ISSN 0039-4521

Минздравсоцразвития России

ФГУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздравсоцразвития России

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА

Том 54 март—апрель 2.2011

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Научно-практический журнал **«Судебно-медицинская экспертиза»** цитируется и индексируется в следующих электронных поисковых системах/базах данных: РИНЦ (Российский индекс научного цитирования), Google Scholar, «Index Medicus». Основан в 1958 г.
Выходит 6 раз в год.

Journal «Forensic medical examenation» is publised 6 times a year by Media Sphera Published Group. Founded in 1958.

Издательство МЕДИА СФЕРА:
127238 Москва,
Дмитровское ш., 46, корп. 2, этаж 4
Тел.: (495) 482-4329
Факс: (495) 482-4312
Отдел рекламы:
Тел.: (495) 482-0604
Отдел подписки:
Тел.: (495) 482-5336
Факс: (495) 482-4312
E-mail: mediasph@mediasphera.ru
www.mediasphera.ru
Адрес для корреспонденции:
127238 Москва, а/я 54, Медиа Сфера

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
125284 Москва, ул. Поликарпова, 12/13, РЦСМЭ
Зав. редакцией **А.В. Николаева**
Тел.: (495) 946-1362
E-mail: journal@rc-sme.ru
E-mail: rcsme@sudmed.ru
Свидетельство о регистрации:
ПИ № ФС 77-29217 от 24.08.07
Редактор Л.И. Федяева

Оригинал-макет изготовлен
Издательством МЕДИА СФЕРА
Компьютерный набор и верстка:
М.Л. Калужнин, С.В. Олефир
Корректоры: В.Ю. Глазунова,
И.В. Корягина, Е.А. Папоян

Индекс 71470
для индивидуальных подписчиков
Индекс 71471
для предприятий и организаций

Формат 60×90 1/8; тираж 1500 экз.
Усл.печ.л. 8
Заказ **54**
Отпечатано в "Информполиграф"

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

И.о. главного редактора В.В. Жаров

Л.О. Барсегянц
И.В. Буромский
В.В. Жаров (зам. главного редактора)
В.Н. Звягин
П.Л. Иванов
В.Н. Крюков
А.В. Ковалев (ответственный секретарь)
М.И. Лапенков
Б.М. Лисянский (ответственный секретарь)
Ю.И. Пиголкин
П.В. Пинчук
В.Л. Попов
П.О. Ромодановский
Е.М. Саломатин
И.А. Толмачев
М.В. Федулова
В.А. Фетисов
П.П. Ширинский
О.Д. Ягмуров

Решением Высшей аттестационной комиссии (ВАК) Министерства образования и науки РФ журнал «Судебно-медицинская экспертиза» включен в Перечень рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых рекомендована публикация основных результатов диссертационных исследований на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Издательство **МЕДИА СФЕРА** Москва · **MEDIA SPHERA** Publishing GROUP Moscow

Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

М.И. ЛАПЕНКОВ[1], Н.В. ПЛАХИНА[1], Я.И. АЛЕКСЕЕВ[2], Д.А. ВАРЛАМОВ[2]

The development of a test-system for the quantitative and qualitative evaluation of DNA content in criminalistic objects by the real-time polymerase chain reaction

M.I. LAPENKOV, N.V. PLAKHINA, YA.I. ALEKSEEV, D.A. VARLAMOV

[1]Институт криминалистики (нач. — В.М. Богданов) Центра специальной техники ФСБ России; [2]ЗАО «Синтол» (дир. — А.В. Кузубов), Москва

Предложена отечественная тест-система для предварительной количественной и качественной оценки препарата выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на основе технологии TaqMan. С использованием этой тест-системы одновременно проводится определение количества ДНК в образце, генетического пола и наличия ингибиторов ПЦР. Методика опробована в экспертной практике.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени, технология TaqMan, ген амелогенина, ингибирование.

An original test-system for the preliminary quantitative and qualitative evaluation of isolated DNA is proposed by the polymerase chain reaction in real time (PCR-RT) based on the TaqMan technology. This test-system permits to simultaneously measure the amount of DNA in the sample, identify the genetic gender, and detect PCR inhibitors. The method has been approbated in the practical work of forensic medical experts.

Key words: real-time polymerase chain reaction, TaqMan technology, amelogenin gene, inhibition.

Применяемые в настоящее время в судебно-медицинской практике методы молекулярно-генетического анализа STR-локусов высокотехнологичны и стандартизированы. Современные оборудование и наборы являются, по сути, «закрытой системой», работа с которой осуществляется по протоколу, рекомендованному производителем. Отклонения от оптимальных параметров ведут к несбалансированности пиков, потере аллелей и целых локусов [1].

При исследовании объектов, содержащих достаточное количество интактной ДНК, например образцов крови на FTA-картах, весь процесс анализа роботизирован и проходит при минимальном вмешательстве оператора. Однако «проблемные» объекты, содержащие незначительное количество материала, деградированную ДНК или ингибиторы полимеразной цепной реакции (ПЦР), требуют индивидуального подхода. Для получения положительных результатов при анализе таких образцов, обычных для криминалистической практики, используют различные приемы, например увеличение количества циклов амплификации и времени внесения пробы в капилляр, применение специализированных наборов для анализа деградированной ДНК или разведение образца ДНК для снижения концентрации ингибиторов. В любом случае результативность исследований зависит от точной предварительной оценки содержания и качества ДНК.

Для определения количества ДНК применяют различные способы. Распространенные ранее спектрофотометрический метод и «slot-blot»-анализ, обладающие низкой чувствительностью и малой информативностью, в настоящее время в криминалистической практике не используются. Работа по изучению и совершенствованию ПЦР привела к появлению метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [2, 3]. Принципиальными особенностями ПЦР-РВ являются контроль накопления продуктов ПЦР, возможность автоматической регистрации и интерпретации полученных результатов и высокая точность определения [4]. Кроме того, детекция продуктов ПЦР осуществляется в закрытой пробирке, что практически исключает загрязнение ампликонами рабочих помещений.

Существует два типа ПЦР-РВ, различающихся способом визуализации накопления продуктов ПЦР: с применением неспецифичных к последовательности ДНК интеркалирующих агентов, квантовый выход которых увеличивается при связывании с двухцепочечной ДНК (технология SYBR Green [5]), и с использованием специфичных к ДНК олигонуклеотидов, флуоресценция которых зависит от эффективности гибридизации. Во втором случае олигонуклеотиды (праймеры или зонды) несут флуорофоры и гасители, а механизм испускания излучения

© Коллектив авторов, 2011

© Суд.-мед.эксперт., 2011

[1]e-mail: lapenkov@rc-sme.ru

[2]e-mail: jalex@sintol.ru

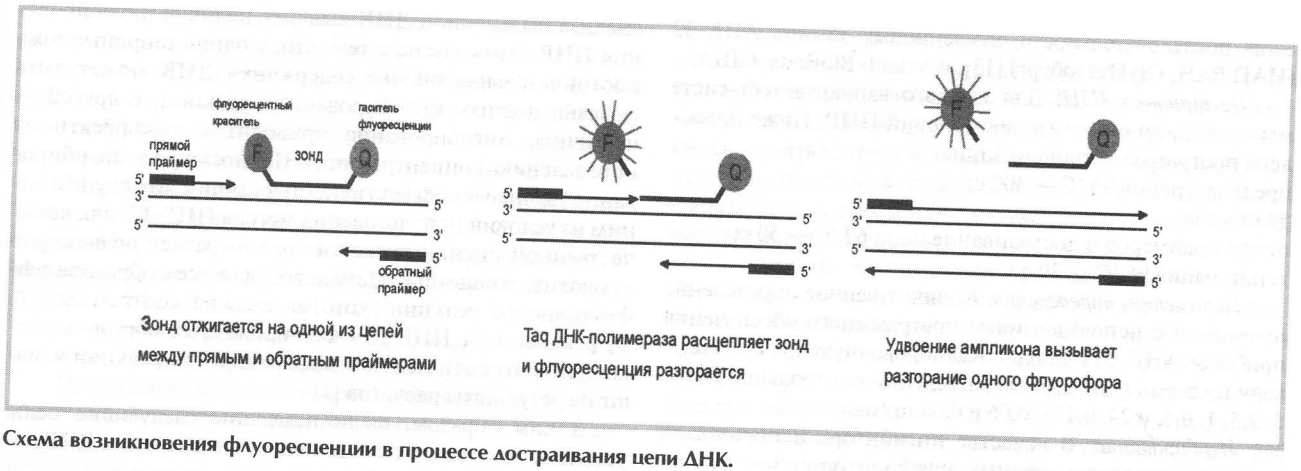

Схема возникновения флуоресценции в процессе достраивания цепи ДНК.

определяется используемой технологией: LightCycler, "скорпион", Molecular beacons, TaqMan и др. [6, 7].

Преимуществами технологии TaqMan являются точность определения даже при малых концентрациях ДНК и возможность проведения нескольких независимых реакций [8]. Использование зондов с различными флуоресцентными метками значительно повышает специфичность реакции, позволяет проводить количественное определение в присутствии посторонней ДНК и выявлять одновременно несколько ДНК-мишеней. Эти характеристики метода были учтены нами при выборе технологии на этапе создания тест-системы для исследований объектов судебно-медицинской экспертизы (СМЭ).

Упрощенная схема ПЦР-РВ по технологии TaqMan представлена на рисунке. По мере накопления продуктов ПЦР регистрируется накопление сигнала флуоресценции. Флуоресценция генерируется только при гибридизации зонда со специфическим ПЦР-продуктом.

Современные аппаратно-программные комплексы позволяют проводить детекцию до 5 реакций одновременно по различным оптическим каналам. Это дает возможность получать несколько характеристик образца ДНК, но требует тщательного подбора параметров процесса, дизайна праймеров и зондов [9]. В зависимости от цели анализа тест-системы могут быть ориентированы на оценку количества и качества деградированной ДНК, выявление ингибиторов [10—12] и т.д.

С учетом особенностей работы в области СМЭ на основе технологии TaqMan разработана и испытана отечественная тест-система для одновременного обнаружения в образце ДНК человека, определения ее концентрации, половой принадлежности и наличия ингибиторов.

Материал и методы

Набор реагентов для обнаружения и определения количества ДНК человека (ЗАО «Синтол», Москва) включает все компоненты, необходимые для проведения реакции (смесь дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, Taq ДНК-полимераза с «горячим стартом», $MgCl_2$).

В таблице приведены характеристики и параметры реакции.

Для обнаружения и количественного определения ДНК в реакционную смесь введены праймеры и зонд, специфичные к участку гена β-актина. Расщепление зонда приводит к увеличению сигнала флуоресценции красителя FAM.

Для определения половой принадлежности в реакционную смесь введены праймеры и зонды, специфичные к гомологичным участкам гена амелогенина X- и Y-хромосом. Расщепление зондов приводит к увеличению сигналов флуоресценции красителей R6G и ROX при амплификации фрагментов ДНК X- и Y-хромосом соответственно.

В качестве внутреннего положительного контроля используются оригинальная плазмида pTgt2 и специфичные к ней праймеры и зонд. Расщепление зонда приводит к увеличению сигнала флуоресценции красителя Cy5.

В качестве положительного контрольного образца в набор входит препарат выделенной из крови, очищенной фенольным методом и охарактеризованной по концентрации и чистоте спектрофотометрическим методом ДНК человека.

Оборудование. Устройство для обнаружения в режиме реального времени флуоресцентной детекцией специфиче-

Характеристики и параметры реакции

Канал	Флуоресцентные метки			Амплифицируемый фрагмент	Длина фрагмента, н.п.	Контролируемый параметр
	краситель	длина волны, нм				
		максимума поглощения	максимума флуоресценции			
1	FAM	492	520	Участок гена β-актина	82	Содержание ДНК
2	R6G	524	557	Участок гена амелогенина на X-хромосоме	84	Наличие X-хромосомы
3	ROX	580	605	Участок гена амелогенина на Y-хромосоме	84	Наличие Y-хромосомы
4	Cy5	646	662	Плазмида pTgt2	82	Ингибирование

ской последовательности нуклеиновых кислот АНК-32 (ИАП РАН, Ст-Петербург) [13]; iCycler («BioRad», США).

Постановка ПЦР. Для каждого варианта тест-системы проводили оптимизацию условий ПЦР. Ниже приведена программа амплификации:
преденатурация 95 °С — 400 с;
50 циклов:
отжиг праймеров и достраивание цепи 62 °С — 50 с;
денатурация 95 °С — 20 с.

Параметры определения. Количественное определение проводили с использованием программного обеспечения приборов АНК-32 и iCycler. Калибровочную прямую получали по серии стандартных разведений контрольной ДНК: 5, 2,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,06 и 0,03 нг/мкл.

Игибирование. В качестве ингибитора использовали растворы гемолизированных эритроцитов крови человека. Для получения исходного раствора проводили отмывку эритроцитов 100 мкл жидкой крови и их последующее лизирование в 1 мл деионизированной воды. Отбирали 50 мкл раствора и использовали для приготовления серии разведений: в 2, 5, 10, 25, 50, 100 и 400 раз. В реакционную смесь вводили по 4 мкл образца контрольной ДНК (0,1 нг/мкл) и по 1 мкл каждого разведения раствора ингибитора.

Образцы ДНК. Испытания проводили на образцах ДНК, выделенных из слюны и крови 40 женщин и 70 мужчин. Давность образцов ДНК и образцов биоматериала составляла от нескольких дней до 6 лет. Образцы ДНК хранили при –20 °С, образцы биоматериала, высушенные на марле, — при комнатной температуре. Выделение ДНК проводили с использованием ионообменной смолы Chelex 100 («Bio-Rad», США) и набора реагентов DNA IQ System («Promega Corporation», США).

Препараты ДНК животных получали:

— из слюны кролика, кошки, собаки, отобранной на стерильные марлевые тампоны с использованием ионообменной смолы Chelex 100 («Bio-Rad», США);

— из крови теленка, курицы, свиньи с использованием набора реагентов DNA IQ System («Promega Corporation», США).

Генотипирование по STR-локусам проводили на генетическом анализаторе 3130xl («Applied Biosystems», США). Использовали амплификатор модели 9700 («Applied Biosystems», США) и набор реагентов AmpF*l*STR Identifiler PCR Amplification Kit» («Applied Biosystems», США).

Результаты и обсуждение

Одной из важных задач, которую требовалось решить на первом этапе разработки тест-системы, являлся выбор определяемых показателей. При этом мы руководствовались следующими соображениями.

При проведении СМЭ часто возникает необходимость дифференцировать анализируемые объекты по половой принадлежности. Решить эту задачу позволяет определение гена амелогенина. Кроме того, существует возможность использования локуса *Amelogenin* для количественного определения содержания ДНК в образце [14, 15]. Более точная оценка малых концентраций ДНК проводится путем определения по мультикопийным генам, таким как Alu или ген β-актина [16—18].

Для эффективного исследования криминалистических образцов, которые часто бывают загрязнены посторонними веществами, особенно важно на первом этапе анализа выделенной ДНК выявить наличие ингибирования ПЦР. Это связано с тем, что, с одной стороны, ложноотрицательная оценка содержания ДНК может быть вызвана полным ингибированием реакции, с другой — частичное ингибирование приводит к некорректному определению концентрации ДНК, поскольку ингибирование уменьшает эффективность реакции. Между тем одним из условий использования метода ПЦР-РВ для количественной оценки является то, что расчет правомерно проводить лишь при одинаковой для всех образцов эффективности реакции, которая должна соответствовать эффективности ПЦР для калибровочных образцов. Отклонения от оптимальной эффективности реакции влияют на результаты расчетов [1].

Таким образом, были намечены следующие цели: установление генетического пола, концентрации ДНК человека и наличия ингибиторов.

Дальнейшая работа проводилась с целью создать тест-систему, отвечающую поставленным условиям. Для определения половой принадлежности в ее состав были введены праймеры и зонды, соответствующие гомологичным участкам гена амелогенина X- и Y-хромосом. С их помощью отрабатывался состав реакционной смеси, который позволил бы в достаточно широком диапазоне концентраций ДНК надежно выявлять присутствие участков X- и Y-хромосом. В результате предварительных исследований была показана возможность определения половой принадлежности при концентрациях ДНК в образце от 0,1 до 50 нг/мкл. Более высокие концентрации ДНК не исследовались как нехарактерные для криминалистических образцов.

Первоначально количественное определение ДНК проводили по фрагменту гена амелогенина X-хромосомы. Было отмечено, что при концентрации ДНК ниже 125 пг/мкл необходимая точность и воспроизводимость анализа не обеспечиваются. В связи с этим на следующем этапе исследований в тест-систему были введены компоненты для определения фрагмента гена β-актина. Это дало возможность решить две задачи. Во-первых, позволило устанавливать количество ДНК в образцах с низким содержанием матрицы, что характерно для большинства экспертных исследований. Как было показано в дальнейшем, введение этого компонента позволило повысить чувствительность определения до нескольких копий ДНК. Во-вторых, по сочетанию ген β-актина—*Amelogenin* стало возможным устанавливать происхождение анализируемого объекта от человека или животного, поскольку ген β-актина представляет собой мультикопийный ген, присутствующий у позвоночных. Это помогает определять дальнейшую тактику проведения экспертизы, например при анализе пятен крови.

Введение в реакционную смесь внутреннего положительного контроля (ВПК) — плазмиды и соответствующих праймеров и зонда позволило выявлять наличие ингибирующих полимеразу соединений, что исключает возможность ложноотрицательной оценки образца.

После предварительной отработки был сформирован окончательный вариант тест-системы. В процессе анализа в одной пробирке проходят одновременно 4 независимые реакции и по 4 оптическим каналам осуществляется детекция флуоресценции, соответствующей накоплению различных ПЦР-продуктов.

В дальнейшем проводили тестирование метода в целях исследования возможности использования его при анализе криминалистических объектов.

При определении сходимости (повторяемости) метода проводили по 5 параллельных измерений образцов контрольной ДНК следующих концентраций 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3 и 0,15 нг/мкл. Стандартное отклонение составляло от 5,51 до 13,87%. Отмечено увеличение значений отклонения при уменьшении концентрации ДНК.

Также исследовали совместимость тест-системы с оборудованием других производителей. Для этого на приборах АНК-32 и iCycler проводили по 5 параллельных измерений образцов контрольной ДНК следующих концентраций 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3 и 0,15 нг/мкл. Установлено, что результаты определения содержания ДНК и генетического пола на двух приборах соответствуют друг другу.

При исследовании влияния ингибирования выявлена зависимость между количеством ингибиторов в исследуемых образцах, эффективностью накопления флуоресценции и результатами расчета концентрации ДНК: уменьшение значения эффективности накопления флуоресценции для ВПК в исследуемых образцах относительно контрольных на 20% и более указывает на наличие ингибиторов. Расчет содержания ДНК в таком случае производить некорректно, так как можно получить как завышенный, так и заниженный результат.

При определении специфичности тест-системы количественную и качественную оценку ДНК человека проводили в присутствии ДНК животных, которые являются типичными для окружения человека. Исследовали образцы ДНК лиц мужского и женского пола в диапазоне концентраций 1—0,2 нг/мкл в присутствии ДНК животных. Было установлено, что расчетное содержание ДНК человека соответствовало вводимым количествам, определение половой принадлежности также проходило корректно. В качестве дополнительных проводили испытания тест-системы на образцах ДНК животных при отсутствии ДНК человека. При проведении ПЦР-РВ с ДНК кролика, кошки, собаки, теленка, свиньи, курицы флуоресценция детектировалась по 1 и 4 каналам, т.е. ДНК в образце присутствовала, ингибирования обнаружено не было, но и фрагменты X- и Y-хромосом не выявлялись. Таким образом, показано, что тест-система является специфичной к ДНК человека по фрагментам X- и Y-хромосом.

Чувствительность определения исследовали на сериях разведений образца контрольной ДНК: при концентрации ниже 15 пг/мкл реакция может пройти только по 1 каналу (ген β-актина), при концентрации выше 15 пк/мкл — по всем каналам. По результатам измерений чувствительность определения разработанной тест-системы признана удовлетворительной, так как позволяет оценивать концентрацию ДНК значительно ниже 0,05 нг/мкл — порога концентраций систем для генотипирования.

Корректность расчета концентрации ДНК и определения половой принадлежности подтверждена последующим анализом на генетическом анализаторе 3130xl («Applied Biosystems», США) с использованием набора AmpF*l*STR Identifiler PCR Amplification Kit («Applied Biosystems», США). ДНК в амплификационную смесь вводили в диапазоне концентраций 0,03—1 нг/мкл. Было отмечено, что наиболее сбалансированное генотипирование достигается при концентрации ДНК от 0,05 до 0,2 нг/мкл. Это соответствует заявленному диапазону концентраций ДНК для введения в амплификационную смесь производителя наборов для генотипирования. Соответственно была доказана возможность использования данной тест-системы для предварительной оценки ДНК перед генотипированием.

Испытания тест-системы проводили на препаратах ДНК, полученных из образцов крови, буккального эпителия, луковиц волос и ногтей известных лиц: 40 женщин и 70 мужчин. Также исследовали препараты ДНК, полученные из высушенных на марле пятен (крови, слюны, влагалищных выделений и спермы) и частиц перхоти различных сроков хранения — от 3 дней до 5 лет, всего более 250 объектов. Выделение ДНК проводили различными методами: органической экстракцией, с использованием ионообменной смолы Chelex 100 («Bio-Rad», США) и с помощью наборов реагентов Differex System и DNA IQ™ System («Promega Corporation», США). Во всех исследованных образцах были установлены количество ДНК и ее половая принадлежность. Тем самым в результате проведенных испытаний показана возможность применения тест-системы для исследования объектов, наиболее часто встречающихся в экспертной практике.

В течение ряда лет тест-систему использовали при проведении экспертных исследований. Всего было проанализировано более 1000 образцов ДНК (в том числе около 100 смесевых образцов), полученных из разнообразных биологических объектов (пятна крови, слюны, спермы, влагалищных выделений, срезы ногтевых пластин, костные останки, перхоть и микрочастицы, луковицы волос, различные смывы). Выделение ДНК проводили различными методами: органической экстракцией, с использованием ионообменной смолы Chelex 100 («Bio-Rad», США), с помощью наборов реагентов Differex System, Tissue and Hair Extraction Kit, DNA IQ System («Promega Corporation», США) и PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit («Applied Biosystems», США). Опыт работы с криминалистическими объектами показал, что применение разработанной тест-системы обеспечивает эффективное исследование при ограниченном количестве биологического материала. По результатам предварительного анализа можно принимать решение о дальнейшей работе с образцом: разбавить или сконцентрировать препарат ДНК, повторить выделение и т.п.

Предложенная методика количественной и качественной оценки препарата ДНК проста, позволяет наиболее рационально проводить генотипирование и при этом экономить трудозатраты и реактивы. Доказаны специфичность и точность определения концентрации ДНК при одновременном установлении генетического пола образца и наличия ингибиторов. Метод позволяет проводить первичную дифференциацию объектов при проведении СМЭ, свести к минимуму риск получения ложноотрицательной оценки содержания ДНК и планировать дальнейшую работу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kline M.C., Duewer D.L., Redman J.W., Butler J.M.* Results from the NIST 2004 DNA Quantitation Study. J Forens Sci 2005;50:3:571—578.
2. *Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology 1992;10:413—417.

3. *Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.* Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 1993;11:1026—1030.
4. *Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M. et al.* The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006;27:95—125.
5. *Morrison T., Weis J.J., Wittwer C.* Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 1998;24:954—958, 960, 962.
6. *Bustin S.A.* Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences. Exp Rev Mol Diagn 2005; 5: 493—498.
7. *Lee L.G., Connell C.R., Bloch W.* Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 1993; 21: 3761—3766.
8. *Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5—3-exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7276—7280.
9. *Tichopad A., Dzidic A., Pfaffl M.W.* Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. Biotechnology Letters 2002; 24: 2053—2056.
10. *Swango K.L., Timken M.D., Chong M.D., Buoncristiani M.R.* A Quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. Elsevier 2005.
11. *Alonso A. et al.* Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. J Forens Sci Int 2004; 139: 141—149.
12. *Hudlow W.R., Chong M.D., Swango K.L. et al.* A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: A diagnostic tool for STR typing. J Forens Sci Int Genet 2008;2:108—125.
13. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.* Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР=РВ). Научное приборостроение 2006;16:3:132—136.
14. *Andreasson H., Allen M.* Rapid quantification and sex determination of forensic evidence materials. J Forens Sci 2003;48:6:1280—1287.
15. *Anwar N., Goodman M., Hulme P. et al.* Amelogenin as a target for real-time PCR quantitation of Forensic Templates. International Congress Series 1288, Progress in Forensic Genetics II 2006;768—770.
16. *Sifts M.E., Both K., Burgoyne L.A.* A more sensitive method for the quantification of genomic DNA by *Alu* amplification. J Forens Sci 2002;47:589—592.
17. *Costello M.T., Schumm J.W.* A single assay for human-spesific quantification of less than 1 pg DNA and detection of the presence of PCR inhibitors in forensic samples. International Congress Series 1288; Progress in Forensic Genetics II 2006;753—755.
18. *Heinrich M., Lutz-Bonengel S., Matt K., Schmidt Ul.* Real-time PCR detection of five different «endogenous control gene» transcripts in forensic autopsy material. J Forens Sci Int Genet 2007;1:2:163—169.