



**Министерство юстиции Республики Узбекистан**

ГЕРМАНСКИЙ ФОНД  
МЕЖДУНАРОДНОГО ПРАВОВОГО  
СОТРУДНИЧЕСТВА



**Республиканский центр судебной экспертизы  
им. Х. Сулаймановой при Министерстве юстиции  
Республики Узбекистан**

# **СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В УЗБЕКИСТАНЕ**

**Материалы международной научно-практической конференции,  
(Узбекистан, Ташкент, 19-20 ноября 2013 года)**



## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Усманов А.А.</b> Приветственное слово заместителя министра юстиции Республики Узбекистан.....	5	<b>Маршанская О.П.</b> К вопросу о классификации следов и повреждений на транспортных средствах и на одежде и обуви пострадавших в ДТП .....	71
<b>Узаков У.Х.</b> Судебно-экспертная деятельность в Республике Узбекистан и перспективы её развития .....	8	<b>Ахмедова Р.К., Ветрова В.А., Кораблёва Н.В.</b> Определение фальсификации сливочного масла с помощью хромато-масс-спектрометри- ческого анализа.....	75
<b>Добровольски П.</b> О базе данных ДНК в Федеративной Республике Германия .....	19	<b>Сергеева Г.А.</b> Привлечение судебных экспертов в рамках судебных споров, связанных с залогом и ипотекой .....	79
<b>Рувин О.Г., Полтавский А.А.</b> К вопросу о понятии экспертной методики, её структуре и содержании.....	45	<b>Уразматов Ш.М., Медзвецкая Э.И., Холмухамедова С.К., Ахмедова Г.К., Саидов М.Д., Сагдуллаева С.В.</b> Исследование документов, используемых для совершения экономических преступлений в банковской сфере .....	83
<b>Абдуллаева М.У.</b> Значение научно- исследовательской работы в расширении возможностей судебной экспертизы .....	50	<b>Курганов С.К., Икрамов А.А., Ахмедова Д.Ш., Норматов А.Э., Филатова В.А., Мухамедова С.Ю., Тошева Д.М., Саитова Н.С., Пуллатов О.Р., Рузиев А.А., Ахмедов Б.Б.</b> Метод расчета вероятности родства с учетом микросателлитного локуса, подвергнутого мутации .....	86
<b>Ахмедова Р.К.</b> Методы исследования наркотических средств, психотропных веществ и прекурсоров. (Преимущества и недостатки) .....	54	<b>Ким Л.А.</b> Перспективы развития судебно-медицинской службы в Республике Узбекистан.....	88
<b>Норматов А.Э., Икрамов А.А., Ахмедова Д.Ш., Филатова В.А., Мухамедова С.Ю., Курганов С.К., Тошева Д.М.</b> Разработка новых модифицированных подходов экстракции ДНК из сильно- деградированных костных останков .....	57	<b>Кабилов Э.Ш.</b> Криминалистическая портретная экспертиза .....	91
<b>Погребняк А.И.</b> Установление признаков воздействия на аудиозаписи и важность сохранения их первоначального вида при производстве судебно- фонографических экспертиз .....	64	<b>Абдусаттаров М.М., Харабара Г.И.</b> Анализ работы судебно- психиатрических экспертных комиссий .....	94
<b>Бахтиярова Ф.А.</b> Возможности судебно-технической экспертизы документов .....	67		



2013 года). Для исследования были отобраны два фрагмента костных останков наиболее сохранившие морфологические свойства костной ткани (см. рисунок № 1).

Отобранные два костных фрагмента с помощью стерильного скальпеля очистили от остатков мышечной ткани и обработали спиртом. Экстракцию ДНК проводили:

1) Стандартным органическим методом выделения ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией – для исследования от каждого костного фрагмента спиливали по 1 г костного порошка и обозначили их как объекты № 1 и № 2;

2) Применяя модифицированный подход органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией – для исследования от каждого костного фрагмента спиливали по 150 мг костного порошка и обозначили их как объекты № 1а и № 2а;

3) Сочетая предварительную декальцинацию костной ткани и «магнитный» метод экстракции ДНК использованием лизирующего буфера «PrepFiler VTATM Lysis buffer» (2) и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США) (3) – для исследования от каждого костного фрагмента спиливали по 50 мг костного порошка и обозначили их объекты № 1б и № 2б.

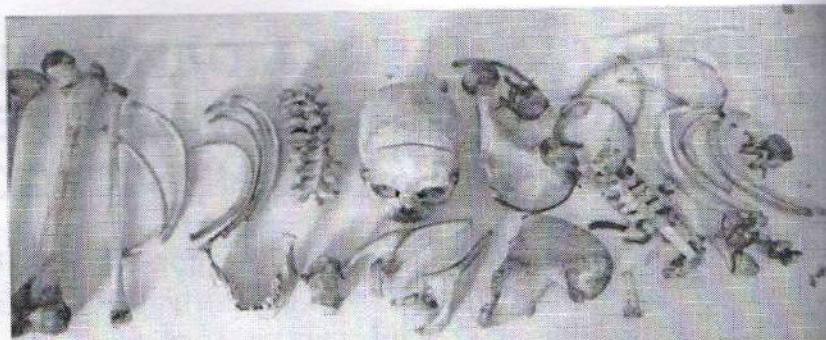
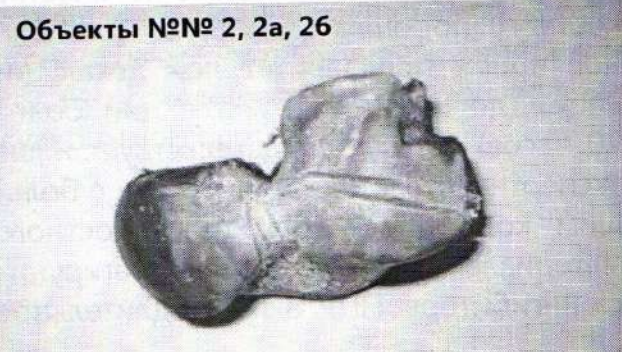
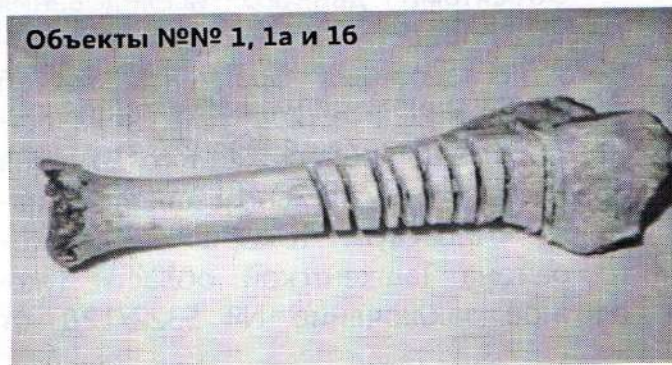


Рисунок № 1

**Стандартный органический метод экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией**

Для декальцинации к костному порошку в количестве 1 г (объекты № 1 и № 2), добавили по 5 мл 0,5М раствора ЭДТА (рН 7,5). Выдерживали в течение 24 часов при температуре +4°C на мешалке при покачивании. После этого пробирки центрифугировали в течение 15 – 30 минут при 3000 об./мин. Надосадочную жидкость сливали. Осадок промывали один раз 0,5М раствором ЭДТА (рН 7,5) и два раза деионизированной водой. В каждую пробирку по отдельности к осадкам добавляли по 2 мл лизирующей буферной смеси (состоящей из 10 мМТрис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМNaCl и 20% SDS), 200 мкл Протеиназы К (10мг/мкл) и 200 мкл свежеприготовленного 1М DTT. Выдерживали в течение 12 – 14 часов при +56°C при постоянном перемешивании.

Рисунок № 2





Далее проводили 2-кратную депротеинизацию смесью Фенол-Хлороформ-Изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1. Отбирали супернатанты с пробирок и объединили их в одну пробирку. 2-кратную очистку (по 30 минут) от ингибиторов и концентрирование раствора ДНК проводили с помощью устройства «Centricon-100» (Amicon, США) при 2850 об./мин. (1).

**Модифицированный подход органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией.**

Для декальцинации костный порошок в количестве 150 мг (объекты № 1а и № 2а) разделили по 50 мг на три 1,5 мл пробирки, и добавили по 1000 мкл 0,5М раствора ЭДТА (рН 7,5). Выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре на мешалке при 8000 об./мин. После этого, пробирки центрифугировали в течение 3 минут при 14000 об./мин., +16°C. Надосадочную жидкость сливали. Осадок промывали один раз 0,5М раствором ЭДТА (рН 7,5) и два раза деионизированной водой. В каждую пробирку по отдельности к осадкам добавляли по 600 мкл лизирующей буферной смеси (состоящей из 10 мМТрис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМNaCl и 20% SDS), 50 мкл Протеиназы К (10 мг/мкл) и 50 мкл свежеприготовленного 1М DTT. Выдерживали в течение 1,5 часа при +56°C при 8000 об/мин.

Далее проводили 2-кратную депротеинизацию смесью Фенол-Хлороформ-Изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1. Отбирали супернатанты с пробирок и объединили их в одну пробирку. 2-кратную очистку (по 30 минут) от ингибиторов и концентрирование раствора ДНК проводили с помощью устройства «Centricon-100» (Amicon, США) при 2850 об./мин.

**Модифицированный подход сочетанием предварительной декальцинации костной ткани и «магнитного» метода экстракции ДНК с использованием лизирующего буфера «PrepFiler BTATM lysis buffer» (2) и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США) (3).**

Для декальцинации 50 мг костного порошка (объекты № 16 и № 26) поместили в 1,5 мл пробирку и добавили 1000 мкл 0,5 М раствора ЭДТА (рН 7,5). Выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре при перемешивании 8000 об./мин. После этого, центрифугировали в течение 3 минут при 14000 об./мин., +19°C. Надосадочную жидкость сливали. Осадок промывали один раз 0,5М раствором ЭДТА (рН 7,5) и два раза деионизированной водой.

После этого к осадку добавили 20 мкл 1М DTT (Sigma, США), 20 мкл Протеиназы К и 230 мкл «PrepFiler BTATM lysis buffer» (Applied Biosystems, США). Состав инкубировали при 56°C перемешивая при скорости 8000 об./мин. в течение 1 часа 30 минут. Далее добавили 300 мкл лизирующего буфера («PrepFiler™ Lysis Buffer»), после перемешивания добавили 15 мкл магнитных частиц («PrepFiler™») и 350 мкл Изопропанола. Поместили пробирку с лизированным образцом в шейкер и перемешивали при комнатной температуре на скорости 1000 об./мин. в течение 10 минут. Затем быстро открутили на центрифуге. Поместили пробирку с лизатом на магнитный штатив на 2 минуты. Не снимая пробирку с магнитного штатива, осторожно удалили пипеткой и утилизировали надосадочную жидкость. Далее добавили 300 мкл подготовленного отмывочного буфера («PrepFiler™ Wash Buffer»). Встряхнули, отцентрифугировали, поставили на маг-



нитный штатив на 2 минуты и удалили надосадочную жидкость. Этот этап промывки выполняли 3 раза. Не вынимая пробирку с образцом ДНК с магнитного штатива, открыли её, оставили сушиться при комнатной температуре в течение 5 минут. Далее добавили 50 мкл буфера для элюции («PrepFiler™ Elution Buffer»). Тщательно встряхнули пробирку на вор-тексе на максимальной скорости (10000 об./мин.) до тех пор, пока видимый осадок магнитных частиц не растворился (около 5 секунд), затем быстро открыли на центрифуге. Поместили пробирку в термошейкер, где инкубировали при 70°C и 900 об./мин. в течение 5 минут. Тщательно встряхнули на вортексе, быстро открыли на центрифуге. Поместили пробирку с образцом ДНК на магнитный штатив на 2 минуты. Перенесли надосадочную жидкость в новую микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл.

Необходимо отметить то, что наши исследования, проводимые по протоколу фирмы производителя (2, 3), не приводили к получению удовлетворяющего результата, пригодного для решения идентификационных задач. По этой причине нами были внесены изменения в количество вносимых в реакцию смесь реагентов, скорости покачивания и времени инкубации, что приводило к полному растворению костного порошка.

#### **Количественный и качественный анализ ДНК**

Для препаратов ДНК, выделенных из исследуемых объектов, был проведен анализ матричной активности ДНК в полимеразной цепной реакции с использованием системы количественной энзиматической амплификации ДНК в режиме реального времени. Данные эффективной концентрации ДНК в указанных объектах представлены в таблице № 1.

Наименование	Концентрация ДНК нг/мкл
Объект № 1	0,005
Объект № 2	0,008
Объект № 1а	0,012
Объект № 2а	0,009
Объект № 1б	0,029
Объект № 2б	0,081

Как видно из полученных данных, представленных в таблице № 1 концентрация и качество ДНК в препаратах из объектов №№ 1, 1а, 1б, 2, 2а, 2б соответствует требованиям использованной системы «AmpFISTR Identifier Plus™ PCR Amplification Kit» (Applied Biosystems, США) (не ниже 0,01 нг/мкл).

#### **Амплификация ДНК**

Типирование образцов ДНК проводили в полилокусном формате с использованием системы энзиматической амплификации «AmpFISTR Identifier Plus™ PCR Amplification Kit» (Applied Biosystems). Для амплификации приготавливали пробирки со сточным раствором, который содержал 10 мкл MasterMix; 5 мкл PrimerSet. В пробирки с реакционной смесью для ПЦР вносили по 5 мкл экстрагированной ДНК. Перенесли пробирки в термоблок программируемого термостата и запустили соответствующую программу амплификации. ПЦР амплификация проводилась по стандартному протоколу (1). Для проведения ПЦР амплификации использовали GeneAmp® ПЦР систему 9700 с золотым 96-ячеечным блоком (Applied Biosystems). Программа амплификации включала 11 мин. предварительной денатурации при 95°C, и двадцать восемь циклов: 94°C – 20 секунд, 59°C – 3 мин. Программу завершала элонгация при 60°C в течение 10 мин.



## Фрагментный анализ

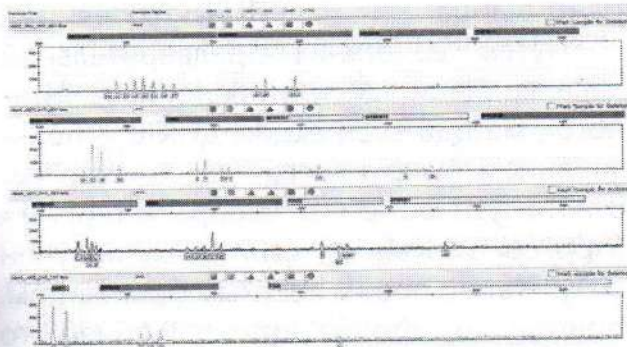
Фрагментный анализ проводили на автоматизированном аппаратно-программном комплексе 3130xl «GeneticAnalyser» (Applied Biosystems, США). Размеры амплифицированных фрагментов геномной ДНК определяли с использованием внешних стандартов молекулярных масс путем компьютерной интерпретации «Data Collection Software v3.0». С помощью специального программного обеспечения компьютера «GeneMapperID-X» получили спектрограммы (графическое изображение) генотипов, состоящего из специфического набора номеров аллелей для каждого объекта в пределах пятнадцати локусов и пол специфического гена амелогенина.

## Обсуждение результатов исследования

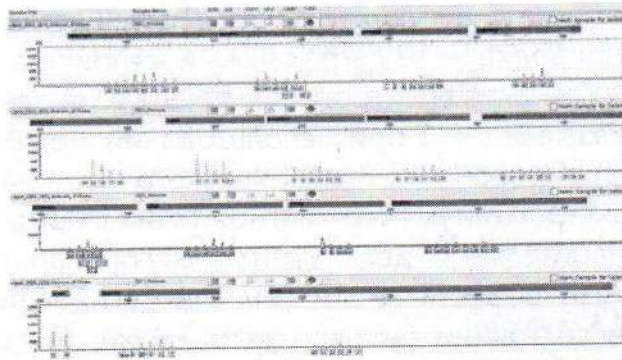
Обобщая результаты, полученные нами при использовании стандартного органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией (1) из объектов № 1 и № 2, были получены результаты, свидетельствующие о высокой степени деградации препаратов ДНК (см. спектрограммы № 1 и № 2). Такого рода спектрограммы получаются при фрагментном анализе STR локусов препаратов ДНК биологи-

ческих тканей, которые подверглись как биологической, так и термической или физико-химической деградации. При этом в процессе ПЦР амплифицируются сразу несколько (более двух) аллельных вариантов того или иного STR-локуса. Это делает невозможным определение истинного генотипа для данного образца. Данный эффект таит в себе опасность ложной интерпретации, свидетельствуя о якобы смешанном характере препаратов ДНК, которые на самом деле, являются индивидуальными. Это делает весь аллельный профиль схожим со специфическим аллельным маркером (так называемый – «леддер» эффект) и, естественно, непригодным для интерпретации (4).

Также из спектрограммы № 1 можно усмотреть, что в препарате ДНК объекта № 1 присутствует ингибиторы, которые повлияли на ход ПЦР, в результате чего локусы с длинной нуклеотидной последовательностью не амплифицировались. Как известно, основным ингибитором ПЦР является гуминовая кислота, количество которой прямо пропорционально степени влажности подверглись костные останки. Присутствие в костном порошке гуминовых кислот не приводит к полной утрате тотальной ДНК, однако вызывает разрушение цепи ДНК (5, 6). По этой причине, при работе с проблемными кост-

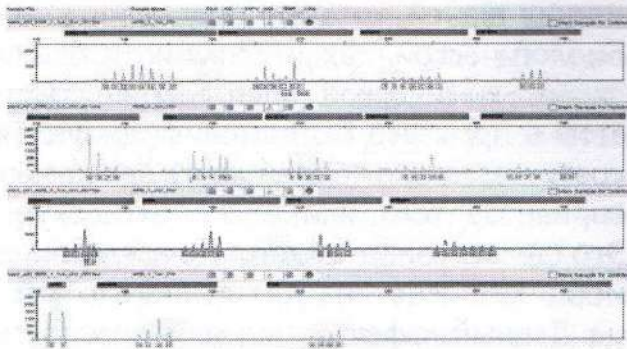


**Спектрограмма № 1.** Профиль препарата ДНК объекта № 1, экстрагированного стандартным методом органической экстракции.

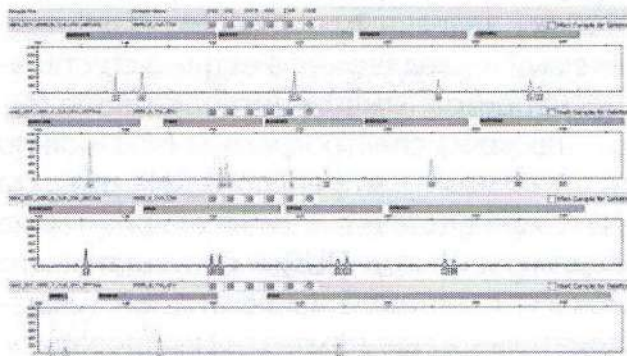


**Спектрограмма № 2.** Профиль препарата ДНК объекта № 2, экстрагированного стандартным методом органической экстракции.



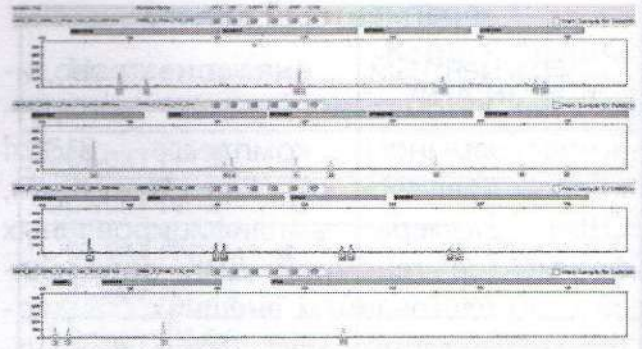


**Спектрограмма № 3.** Профиль препарата ДНК объекта № 1а, экстрагированного модифицированным подходом органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией.

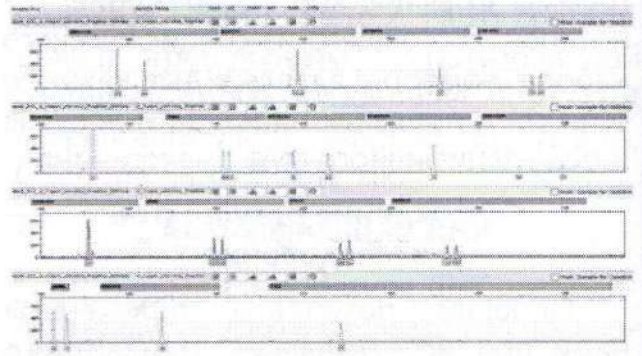


**Спектрограмма № 5.** Профиль препарата ДНК объекта № 16, экстрагированного с применением стандартного метода органической экстракции и «PrepFiler VTATM lysis buffer» и набора «PrepFiler» и (Applied Biosystems, США).

ными останками необходимо учитывать количество исходного костного порошка, вносимого в реакционную смесь, т.е. чем больше костного порошка исследуется, тем больше в процессе декальцинации вместе с ДНК экстрагируются вещества, приводящие к деградации костной ткани. Анализ спектрограмм № 3 и № 4 показывает, что при использовании модифицированного органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией препарат ДНК объекта № 1а был экстрагирован в состоянии высокой деградации, тогда как препарат ДНК объекта № 2а показал пригодность для генотипоскопического анализа, т.е. при анализе количество



**Спектрограмма № 4.** Профиль препарата ДНК объекта № 2а, экстрагированного модифицированным подходом органического метода экстракции ДНК из костной ткани с предварительной декальцинацией.



**Спектрограмма № 6.** Профиль препарата ДНК объекта № 2б, экстрагированного с применением стандартного метода органической экстракции и «PrepFiler VTATM lysis buffer» и набора «PrepFiler» и (Applied Biosystems, США).

аллелей в генотипе объекта № 2а детектировалась одна пара гомозиготных (одинаковых) или же одна пара гетерозиготных (разных) номеров аллелей на каждый локус, что характерна для ДНК одного лица.

Путем сочетания предварительной декальцинации костной ткани и «магнитного» метода экстракции ДНК с использованием лизирующего буфера «PrepFiler VTATM lysis buffer» и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США) был получен результат по обоим костным фрагментам, пригодным для генотипоскопического анализа (спектрограммы № 5 и № 6).

Исходя из полученных данных для модификации органического метода



экстракции ДНК с предварительной декальцинацией из костной ткани, которые долгое время хранились в влажных условиях, предложено:

- 1) уменьшить количество исходного костного порошка от 1 г до 150 мг;
- 2) декальцинацию и лизис клеток проводить в микроцентрифужных пробирках объемом 1,5 мл;
- 3) процесс декальцинации проводить в течение 1 часа при интенсивном перемешивании.

Также, исходя из полученных данных при исследовании путем сочетания предварительной декальцинации и «магнитного» метода экстракции ДНК использованием лизирующего буфера «PrepFiler BTATM lysis buffer» и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США), предложено:

- 1) уменьшить количество исходного костного порошка от 1 г до 50 мг;
- 2) увеличить количество лизирующего буфера «PrepFiler BTATM lysis buffer» (Applied Biosystems, США), а также DTT и Протеиназы К;
- 3) время лизиса костного порошка сократить на 30 минут при интенсивном перемешивании.

## На основании полученных результатов были сделаны следующие выводы:

- Исследованные нами костные фрагменты изначально содержали недеградированную ДНК.
- Для молекулярно-генетического анализа костных останков, находившихся в условиях повышенной влажности, достаточно:
  - 150 мг исходного костного порошка;
  - достаточно 1 часа для декальцинации при постоянном интенсивном механическом перемешивании.
- Применение предложенных подходов позволяет проведение экстракции ДНК из костных фрагментов, которые

длительное время находились под влиянием факторов внешней среды (влажность, высокая температура и т.д.) в течение 4 часов.

- Применяя сочетание предварительной декальцинации костной ткани и реагентов лизирующего буфера «PrepFiler BTATM Lysis buffer» и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США), можно получить высокоочищенный препарат ДНК из относительно малого количества исходного материала ~ 50 мг.

- Данные подходы исследования костных останков можно использовать для определения пола, идентификации личности и установления родства при судебно-биологических исследованиях ДНК человека.

## Использованная литература:

1. Корниенко И.В. и др. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. – 2001. – Ростов-на-Дону: «Ростиздат».
2. Протокол для выделения ДНК из костей и зубов с использованием ВТА буфера «PrepFiler Applied Biosystems», 4441396.
3. PrepFiler™. Набор для выделения ДНК из образцов для криминалистического анализа, руководство пользователя, Applied Biosystems, 4390932.
4. Исаенко М.В., Иванов П.Л. «Возможность верификации амплификационных профилей ДНК с помощью применения электрофореза в разных гелевых средах» Суд-мед. экспертиза, 2000, № 5, с. 32 – 37.
5. Cooper A., Ancient DNA Newsletter 1992, 1, 18-19.
6. Hagelberg E., Gray IC., Jeffreys AJ., «Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis», Nature, 1991; 352; 427-9.



## **РАЗРАБОТКА НОВЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОДХОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ СИЛЬНОДЕГРАДИРОВАННЫХ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ**

**Норматов А.Э.**

**Икрамов А.А.,  
Ахмедова Д.Ш.**

**Филатова В.А.,  
Мухамедова С.Ю.,  
Курганов С.К.,  
Тошева Д.М.**

Заведующий лабораторией Республиканского центра судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой при Министерстве юстиции Республики Узбекистан  
Ведущие эксперты Республиканского центра судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой при Министерстве юстиции Республики Узбекистан  
Эксперты Республиканского центра судебной экспертизы им. Х. Сулаймановой при Министерстве юстиции Республики Узбекистан

В экспертной практике лаборатории «СБЭ ДНК человека» нередко для экспертного исследования представляются костные останки неопознанных трупов, подвергнутых влиянию факторов внешней среды (воздействию влаги, прямых солнечных лучей, высокой температуры и т.п.). Ввиду процессов естественного распада и влияния факторов окружающей среды на костную ткань выделение из них недеградированной ДНК стандартными методами весьма проблематично. Как известно, на сегодняшний день наиболее эффективным методом экстракции ДНК из костной ткани является органический метод экстракции ДНК с предварительной декальцинацией (1). Этот метод имеет существенные недостатки, а именно: использование большого количества костного порошка (до 2,5 гр.); длительное время предварительной декальцинации (до 18 часов) и экстракции (более 20 часов) (1). Как свидетельствует наша экспертная практика при работе с большим количеством исходного костного материала, вместе с ДНК экстрагируются ингибиторы ПЦР, а также длительное

время предварительной декальцинации может привести к дальнейшей деградации ДНК, в результате которой хрупкий объект становится непригодным для генотипоскопического исследования.

Целью данного исследования является разработка высокоэффективного подхода для выделения пригодной для генотипоскопического анализа ДНК из костной ткани путем модификации стандартного метода, а также попытка сочетания возможностей двух методов экстракции – органического метода экстракции ДНК с предварительной декальцинацией и «магнитного» метода экстракции ДНК с использованием лизирующего буфера «PrepFiler BTATM Lysis buffer» и набора «PrepFiler» (Applied Biosystems, США).

Объектами данного исследования явились представленные для экспертного исследования фрагменты костей из различных участков тела неизвестного мужчины, обнаруженного 18 июня 2013 года в оросительном канале в махалле «Айбасаул» Юкори чирчикского района Ташкентской области (экспертное заключение № 5322/12Д от