітарно-гігієнічними нормами.

1.8. Забезпечувати миючими засобами працівників, робота яких пов'язана із забрудненням.

1.9. Забезпечувати проведення попередніх і періодичних медичних оглядів працівників, а також виконання рекомендацій (висновків) медичних комісії за результатами огляду працівників.

1.10. Забезпечувати своєчасну підготовку необхідних документів про відшкодування працівникам збитків, нанесених унаслідок заподіяння шкоди їх здоров'ю при виконанні трудових обов'язків, відповідно до чинного законодавства.

1.11. Забезпечувати усіх працівників обов'язковим соціальним страхуванням від нещасних випадків і професійних захворювань. Страхування здійснюється в порядку і на умовах, що визначаються законодавством і цим Договором. Із фонду соціального страхування здійснюються виплати сум, які потрібно виплатити потерпілому працівникові за період його тимчасової непрацездатності або в порядку відшкодування шкоди та одноразової допомоги, передбаченої положеннями Закону України «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування»

1.12. Якщо комісією з розслідування нещасного випадку встановлено, що ушкодження здоров'я настало не тільки з вини роботодавця, а й унаслідок порушення потерпілим нормативно-правових актів з охорони праці, розмір одноразової допомоги зменшується на підставі висновку цієї комісії, але не більше, ніж на 50 відсотків [33, 34, 35].

2. Профспілка НДЕКЦ зобов'язується:

2.1. Здійснювати контроль за дотриманням законодавства про охорону праці, створенням безпечних і нешкідливих умов праці, належних санітарно-побутових умов, забезпеченням працівників установи, робота яких пов'язана з наявністю небезпечних і шкідливих виробничих факторів, засобами індивідуального захисту, спецодягом, спецвзуттям тощо в установлених законодавством випадках.

2.2. Проводити перевірки дотримання підприємством умов праці, вносити пропозиції щодо їх поліпшення, а в разі виявлення порушень - їх усунення.

2.3. Брати участь у розслідуванні нещасних випадків, професійних захворювань і аварій, у роботі комісії з питань охорони праці.

3. Сторони зобов'язуються:

3.1. Забезпечувати працівникам соціальні гарантії у галузі охорони праці на рівні, не нижчому за передбачений законодавством, комплексні заходи щодо досягнення встановлених нормативів безпеки, гігієни праці та виробничого середовища, підвищення існуючого рівня охорони праці, запобігання випадкам виробничого травматизму, професійного захворювання. Аваріям і пожежам, визначають обсяги та джерела фінансування зазначених заходів [36, 37, 38].

3.2. У встановленому законодавством порядку надавати роз'яснення працівникам закладу у частині застосування законодавства про охорону праці, санітарно-епідеміологічне благополуччя населення, а також щодо загальнообов'язкового державного соціального страхування від нещасних випадків.

4. Фінансування охорони праці:

4.1. Фінансування охорони праці здійснюється роботодавцем.

4.2. Фінансування профілактичних заходів з охорони праці, виконання загальнодержавної, галузевих та регіональних програм поліпшення стану безпеки, гігієни праці та виробничого середовища, інших державних програм, спрямованих на запобігання нещасним випадкам та професійним захворюванням, передбачається, поряд з іншими джерелами фінансування, визначеними законодавством, у державному і місцевих бюджетах.

4.3. Розмір витрат на охорону праці становить не менше 0,5 відсотка від фонду оплати праці за попередній рік [39, 40, 41].

Охорона праці в лабораторії:

Ті, хто пройшов вступний і основний інструктаж з охорони праці на робочому місці, спеціальне навчання, перевірку знань вимог охорони праці та стажування, можуть працювати в лабораторії.

У процесі роботи співробітники повинні проходити регулярні медичні огляди, повторні інструктажі з охорони праці, а також позапланові та цільові інструктажі відповідно до встановлених процедур [42, 43, 44].

Під час роботи працівники лабораторії можуть піддаватися впливу таких небезпечних і шкідливих виробничих факторів. Збільшення загазованості повітря в робочій зоні; збільшення напруженості магнітного поля; підвищення напруги електричного кола, її замикання може статися через організм людини;

Недостатнє освітлення робочої зони; підвищений рівень шуму;

Хімічна; нейропсихологічне перевантаження (емоційне перевантаження).

Працівники лабораторії повинні бути забезпечені засобами індивідуального захисту.

Співробітники робочої лабораторії використовують лабораторне обладнання тільки за прямим призначенням; знають правила і методи використання для перевірки ремонтпридатності ЗІЗ; вміють користуватися первинними засобами пожежогасіння; стежать за ремонтпридатністю і цілісністю заземлення корпусів електроприладів, електричних машин і обладнання; містять робоче місце в чистоті, в хорошому стані і чистоті, інструменти, приладдя, а також спецодяг, не приступайте до роботи в захисному взутті та інших ЗІЗ; не приступайте до роботи з невідомими речовинами і хімічними реактивами; не паліть у встановлених місцях; Дотримуйтесь і правила режиму праці та відпочинку [45, 46].

Працівникам лабораторії забороняється зберігати легкозаймисті рідини в лабораторії протягом 24 годин.

Співробітники, які пройшли спеціальну підготовку і мають відповідний сертифікат, можуть працювати в судинах високого тиску.

Співробітники, що займаються обслуговуванням електрообладнання та побутових приладів, повинні мати як мінімум групу з електробезпеки

Забороняється класти продукти на робочий стіл, розливати чай по лабораторному посуді або приймати їжу в приміщенні в лабораторних приміщеннях.

Співробітники, яким дозволено працювати з ртуттю, повинні пройти спеціальне навчання, інструктаж і перевірку знань з професійної підготовки та охорони праці [47, 48].

Про вихід з ладу лабораторного обладнання, механізмів, інвентарю, інструментів, засобів захисту, ЗІЗ, пожежної сигналізації та засобів пожежогасіння, а також про порушення цих інструкцій співробітники лабораторії повинні негайно повідомити керівника лабораторії (керівника робіт).

Забороняється залишати нагрівальний прилад без нагляду.

Всі працівники лабораторії повинні вміти надати першу допомогу потерпілому.

Якщо працівник лабораторії постраждав або захворів, він припиняє роботу, повідомляє про це свого безпосереднього керівника або керівника лабораторії та звертається за допомогою до медичного центру або найближчого медичного закладу.

Співробітники лабораторії повинні негайно повідомляти своє безпосереднє начальство або керівника лабораторії про будь-які нещасні випадки, що відбуваються в лабораторії, а також про будь-які ситуації, що загрожують життю і здоров'ю працівників лабораторії.

Співробітники лабораторії повинні стежити за ремонтпридатністю робочого одягу, своєчасно здавати її в хімчистку, прання і ремонт, а також зберігати в шафках для підтримки чистоти і охайності одягу.

Співробітники лабораторії несуть відповідальність за порушення вимог цієї Інструкції [49, 50, 51].

ВИСНОВКИ

1. Проведено ефективне виділення ДНК із клітин букального епітелію, що є критичним етапом для подальшого аналізу генетичного матеріалу.
2. Застосування методу ПЛР у реальному часі дозволило точно визначити концентрацію та якість отриманої ДНК. Цей підхід забезпечив швидке й надійне визначення кількісних та якісних параметрів генетичного матеріалу, важливих для подальшого аналізу.
3. На основі аналізу отриманих фореграм складено генетичний профіль людини за 26 поліморфними мікросателітними локусами. Показано відносний рівень поліморфізму окремих локусів.
4. Для якісної генетичної ідентифікації концентрація клітин у 3 одиниці на мікролітр не достатньо для отримання необхідного мінімального набору локусів. а у концентрації клітин у 5 одиниць можна отримати мінімальну необхідну кількість локусів. Мінімальна концентрація для повного генетичного профілювання становить 10 клітин, а ідеального - 40 одиниць на мікролітр.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для багатьох генетичних аналізів метод PCR потребує достатньої кількості ДНК. Мінімальна кількість клітин в залежності від поставлених цілей досліджень може варіюватись. Так в молекулярній генетиці для встановлення генетичних ознак людини в залежності від стану та якості ДНК може знадобитись різна кількість клітин. Зазвичай, для надійних результатів потребується від 40 до 100 клітин.

2. Отримані дані можуть бути корисними для покращення навчального процесу у вищих навчальних закладах, зокрема для підвищення якості викладання таких предметів, як «Генетика», «Організація геному», «Геноміка», «Медична генетика», «Етнічна генетика», «Кримінальна генетика».

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Генетика: курс лекцій для студентів III курсу біологічного факультету денної та заочної форми навчання: навчальний посібник / Т.П. Лісовська. Луцьк: Друк ПП Іванюк В.П. 2014. 180 с.
2. Kevin Ahern, Indira Rajagopal, Taralyn Tan Polymerase Chain Reaction (PCR) is licensed CCBY-NC-SA-4.0. 2023. P. 3. URL: <http://biochem.science.oregonstate.edu/content/biochemistry-free-and-easy>.
3. Badr Alanazi Polymerase chain reaction (pcr). King Saud University, June, 2023. P.6
4. Hanliang Zhu, Haoqing Zhang, Ying Xu, Sona Lassakova, Marie Korabecna & Pavel Neuzil PCR past, present and future. *BioTechniques*. 2020. Vol. 69, №4. P. 1–3.
5. Jeffreys A J, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA finger printing of single cells. *Nucleic Acids Res*. 1988. Vol. 16, № 23. P. 10953–10971.
6. Siegel J A, Saukko P J, Houck M M (Eds) Encyclopedia of Forensic Sciences (2nd Edition). *Academic Press*, MA, USA. 2013. P. 86.
7. Ladas I, Yu F, Leong K Wetal Enhanced detection of microsatellite instability using pre-PCR elimination of wild-type DNA homo-polymers in tissue and liquid biopsies. *Nucleic Acids Res*. 2018. Vol. 46, № 12. P. 74
8. Butler J M, Buel E, Crivellente F, McCord B R Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*. 2004. Vol. 25, № 10–11. P. 1397–1412.
9. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993. Vol. 11, № 9. P. 1026–1030.

10. Bustin S A, Benes V, Garson J A et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55, № 4. P. 611–622.
11. Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: a technology review. *Sensors.* 2018. Vol. 18, № 4. P. 1271.
12. Shin Y, Kim J, Lee TY. A solid phase-bridge based DNA amplification technique with fluorescence signal enhancement for detection of cancer biomarkers. *Sensor Actuat. B-Chem.* 2014. Vol. 199. P. 220–225.
13. Sidstedt M, Radstrom P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020. Vol. 412. P. 2009–2023.
14. Green M R, Sambrook J. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of GC-rich templates. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019. № 2. P. 167–168.
15. Cornelis S, Fauvart M, Gansemans Y et al. Multiplex STR amplification sensitivity in a silicon microchip. *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 9853.
16. Kanwar N, Michael J, Doran K, Montgomery E, Selvarangan R. Comparison of the ID Now influenza A & B 2, Cobas influenza A/B and Xpert Xpress Flupoint-of-care nucleic acid amplification tests for influenza A/B virus detection in children. *J. Clin. Microbiol.* 2020. Vol. 58, № 3. P. 1611–1619.
17. Sorek N, Ashkenazi S, Livni G, Ben-Zvi H. Neisseria meningitidis and cytomegalovirus simultaneous detection in the filmarray meningitis/encephalitis panel and its clinical relevance. *ID Cases.* 2019. № 17. P. 516.
18. Jumpupto Cai Hy, Caswell J L Prescott J F Nonculture molecular technique for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Veterinary pathology.* March 2014. Vol. 51, № 2. P. 341–350.
19. Kwok S, Mack DH Mullis KB Poiesz B, Ehrich G, Blair D, et al. Identification of human immunodeficiency virus sequence by using in vitro

enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *Journal of virology*. May 1987. Vol. 61, № 5. P. 1690–1694.

20. Yeh, Sylvia H, Mink, ChrisAnna M, «Bordetella pertussis and pertussis (whooping Cough)». *Netter's infectious Disease*. 2012. P. 11–14.

21. Polymerase Chain Reaction (PCR) Mohammad Azeem Azeemi. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. Nov, 2020. Vol. 6, № 11. P. 9.

22. Основи молекулярної біології–1. Молекулярна біологія ДНК: лабораторний практикум: навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / А. І. Степаненко, О. Р. Лахнеко, Л. В. Маринченко, М. О. Банникова. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2021. 70 с.

23. Генетичні дослідження в Україні. Аналіз ДНК на батьківство (материнство) і спорідненість – як зробити тест ДНК. URL: <https://dnk-test.com.ua/ua/blog/genetichni-doslidzhennya-v-ukrayini> (дата звернення 25.09.2023.).

24. Основи судової медицини: навчально-методичний посібник / Л.Л. Голубович, В.О. Ольховський, О.І. Герасименко. П.Л. Голубович, А.Л. Голубович та ін. Харків: ФОП Бровін О.В., 2021. 535 с.

25. Сучасні проблеми молекулярної біології: підручник студентам біологічних, медичних, фармацевтичних факультетів ВНЗ 3-4 рівнів акредитації. С. І. Дубінін, В.О. Пілюгін, А.В. Ваценко, Н.А. Улановська-Циба, Н.О. Передерій, Полтава, 2016. С. 393.

26. Біологія з основами генетики: навч.-метод. посіб. для студ. фарм. ф-т. спец.: «Фармація», «Технологія парфумерно-косметичних засобів» / А. Б. Приходько, Т. И. Емец, В. И. Павличенко, М. В. Стеблюк, А. П. Попович, А. Ю. Малеева. Запоріжжя : ЗДМУ, 2016. 145 с.

27. Медична біологія: підручник. / за ред. В. П. Пішака, Ю. І. Бажори. Вінниця: НОВА КНИГА, 2004. 656 с.

28. ПЛР-діагностика: принципи, досягнення та перспективи. О.М. Олещук, А.Є. Мудра, Н.Б. Зозуляк. Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського. *Експериментальна та клінічна біохімія*. Тернопіль, 2014. С. 97–103.
29. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія: підручник. Київ: ВПЦ «Київський університет», 2008. 384 с.
30. Мартиненко О.І. Методи молекулярної біотехнології: лабораторний практикум / за наук. ред. чл.-кор. НАН України, проф. Д.М. Говоруна. Київ: Академперіодика, 2010. 232 с.
31. DNA-database management review and recommendations. ENFSI DNA Working Group. 2012. URL: <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2021/09/ENFSI-DOCUMENT-ON-DNA-DATABASE-MANAGEMENT-2019.pdf>
32. Van Oorschot R. A, H, Ballantyne K.N., Mitchell R. John. Forensic Trace DNA: a review. *Invest. Genetics*. 2010. P. 1.
33. Raymond J.J. A criminalistic Approach to biological evidence: trace DNA and volume crime offences. Sydney, 2010. 266 p.
34. Roland A.H. van Oorschot, Kaye N., Ballantine, R., John Mitchel. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*, 2010. P. 14.
35. Криміналістичне дослідження ДНК : технології та можливості : навч. посіб. / Р. Л. Степанюк, С. І. Перлін, В. В. Кікінчук та ін., МВС України; Харків. нац. ун-т внутр. справ; Харків. НДЕКЦ МВС України. 2-ге вид., перероб. та допов. Харків, 2022. 120 с.
36. Михайличенко Б.В., Мішалов В.Д., Біляков А.М., Войченко В.В. Судово-медична експертиза об'єктів біологічного походження за STR локусами ядерної ДНК з використанням полімеразно-ланцюгової реакції: навчально-методичний посібник. Київ, 2012. 83 с.
37. Стегній Б. Т., Герілович А. П., Лиманська О. Ю. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях. Харків: НТМТ, 2010. 227 с.

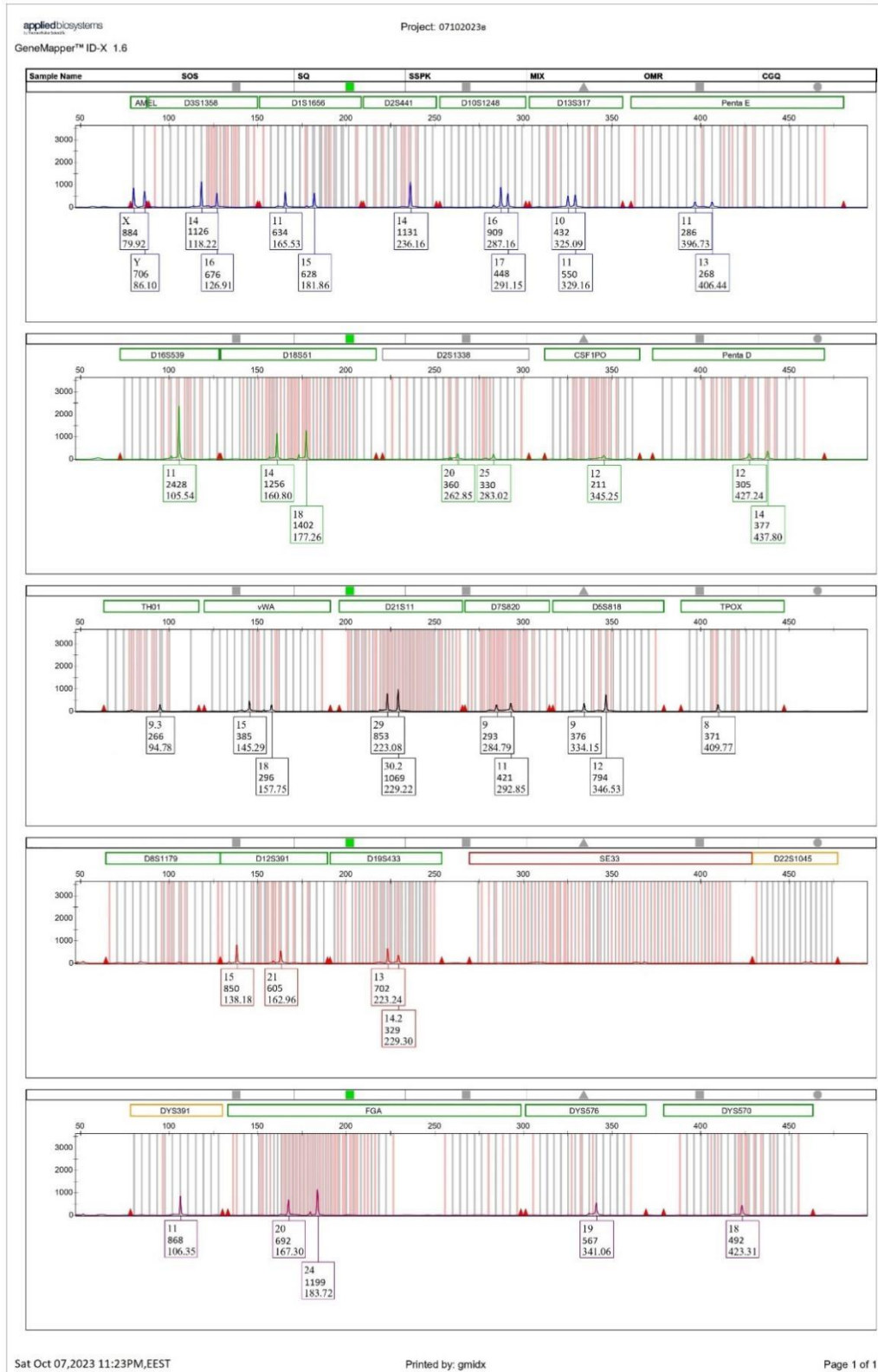
38. Базиліук Ж.І. Еволюція методів секвенування днк та перспективи їх використання в судовій молекулярно-генетичній експертизі. *Young Scientist*. November, 2020. Vol. 11, № 87. P. 123-126.
39. McKiernan H., Danielson P. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*. 2017. P. 371–394.
40. Дослідження методом ПЛР. URL: <https://umedlab.com.ua/analizi/doslidzhennya-metodom-plr/> (дата звернення 14-15 жовтня 2023)
41. Використання методу полімеразної ланцюгової реакції реального часу для оцінки таксономічного складу мультикомпонентних пробіотиків, які використовуються в педіатрії / В.О. Кітам, Д.С. Янковський, В.П. Широбоков, Г.С. Димент та інші. *Сучасна педіатрія*. Україна. 2020. Т. 2. № 106. С. 69-82.
42. Yankovsky D.S., Zaets V.N., Zvarych V.A., Kitam V.O., Dyment G.S. Using Polymerase chain reaction for identifying bacterial content of multicomponent probiotics. *Sovremennaiia prdiatria*. 2012. Vol. 6, № 46. P. 65-68.
43. Šrůtková D., Španova A., Špano M., Dráb V., Schwarzer M., Kozaková H., et al. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *Journal of Microbiological Methods*. 2011. Vol. 87, № 1. P. 6–10.
44. Markiewicz L., Biedrzycka E. Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005. Vol. 14/55, № 4. P. 359–365.
45. Черевата Г. В., Говоруха О. Ю. Аналітичний метод полімеразної ланцюгової реакції : матеріали X Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Молодь: наука та інновації». Секція 20. Хімічні, біохімічні та медичні технології. С 528–529.

46. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and Proteins in the same single cell / Stahlberg A, Thomsen C, Ruff D, et al. *Clin Chem.* 2012. Vol. 58. P. 1682–1691.
47. Генетична медицина / Ю.І. Бажора, В.М. Запорожан, В.А. Кордюм та ін. / за ред. В.Н. Запорожена. Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2008. 432 с.
48. Державний науково-дослідний експертно-криміналістичний центр МВС України. URL: <http://ndekc.zp.ua/p/40-poslugy/index.html> (дата звернення 03.10.2023)
49. Охорона праці на підприємстві: що потрібно знати? URL: <https://te.dsp.gov.ua/ohorona-pratsi-na-pidpryyemstvi-shho-potribno-znaty/> (дата звернення 07.11.2023)
50. Навчання з питань охорони праці на підприємствах міста Запоріжжя. URL: https://zp.gov.ua/upload/editor/navchannya_z_pitan_ohoroni_prasi.pdf (дата звернення 09.11.2023)
51. Інструкція № 2 з охорони праці для працюючих в лабораторії. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Наказ від 21.06.2022. № 20. URL: https://icbge.org.ua/re/images/4/4c/Instruction_OP_02_Lab_2022-06-21.pdf

ДОДАТКИ

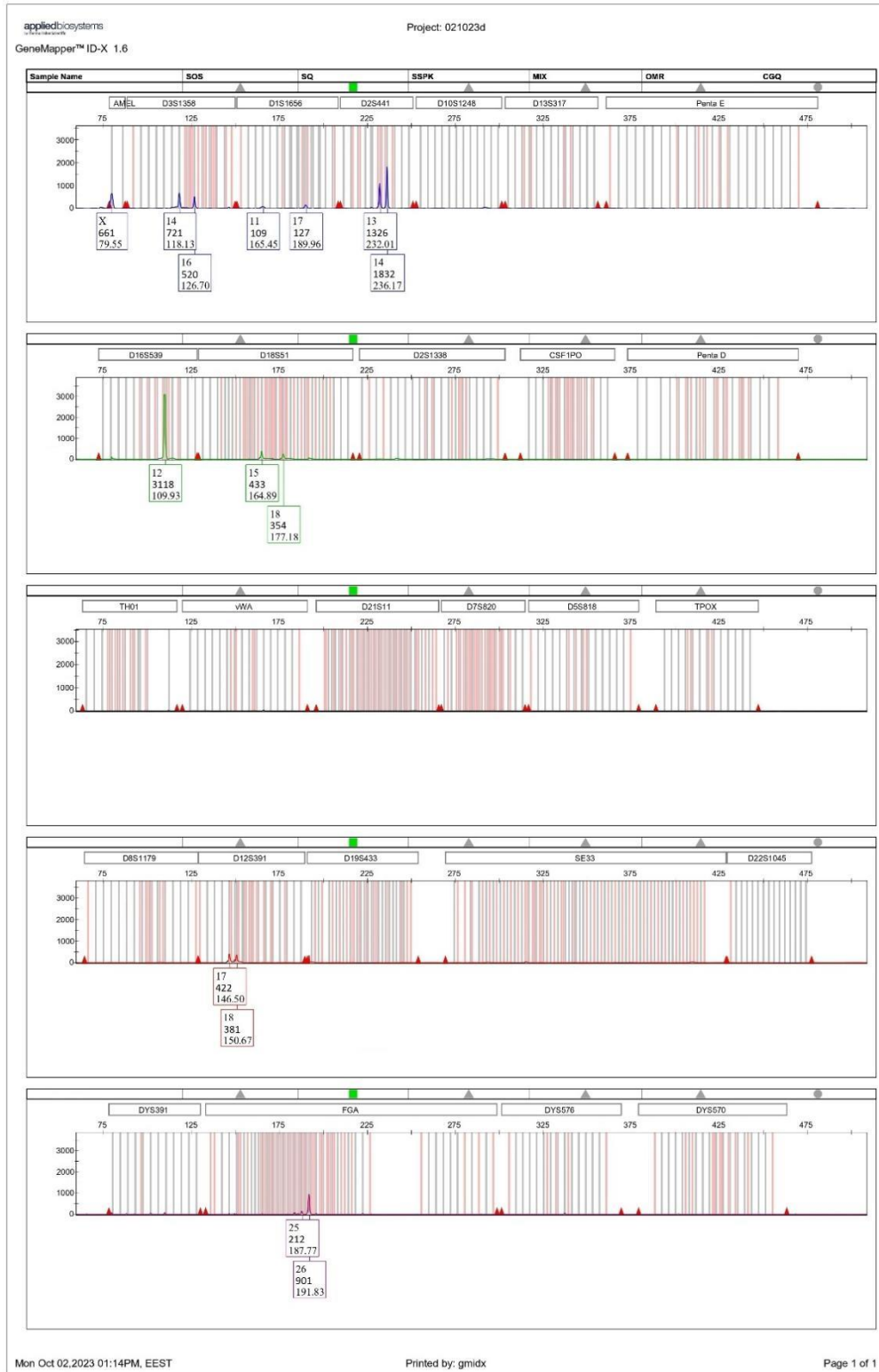
Додаток А.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (3 клітини)



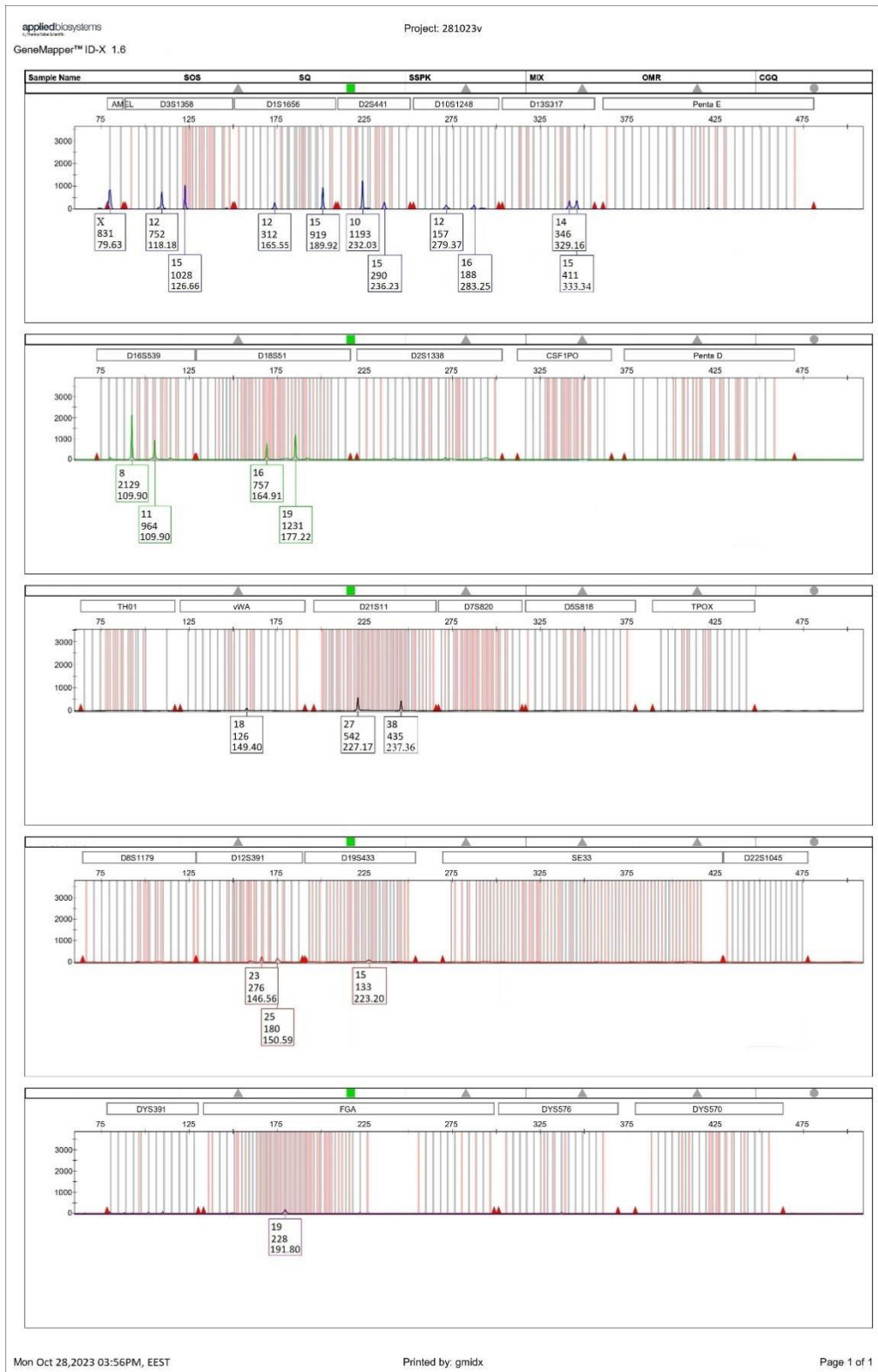
Додаток А.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (3 клітини)



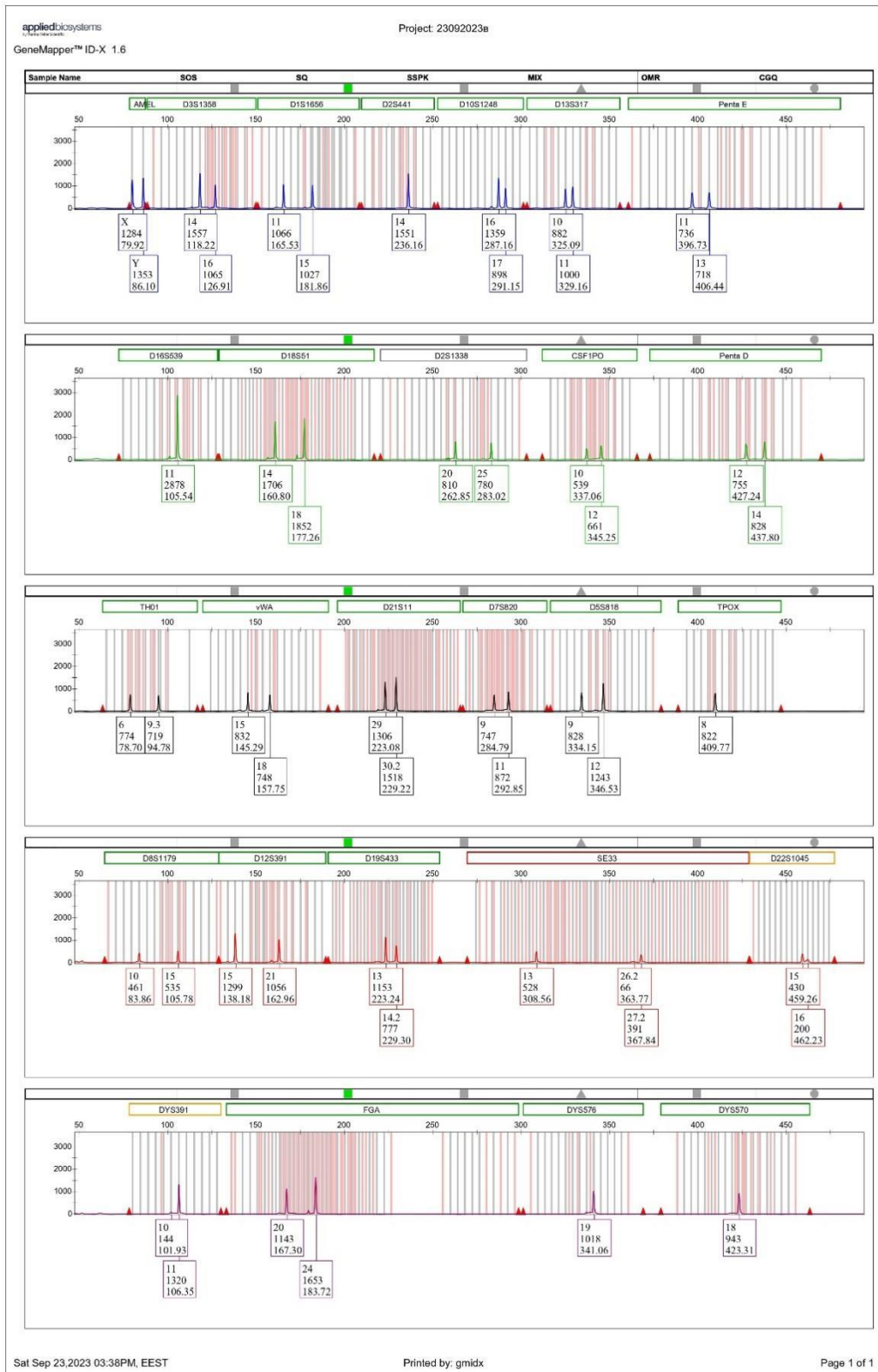
Додаток А.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (3 клітини)



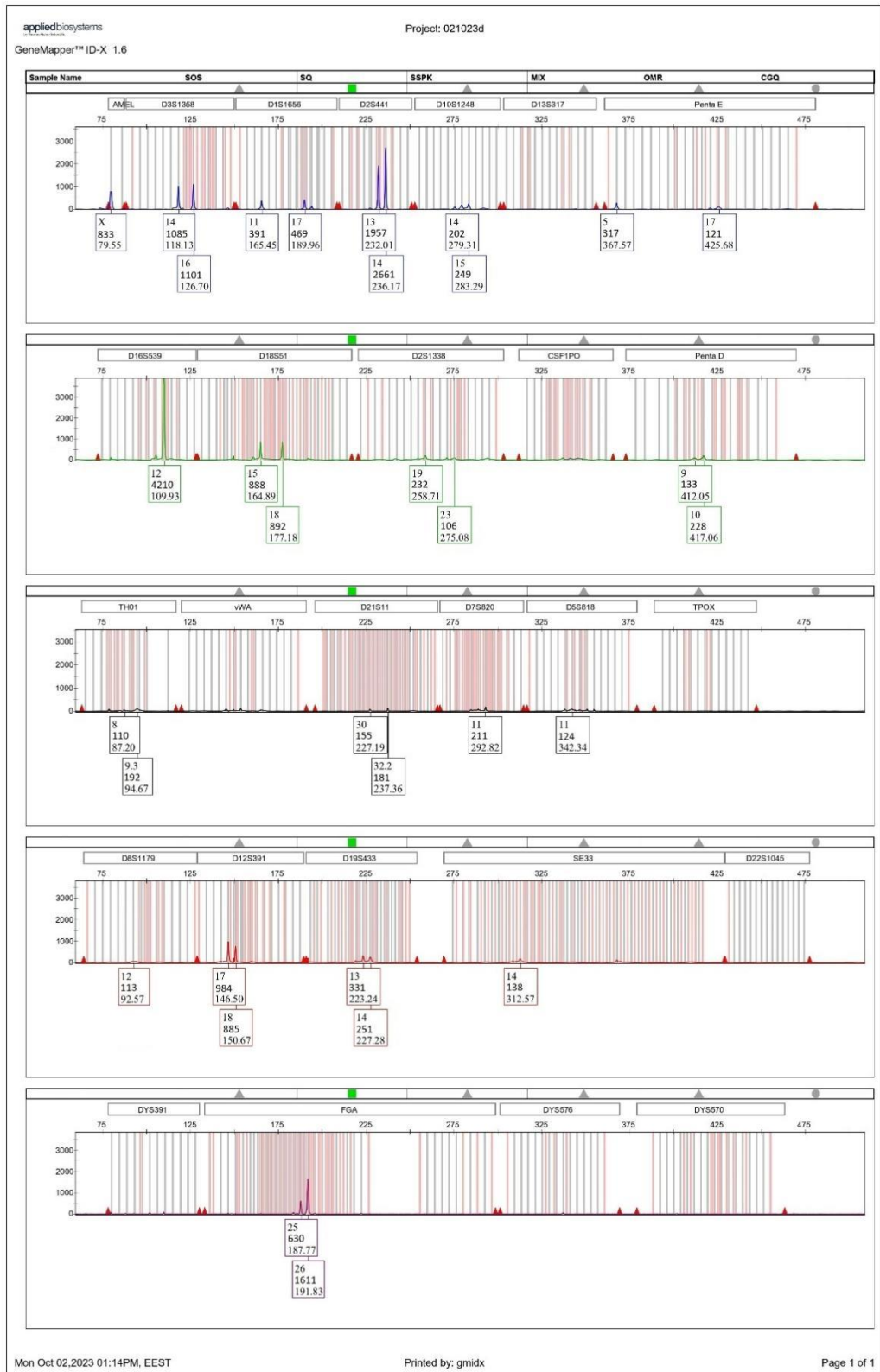
Додаток Б.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (5 клітин)



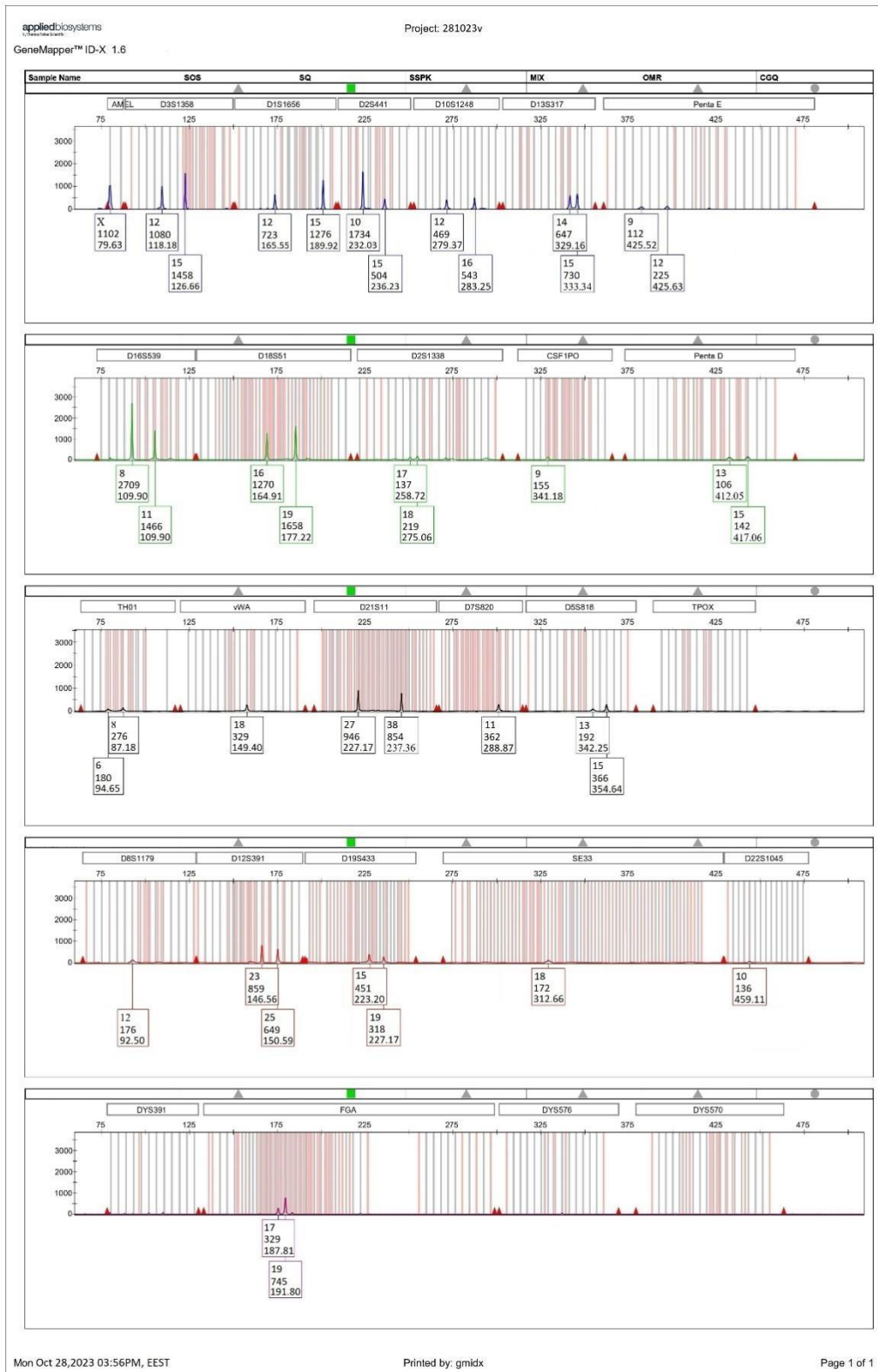
Додаток Б.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (5 клітин)



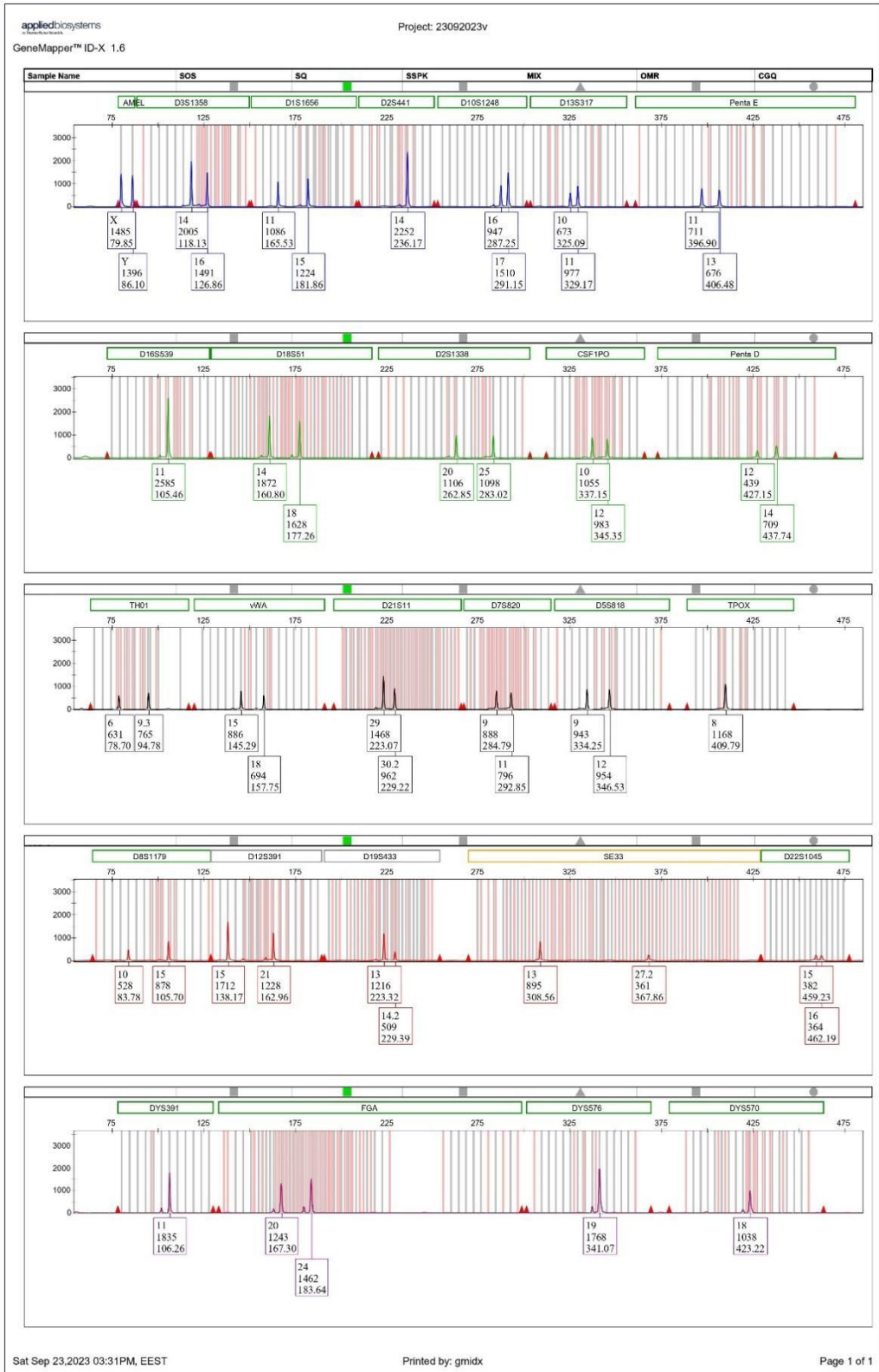
Додаток Б.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (5 клітин)



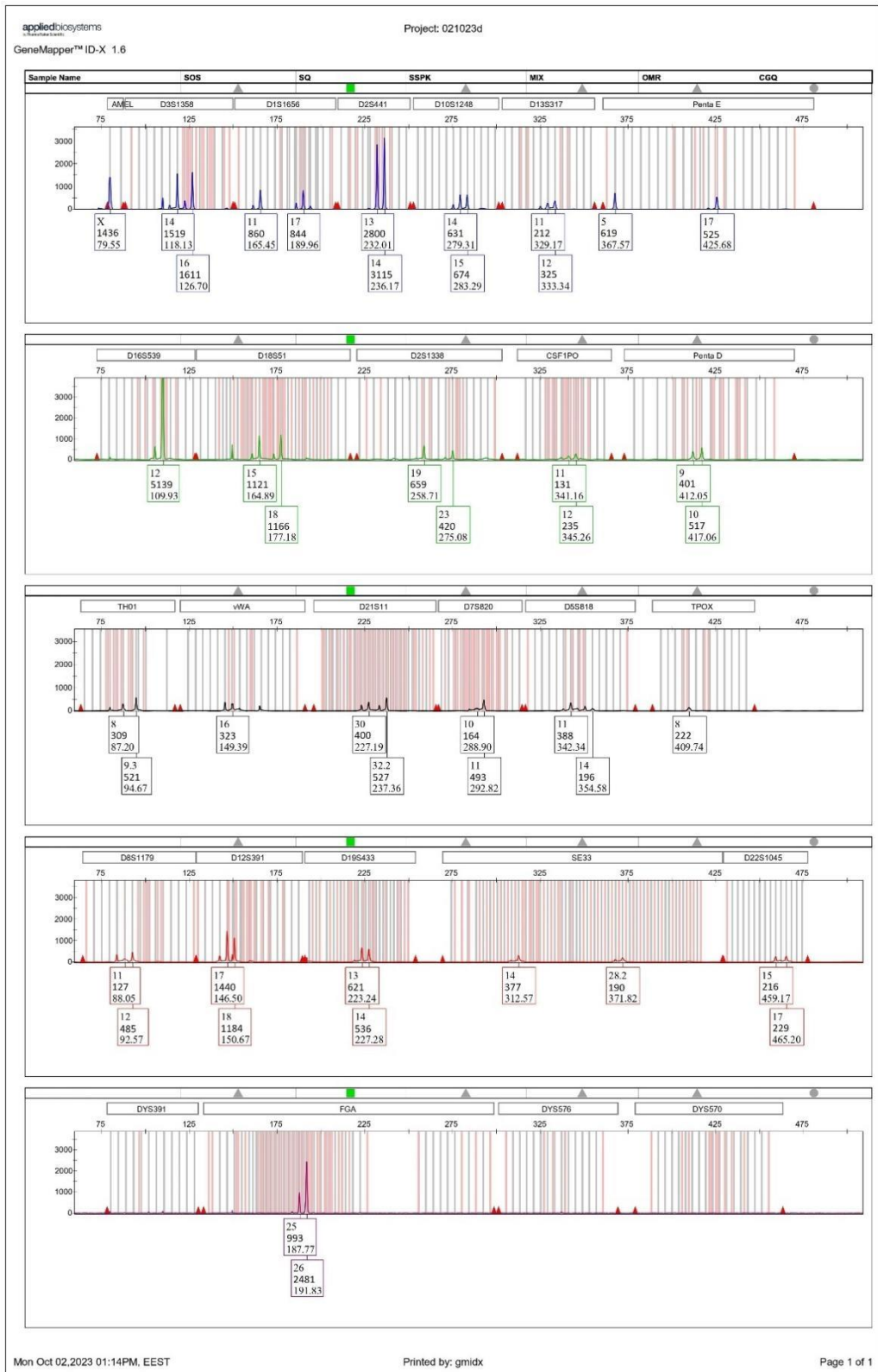
Додаток В.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (10 клітин)



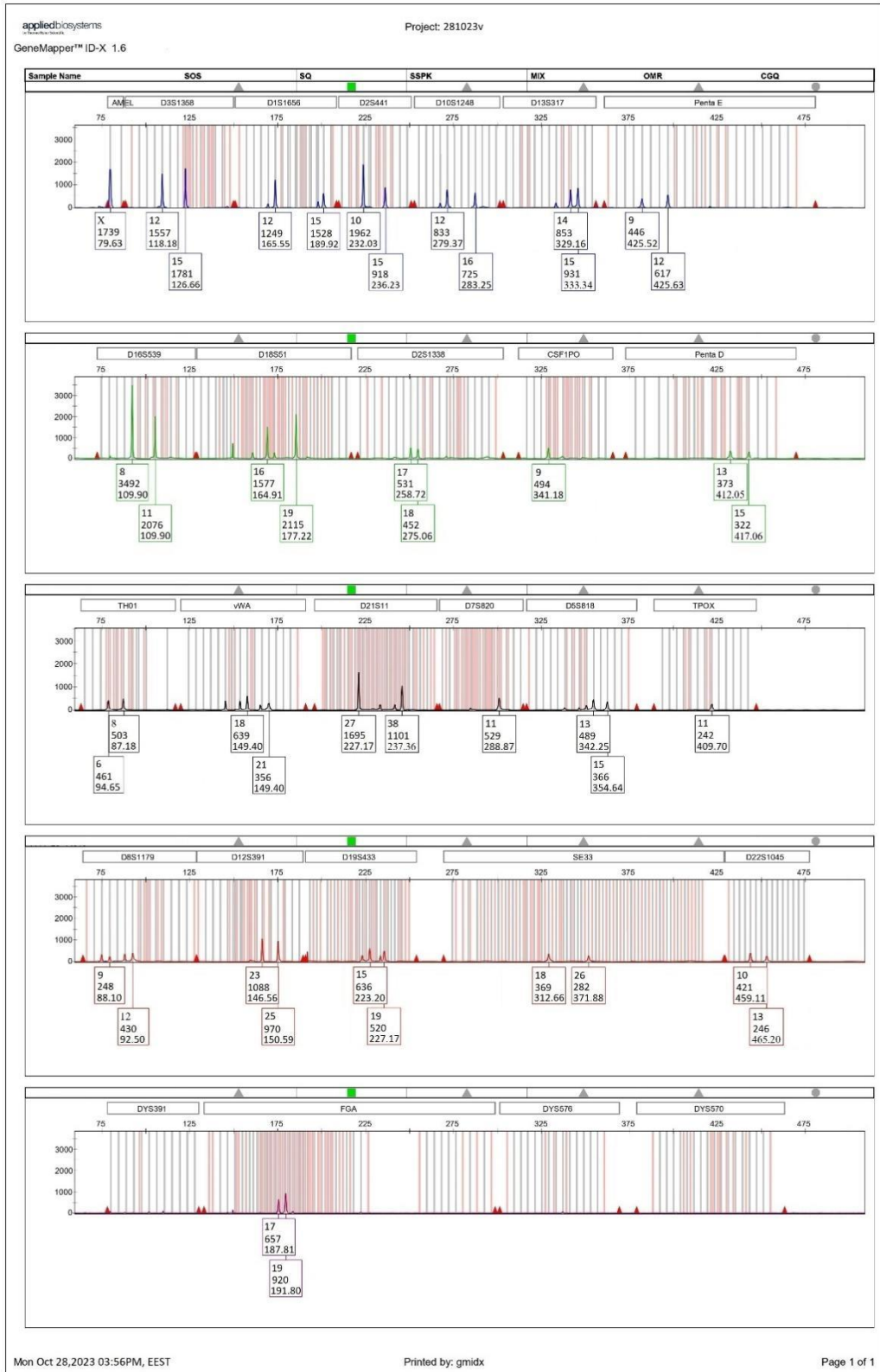
Додаток В.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (10 клітин)



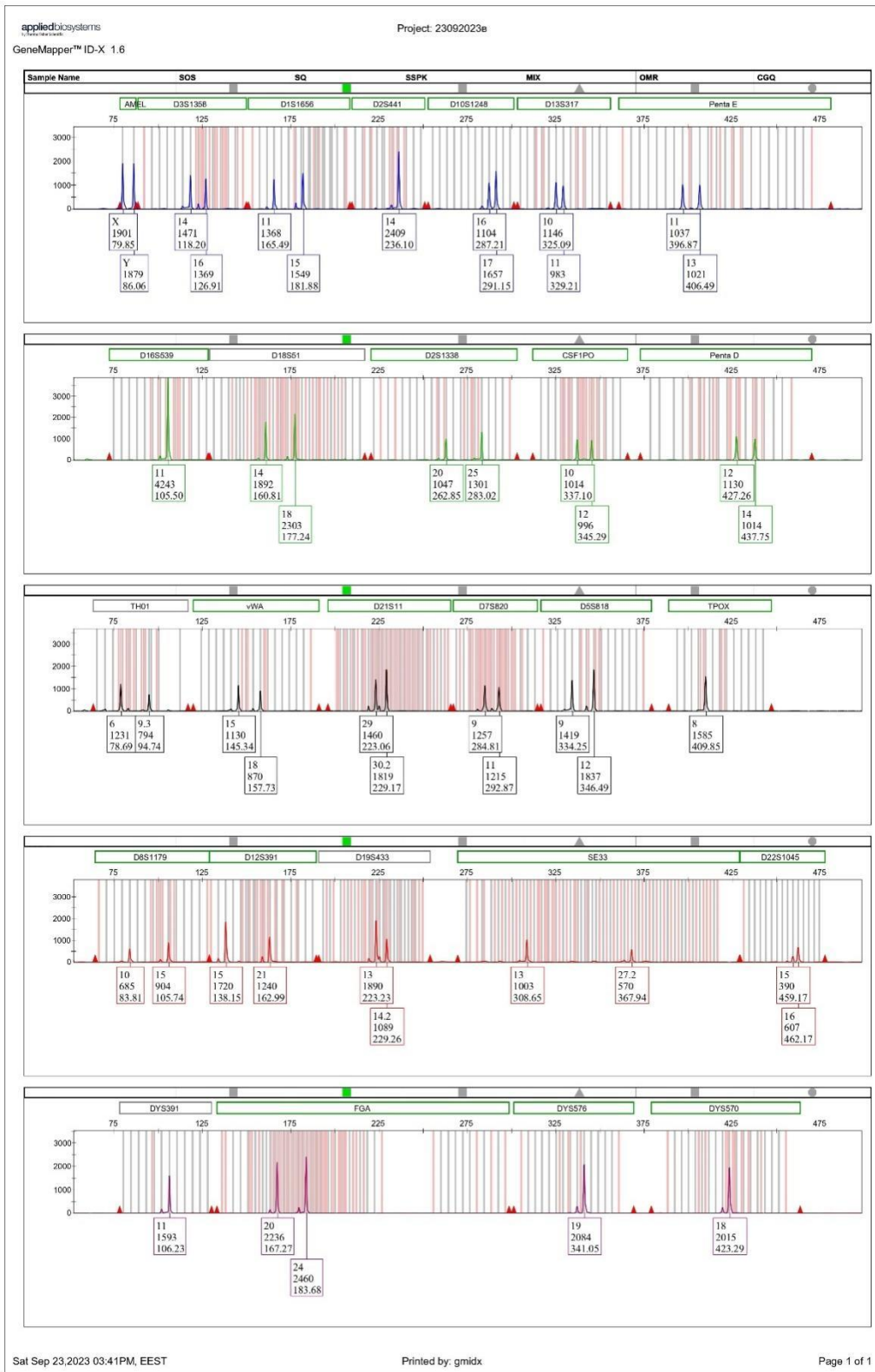
Додаток В.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (10 клітин)



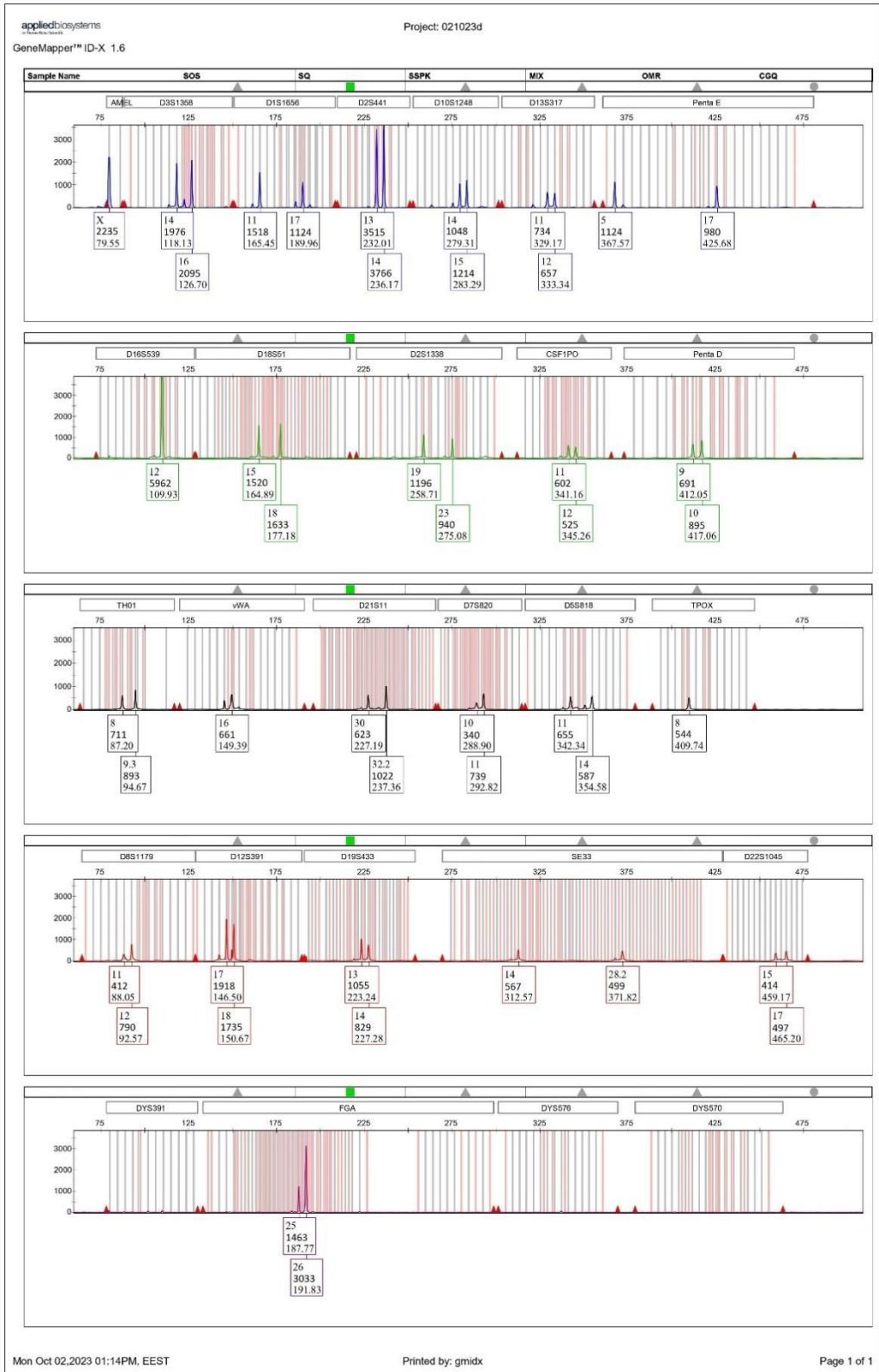
Додаток Г.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (20 клітин)



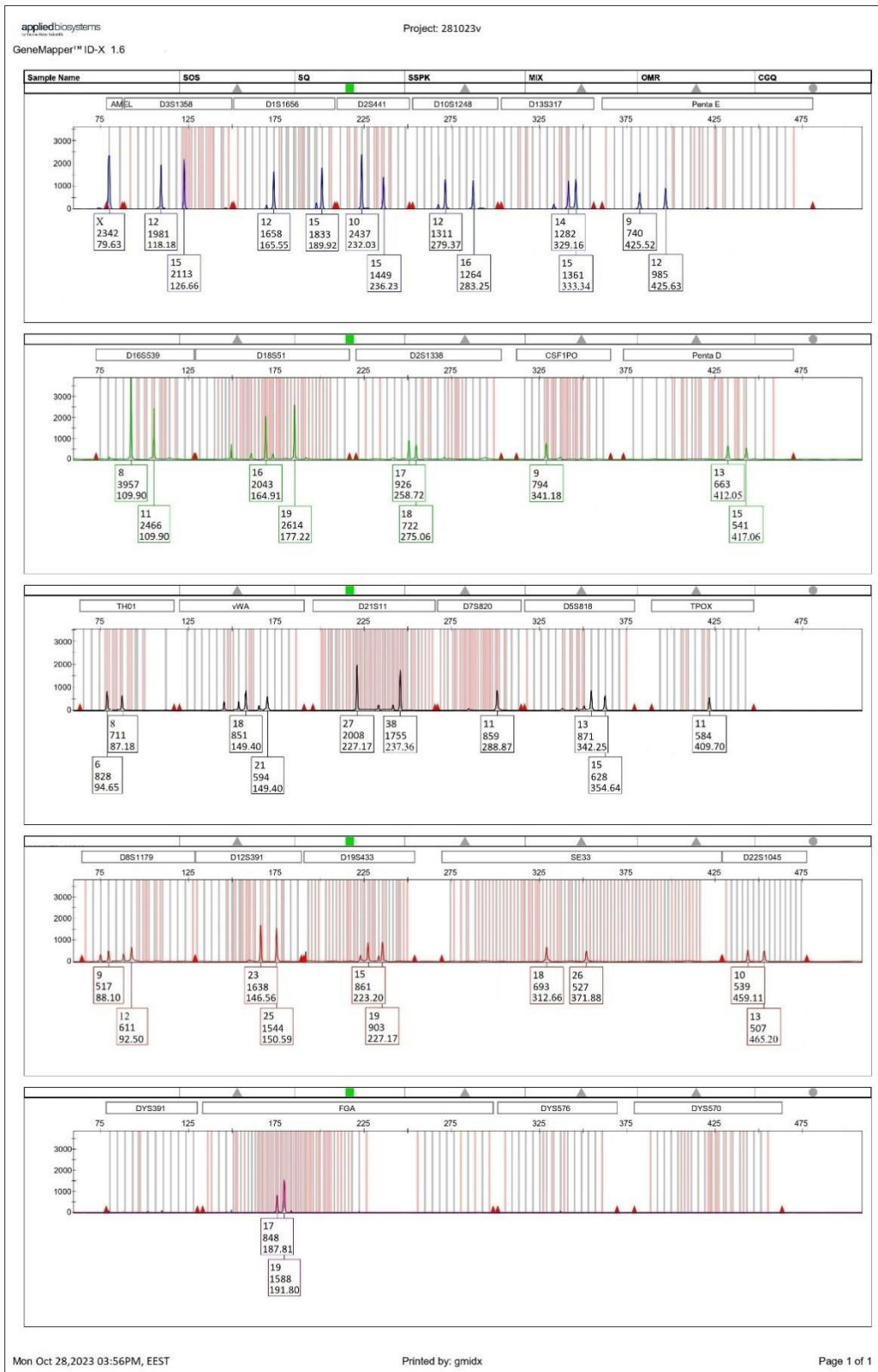
Додаток Г.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (20 клітин)



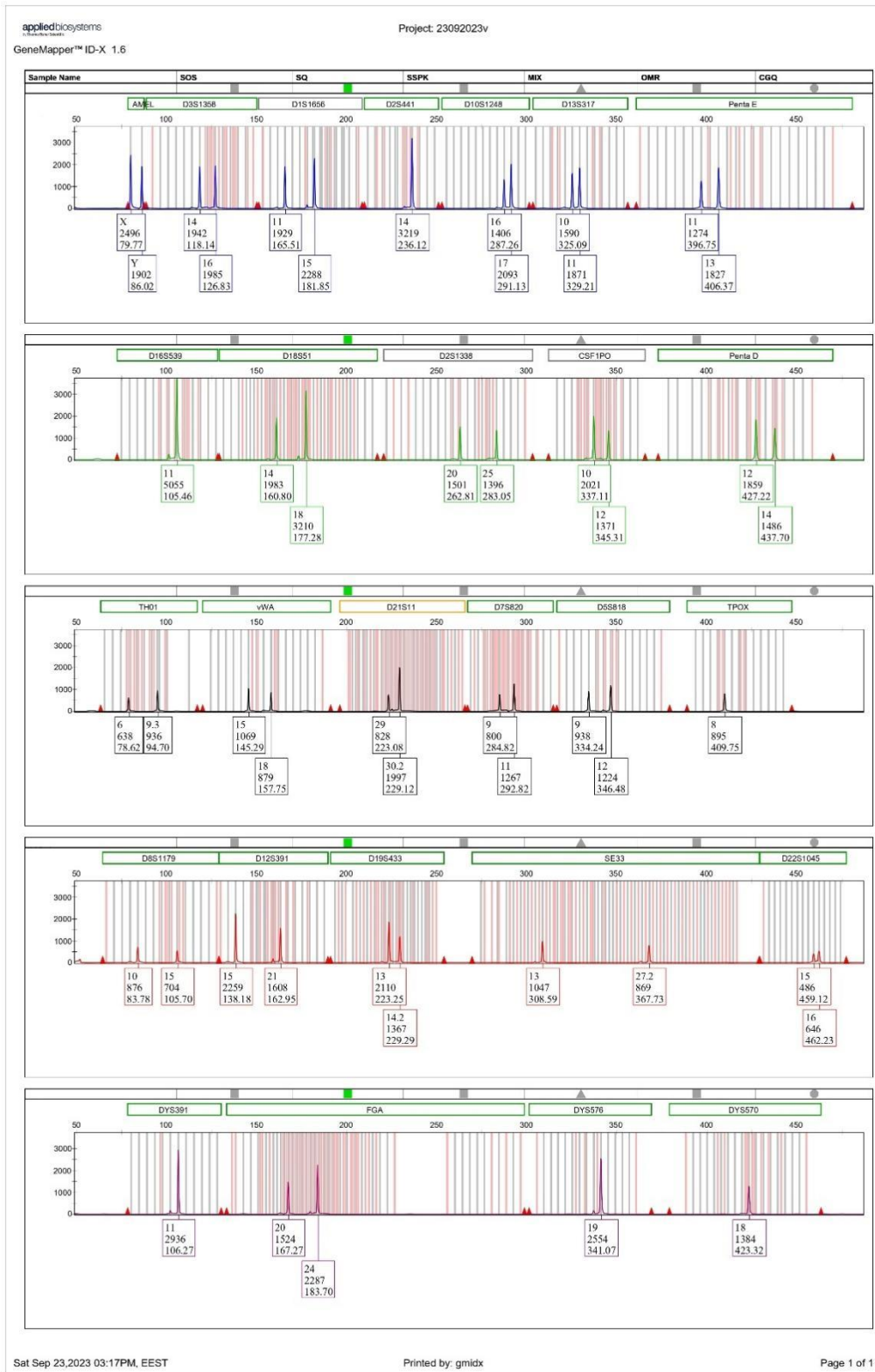
Додаток Г.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (20 клітин)



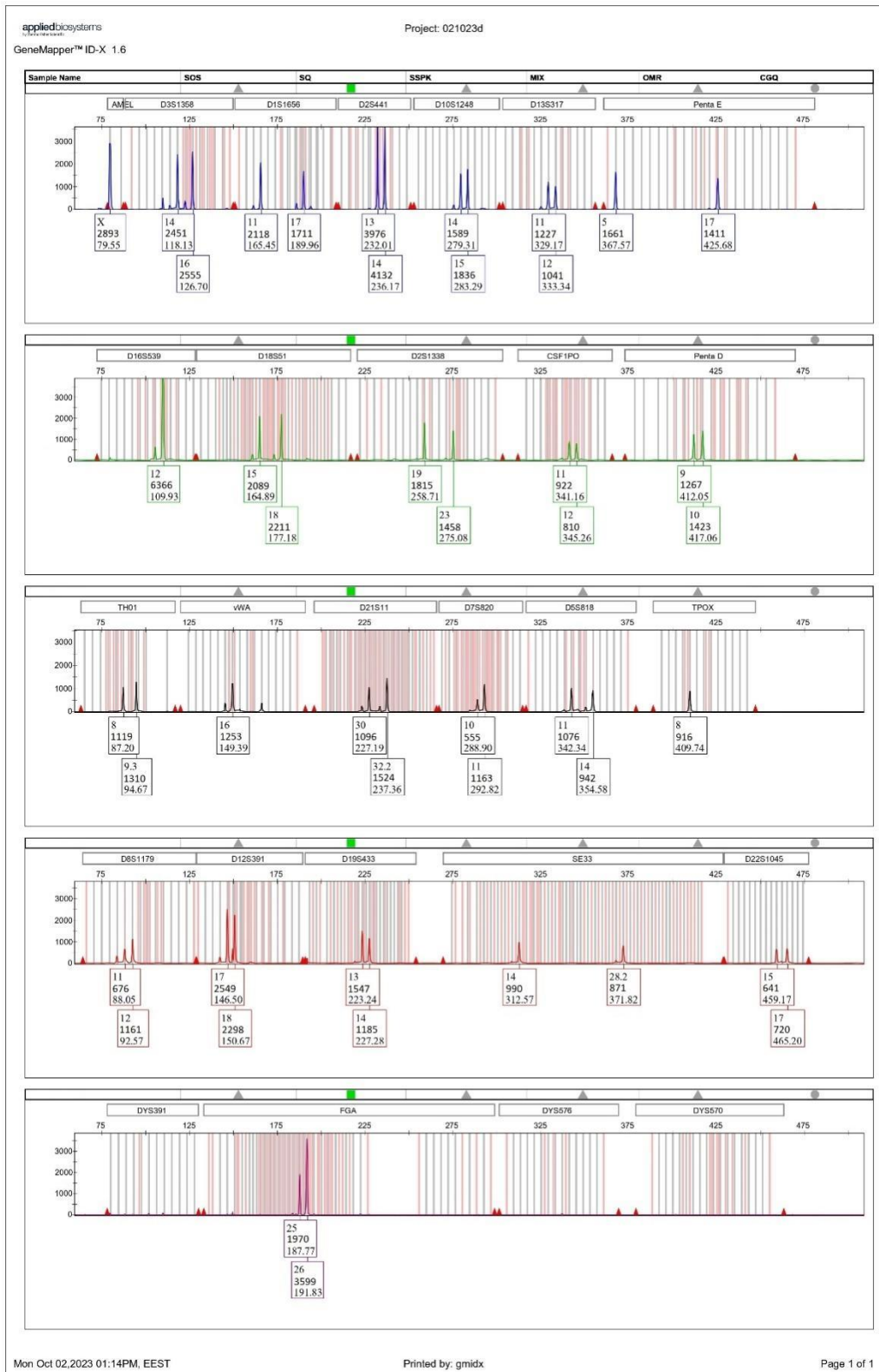
Додаток Д.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (30 клітин)



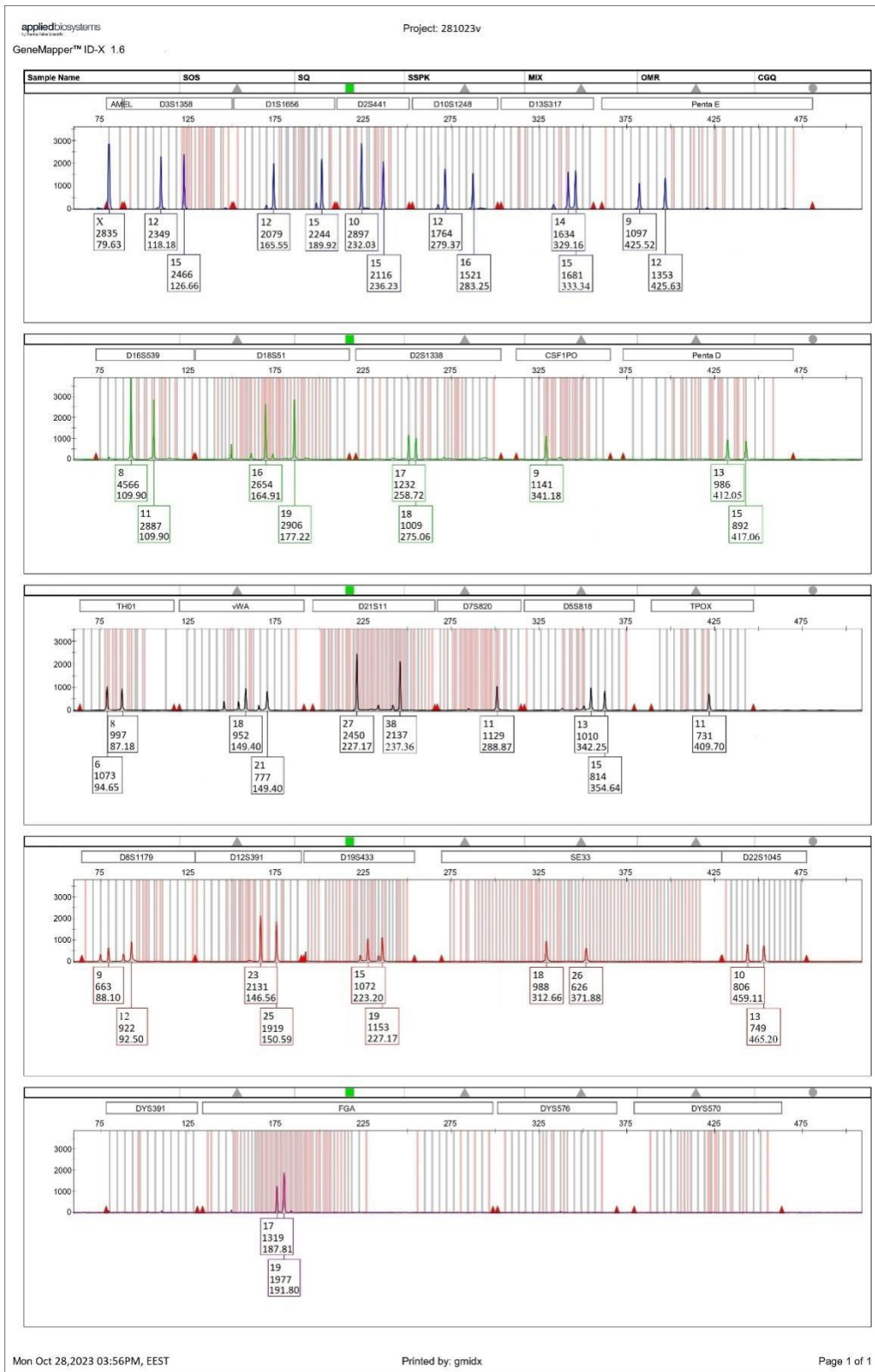
Додаток Д.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (30 клітин)



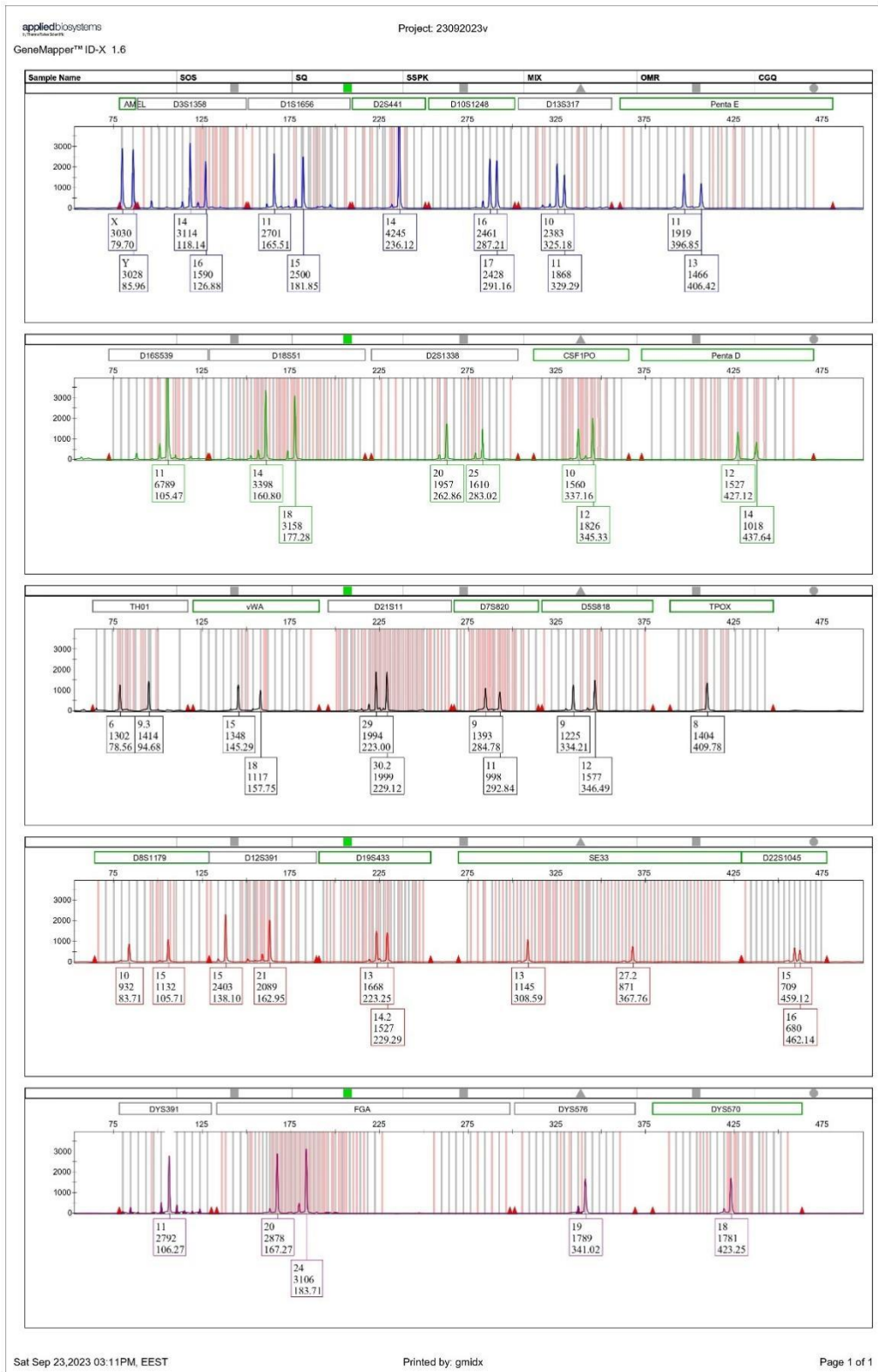
Додаток Д.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (30 клітин)



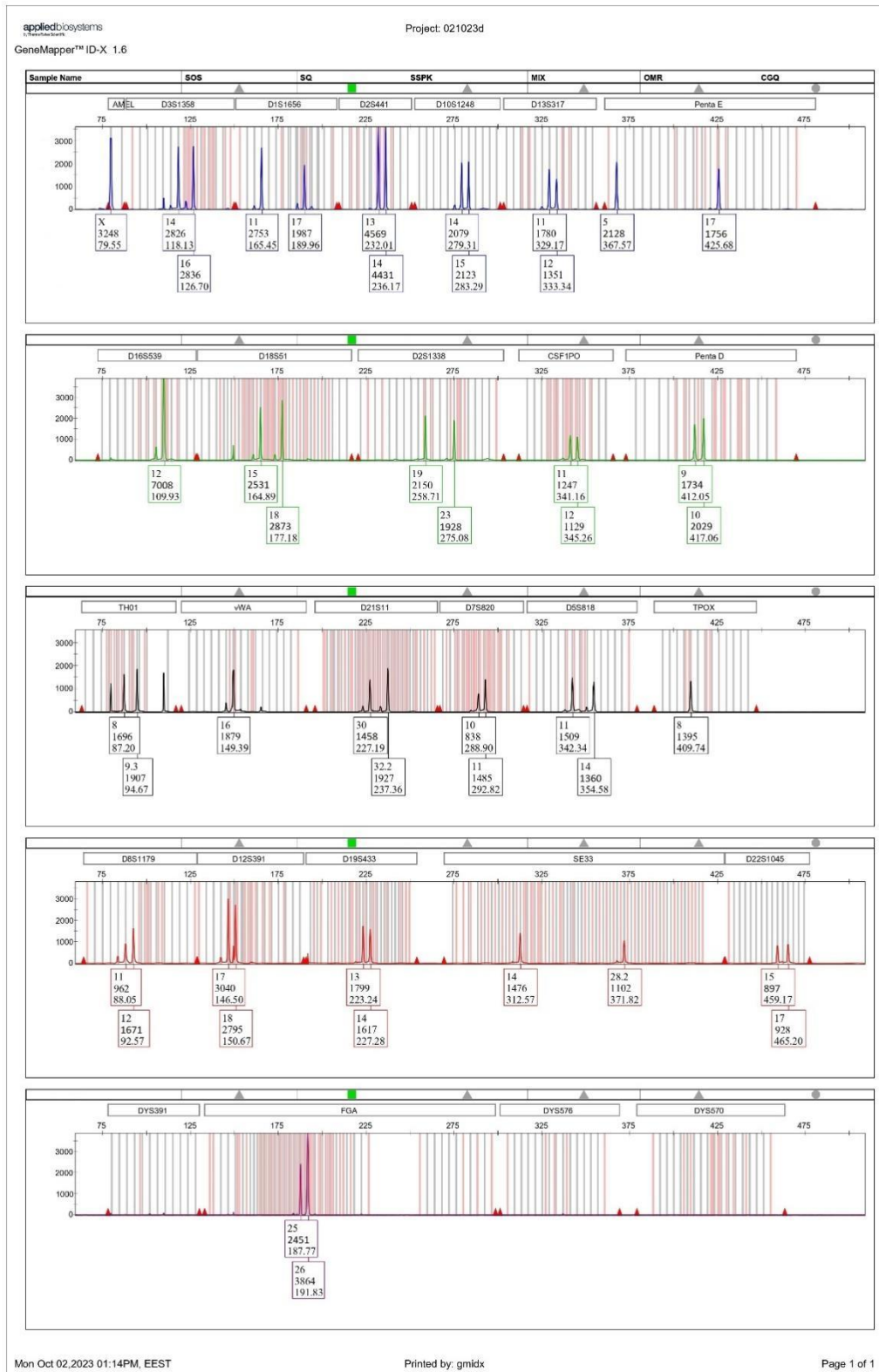
Додаток Е.1

Фореограма генетичного профілю дослід №1 (40 клітин)



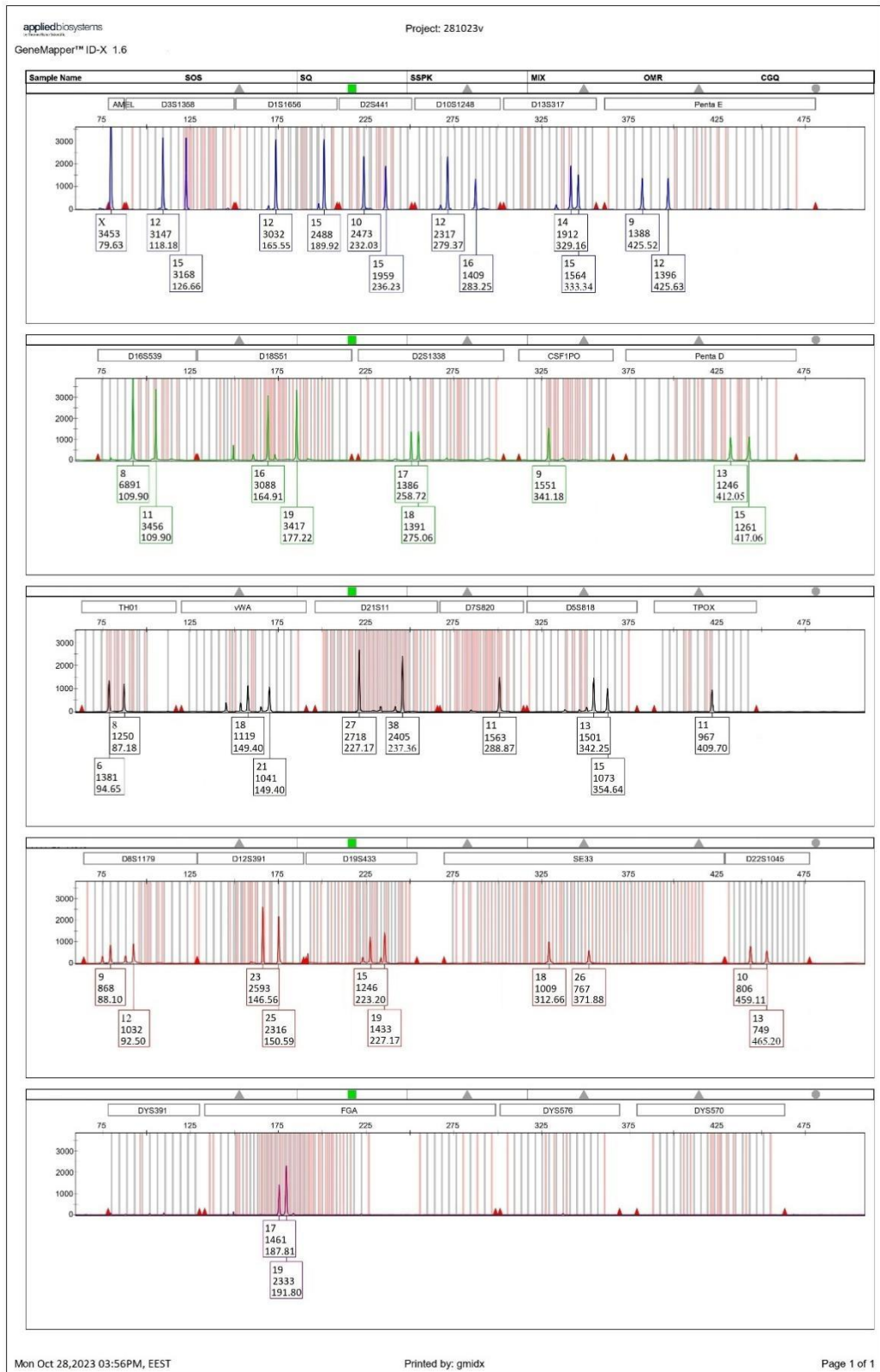
Додаток Е.2

Фореограма генетичного профілю дослід №2 (40 клітин)



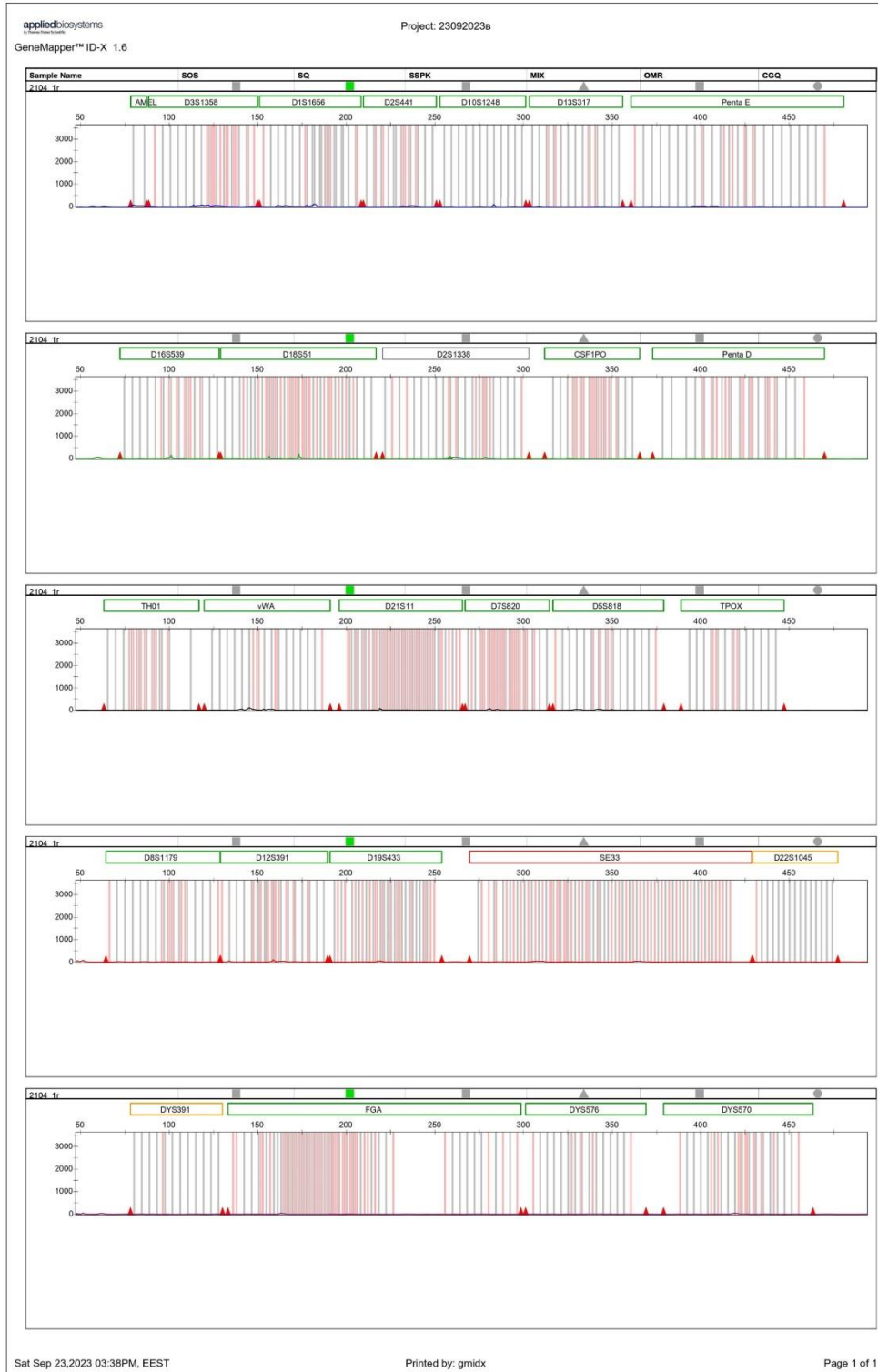
Додаток Е.3

Фореограма генетичного профілю дослід №3 (40 клітин)



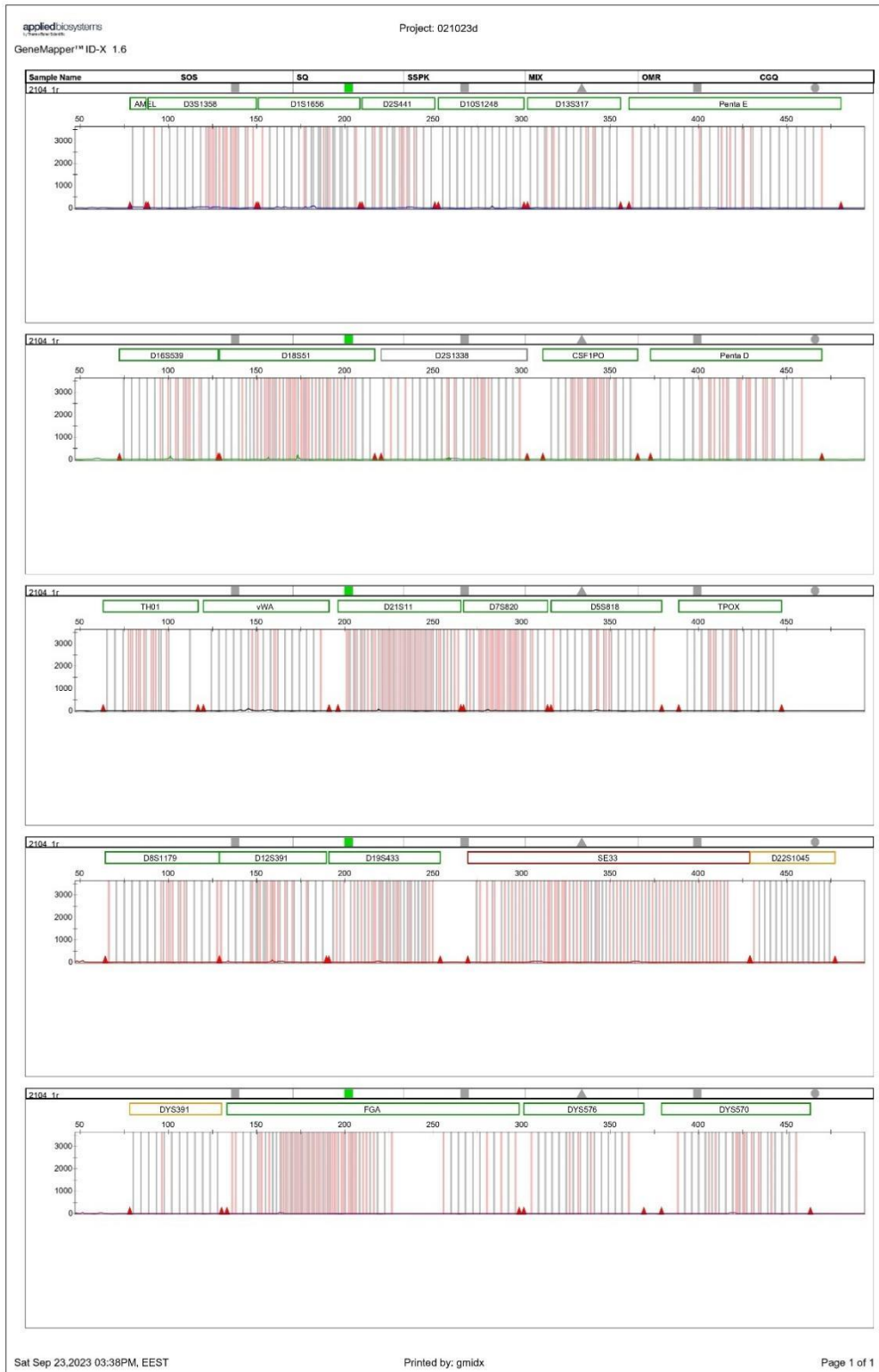
Додаток Є.1

Фореограма негативного контролю дослід №1



Додаток Є.2

Фореограма негативного контролю дослід №2



Додаток Є.3

Фореограма негативного контролю дослід №3

