

ЭКСПЕРТНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ПЯТЕН КРОВИ НА СОРОЧКЕ НИКОЛАЯ II

Свердловское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (начальник – к.м.н. Н.И. Неволин)

В статье изложены результаты молекулярно-генетической экспертизы пятен крови на сорочке Николая II, хранящейся в Государственном Эрмитаже г. Санкт-Петербурга. Данное исследование проводилось в рамках комплексной международной экспертизы идентификации скелетированных останков 9-ти скелетов обнаруженных в 1991 году в районе Коптяковской дороги близ Екатеринбурга и идентифицированных ранее как останки императора Николая II и членов его семьи и близкого окружения, а также неопознанных человеческих останков, обнаруженных в 2007 году в захоронении на местности Поросенков Лог вблизи Екатеринбурга.

С точки зрения современной криминалистики результаты данного исследования предоставляют возможность достигнуть доказательной значимости в вопросе идентификации останков императора Николая II.

Впервые описан опыт успешного STR-типирования ДНК выделенной из пятен крови 117-летней давности на основе автоматического флюоресцентного анализа ПЦР-продуктов.

Ключевые слова: *геномная ДНК, STR-анализ, идентификация личности, Император Николай II*

1. Представление

1.1 Введение

Для идентификации предполагаемых останков царя Николая II Романова и членов его семьи из первого и второго захоронения необходимо повысить величину надёжности ДНК-идентификации до такого уровня, чтобы не было сомнений в уникальности генотипа останков.

Предпринятые ранее попытки выявить индивидуализирующие признаки на уровне ДНК следов крови Николая II на объектах, хранящихся в культурном центре Бивако в г.Отцу успехов не принесли и были прекращены как не имеющие экспертной перспективы.

Однако современный уровень криминалистических молекулярно-генетических исследований с использованием современной чувствительной аппаратуры и реактивов позволяют провести более полное и развернутое исследование дополнительных идентификационных признаков ядерной ДНК и как следствие, повысить идентификационную значимость проведенных исследований.

Весной этого года появилась уникальная возможность провести прямую генетическую идентификацию

останков последнего российского императора Николая II с высокой степенью достоверности. Выяснилось, что в хранилище Государственного Эрмитажа г. Санкт - Петербурга находится ценный и доселе не известный широкой общественности экспонат – это сорочка Николая II. В связи с этим Генеральной прокуратурой Российской Федерации принято решение провести молекулярно-генетическую экспертизу ДНК крови на сорочке Николая II, для того чтобы сравнить полученный генетический профиль с профилем ДНК костей, найденных неподалеку от Екатеринбурга. В случае положительных результатов экспертизы удастся развеять сомнения общественности в принадлежности «царских костей» семье Николая Александровича Романова.

1.2 Предварительные сведения

Молекулярно-генетическое исследование пятен крови на сорочке Николая II проводилось на основании постановления Генеральной прокуратуры Российской Федерации о назначении судебно-генетической экспертизы на базе молекулярно-генетической лаборатории биологического отделения Свердловского

областного бюро судебно-медицинской экспертизы.

На разрешение экспертов был поставлен следующий вопрос:

1) Возможно ли извлечение генетического материала из представленных на исследование предметов – фетровый котелок и сорочка, принадлежащие цесаревичу Николаю Романову и хранящиеся в государственном Эрмитаже г. Санкт-Петербурга?

2) Если да, то установить генотип Николая II?

7 августа 2008 года в Государственный Эрмитаж г. Санкт-Петербург для работы с ценными экспонатами прибыли:

- старший следователь по особо важным делам Следственного комитета Генпрокуратуры РФ Соловьев Владимир Николаевич,

- судебно-медицинский эксперт-криминалист Московского бюро судебно-медицинской экспертизы Никитин Сергей Алексеевич,

- ведущий российский генетик профессор Рогаев Евгений Иванович

- судебно-медицинский эксперт молекулярно-генетической лаборатории Свердловского областного бюро судебно-медицинской экспертизы Трынова Елена Геннадьевна.

Перед экспертами в области молекулярно-генетического исследования стояла сложнейшая задача - изъять пригодный для молекулярно-генетического исследования материал, в частности образцы крови с фетрового котелка и сорочки Николая II, и при этом не повредить исторически ценные экспонаты. Изъятие материала для исследования должно было проводиться исключительно в рамках стен хранилища Эрмитажа под присмотром реставраторов и хранителей музея после предварительного согласования всех манипуляций. Главное условие – полностью исключить такие методы изъятия объекта для исследования, как вырезка или выдергивание ниточек материала из предмета исследования. После предварительного обсуждения плана работы и приемлемых методов

изъятия материала экспертам позволили делать смывы и соскобы с экспонатов.

1.3 Историческая справка

По историческим сведениям в 1891 году наследник российского престола цесаревич Николай Романов совершал кругосветное путешествие. На пути во Владивосток он посетил Японию. 29 апреля 1891 года во время путешествия по Японии венценосный путешественник проезжал в повозке рикши близ Киото (г. Отцу), один из местных полицейских, стоявших в оцеплении, вдруг бросился с саблей на будущего российского царя и нанес ему несколько ударов по голове. В этот момент Николай обернулся, и клинок соскользнул, лишь слегка ранив будущего русского императора.

Хранящиеся в Эрмитаже фетровый котелок и рубашка с пятнами крови – это та самая одежда, в которую был облачен юный Николай Романов в момент покушения на его жизнь.

Приближенные Николая сохранили одежду, в которую будущий император был одет во время визита в Японию, как реликвию. В Государственный Эрмитаж, в отдел истории русской культуры рубашка и фетровый котелок царя Николая попали в 1931 году из музея Революции, о чем свидетельствуют архивные лейблы, прикрепленные с помощью бечевки к фетровому котелку и манжете левого рукава сорочки.

2. Объект исследования

На исследование были представлены фетровый котелок и сорочка цесаревича Николая Романова.

На фетровом котелке с внутренней стороны на кожаном ободке имеется пятно крови, впитавшееся в кожу. Учитывая характер и давность пятна, а также характер предмета-носителя, с фетрового котелка пятно крови не смывалось и не исследовалось.

На сорочке из тонкого, мягкого, льняного материала цвета слоновой кости в области правой манишки, правой части воротника и манжета правого рукава имелись многочисленные пятна крови

хорошей насыщенности с пропитыванием материала. Вследствие давности пятен крови и характера предмета-носителя кровь растворению в дистиллированной воде не поддавалась. Однако воротничок, манжеты и манишка выполнены с укреплением материала и поэтому приобрели некоторые гидрофобные свойства, которые не позволили крови полностью впитаться в материал, а высохнуть с образованием корочек малых размеров от 1×2 мм до 5×5 мм. В связи с этим для молекулярно-генетического исследования из столь малых пятен были сделаны соскобы на стерильные фрагменты марли, предварительно смоченные дистиллированной водой. Объекты для исследования были изъяты с трёх областей сорочки – с правой стороны манишки (пятно №1), со стойки воротничка справа с внутренней стороны в 1 см от правого плечевого шва в сторону спинки (пятно №2), с внутренней части манжета правого рукава (пятно №3)

Данный метод изъятия биологического объекта давал одно главное и очень важное преимущество – меньшая площадь изъятия биологического объекта для исследования уменьшает потенциальную опасность контаминации экзогенной ДНК и ингибиторами реакции ПЦР. Кроме этого, данный метод изъятия объекта полностью исключал влияние предмета-носителя на выделение ДНК.

Фрагменты марли с частичками крови помещались в подписанные полипропиленовые пробирки – эппендорфы и тщательно просушивались.

Полученные образцы доставлены в молекулярно-генетическую лабораторию биологического отделения Свердловского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, где проведено выделение и последующий анализ ДНК, выделенной из образцов крови с сорочки последнего российского императора. Исследование и анализ полученных образцов проводился с 11 августа по 2 сентября 2008 года.

3. Материалы и методы

3.1 ДНК-выделение

ДНК из изъятых корочек крови (пятна №№ 1,2,3) выделялось методом органической экстракции с использованием набора для выделения ДНК «Extra Phen – 100» (АТГ – БИОТЕХ, г. Москва). Корочки крови экстрагировались лизирующим буфером с добавлением протеиназы К в течение 18 часов при температуре 37°C. Надосадочная жидкость подвергалась депротеинизации: смесью фенол/хлороформ и хлороформом. ДНК из водной фазы осаждалась 96% - этиловым спиртом с добавлением 5М ацетата аммония и выдерживалась в течение 1 часа при -20°C. После центрифугирования полученный преципитат ДНК промывался 75% спиртом, высушивался на воздухе и растворялся в 40 µl ТЕ-буфера. Данные препараты ДНК использовались в качестве матрицы для постановки реакции ПЦР.

3.2 Определение количества ДНК

Определение количества выделенной геномной ДНК проводилось на приборе Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems наборами реагентов Quantifiler™ Human для количественного анализа ДНК человека и Quantifiler™ Y для количественного анализа мужской ДНК Y-хромосомы фирмы Applied Biosystems (США), по методике, рекомендуемой фирмой-изготовителем.

Обработка полученных данных проводилась на ПК в операционной системе Microsoft® Windows®XP с помощью программного обеспечения ABI Prism 7500 SDS Software. Данные интерпретировались после проведенного анализа стандартной кривой и системы внутреннего контроля ПЦР - IPC. Результаты представлены в таблице 1.

3.3 ПЦР-амплификация

Для генетического типирования проб ДНК использовались наборы реагентов с пятью красителями для ПЦР-амплификации – AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit и AmpFISTR®

Yfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, США).

ТАБЛИЦА 1

Объекты исследования	Количество аутосомной ДНК человека (нг/мкл)	Количество мужской ДНК Y-хромосомы (нг/мкл)
Сорочка Николая II (пятно № 1)	0.950	0.749
Сорочка Николая II (пятно № 2)	2.06	1.53
Сорочка Николая II (пятно № 3)	7.56	5.73

Примечание: Анализ системы внутреннего контроля ПЦР (IPC) показал отсутствие ингибиторов в растворе выделенной ДНК. Значения Ct для IPC находились в диапазоне 27.50-27.63.

ПЦР - амплификация (полимеразная цепная реакция) проб ДНК проводилась в соответствии с инструкцией к набору, рекомендуемой фирмой-производителем с незначительной модификацией. С целью уменьшить расход выделенной ДНК необходимой для постановки реакции ПЦР, амплификация проводилась в реакционном объеме 12,5 мкл, где объем ДНК-матрицы вводимой в реакционную смесь составил 5 мкл.

Условия термического циклирования полностью соответствовали рекомендациям фирмы-производителя:

- для набора AmpFISTR® Identifiler®: 95°C - 11 мин; 28 циклов 94 °C – 1 мин, 59 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин; 60°C - 60 мин.

- для набора AmpFISTR® Yfiler™: 95°C - 11 мин; 30 циклов 94 °C – 1 мин, 61 °C – 1 мин, 72 °C – 1 мин; 60°C - 80 мин.

В инструкции к набору AmpFISTR® Identifiler® и AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kits – рекомендуемая концентрация ДНК вводимая в ПЦР-реакцию должна быть в диапазоне 0,05 – 0,125нг/мкл. В нашем случае амплификация проводилась 3 раза с увеличением концентрации ДНК-матрицы вводимой в реакционную смесь до максимально возможной величины.

Для ПЦР - амплификации использовался прибор ПЦР-амплификатор GeneAmp® PCR System 9700.

3.4 Анализ продуктов ПЦР-реакции

Для установления генотипа проб ДНК, выделенных из пятен крови на сорочке Николая II, применялась автоматическая система капиллярного электрофореза с использованием флуоресцентных красителей – модель AB 3130 Genetic Analyzer фирмы Applied Biosystems (США) с длиной капилляров 36 см и полимером POP-4™ рекомендуемых для фрагментного анализа. Полученные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения для автоматического анализа данных GeneMapper® ID Software v. 3.2 .

4. Результаты и обсуждение

В препаратах ДНК, выделенных из пятен крови на сорочке Николая II (пятна №№1,2,3) и амплифицированных наборами AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit и AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit установлены генотипы и гаплотипы представленные в таблицах 2 и 3, соответственно.

Таблица 2

STR – генотипы 3-х пятен крови на сорочке Николая II

Объекты	Сорочка Николая II (пятно №1)	Сорочка Николая II (пятно №2)	Сорочка Николая II (пятно № 3)
Концентрация ДНК-матрицы вводимой в реакционную смесь	0,950 нг/мкл	2,06 нг/мкл	7,56 нг/мкл
Лocus	D8S1179	13, 15	13, 15
	D21S11	-	32.2, 33.2
	D7S820	-	-
	CSF1PO	-	-
	D3S1358	14, 17	14, 17
	THO1	7, -	7, 9.3
	D13S317	11, -	11, 12
	D16S539	-	-
	D2S1338	-	-
	D19S433	13, 13.2	13, 13.2
	vWA	15, -	15, 16
	TPOX	-	8, 11
	D18S51	-	-
	D5S818	12, 12	12, 12
	FGA	22, -	22, -
Amel	XY	XY	XY

Примечание: Цифрами в таблице обозначены номера аллелей (генетических признаков) в соответствии с принятой международной классификацией.

При постановке реакции ПЦР с увеличением концентрации ДНК введенной в ПЦР-реакцию до максимально возможной величины в образце ДНК, выделенном из пятна крови

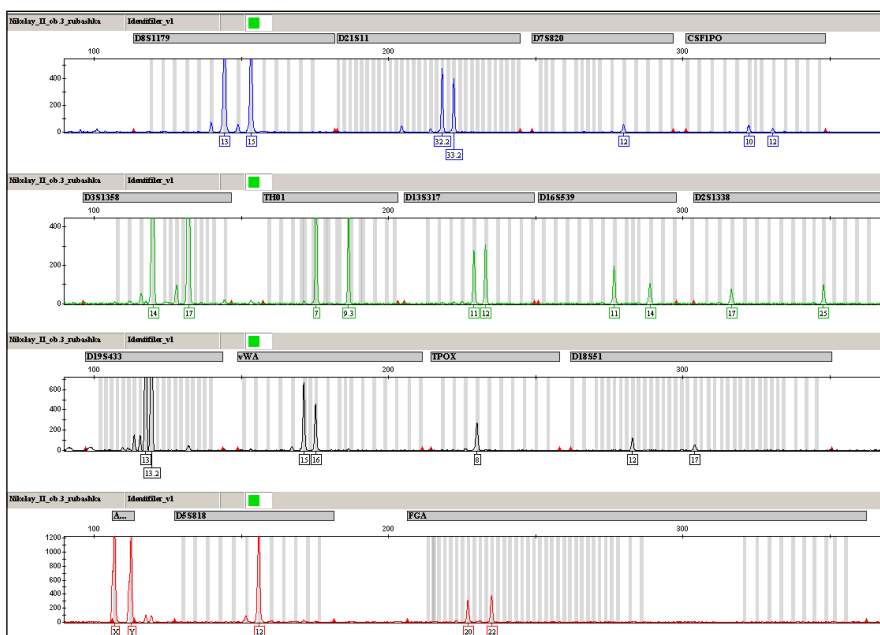


Рис.1 Электрофореграмма результатов анализа ДНК, выделенных из пятна крови на сорочке Николая II (пятно №3), с использованием набора AmpFISTR® Identifiler® PCR по 15 STR-локусам и маркеру половой принадлежности (Amel) на приборе AB 3130 Genetic Analyzer

на рубашке Николая II (пятно №1) получен неполный 8-локусный генетип ауtosомной ДНК и неполный 8-локусный гаплотип мужской ДНК Y- хромосомы.

При исследовании образца ДНК, выделенного из пятна крови на рубашке Николая II (пятно №2) также получен неполный 10-локусный генетический профиль ауtosомной ДНК и неполный 13-локусный генетический профиль мужской ДНК.

Такую выборочную амплификацию в пользу локусов с меньшей длиной ампликонов можно объяснить деградацией ДНК вследствие давности происхождения пятна и воздействия различных факторов окружающей среды. С приближением средней длины деградированной ДНК к размеру амплифицированных последовательностей выход продукта ПЦР снижается. Это обусловлено снижением количества матриц с ненарушенной структурой с размером необходимым для амплификации.

Самым результативным оказался профиль геномной ДНК выделенной из пятна крови на рубашке Николая II (пятно № 3). В итоге был получен полный 16-

локусный STR-профиль ауtosомной ДНК (рис.1) и полный 17-локусный гаплотип ДНК Y-хромосомы образца крови с сорочки Николая II (рис.2).

Данных результатов удалось достигнуть после введения в реакцию смесь максимально возможного в данном случае количества ДНК в 75,6 раз превышающего рекомендованную концентрацию для набора AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit и в 57,3 раза превышающего

рекомендованную концентрацию для набора AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit. Только добавление большего количества ДНК к реакционной смеси помогло получить сигнал достаточный для типирования всех локусов, в том числе с большими длинами ампликонов.

Таблица 3

STR – гаплотипы 3-х пятен крови на сорочке Николая II

Локус	Сорочка Николая II (пятно №1)	Сорочка Николая II (пятно №2)	Сорочка Николая II (пятно №3)
Концентрация ДНК-матрицы вводимой в реакцию смесь	0,749 нг/мкл	1,53 нг/мкл	5,73 нг/мкл
Локусы	DYS456	16	16
	DYS389I	12	13
	DYS390	-	24
	DYS389II	-	29
	DYS458	17	17
	DYS19	14	-
	DYS385a,b	11, 14	11, 14
	DYS393	13	13
	DYS391	10	10
	DYS439	-	11
	DYS635	-	-
	DYS392	-	-
	Y GATA H4	12	12
	DYS437	-	15
DYS438	-	12	
DYS448	-	19	

Примечание: Цифрами в таблице обозначены номера аллелей (генетических признаков) в соответствии с принятой международной классификацией.

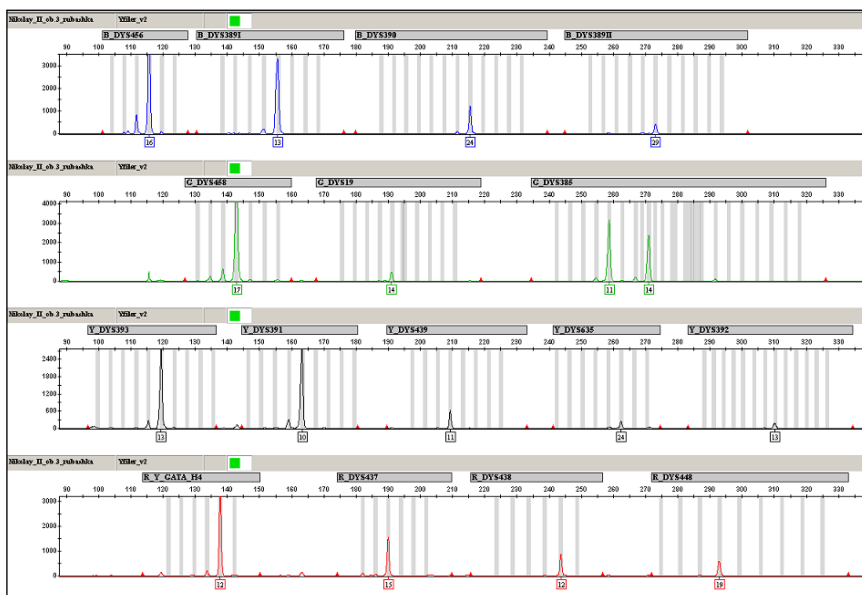


Рис.2 Электрофореграмма результатов анализа ДНК, выделенных из пятна крови на сорочке Николая II (пятно №3), с использованием набора AmpFISTR® Yfiler® PCR по 17 STR-локусам на приборе AB 3130 Genetic Analyzer

На основании изложенных результатов проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1) Впервые в международной криминалистической молекулярно-генетической практике показан положительный опыт STR-типирования ДНК крови 117-летней давности.

2) Из пятен крови на сорочке Николая II, хранящейся в архиве Государственного Эрмитажа г. Санкт-Петербурга, получена геномная ДНК, проведён максимально результативный генетический STR-анализ по пятнадцати системам идентификации аутосомной ДНК и семнадцати системам идентификации мужской ДНК. В результате получен генетический профиль геномной ДНК крови Николая II соответствующий требованиям нескольких международных баз данных.

3) Полученный результат открывает перспективу проведения новых важных сравнительных генетических исследований. Если принять условие, что костные останки, обнаруженные в 1991 году и идентифицированные ранее, являются костными останками последнего российского императора Николая II, а пятна крови на рубашке являются образом крови Николая II - то генотипические

профили данных объектов исследования должны совпадать.

Согласно мировой судебно-генетической практике на сегодняшний день лишь генетическая идентификация останков человека по его образцам крови или слюны является самым достоверным анализом. При таком сравнительном анализе степень достоверности, т.е.

вероятность совпадения генетических признаков по всем исследованным локусам у 2-х человек, может достигать уровня 10^{-18} степени.

Кроме этого, полученный результат позволит идентифицировать личность с очень высокой степенью вероятности – 99,9999999999...%. Данный уровень идентификационной значимости настолько велик, что отодвигают на второй план данные популяционной статистики.

Именно благодаря столь высокой степени достоверности очень важно провести сравнительный анализ идентифицированных ранее костных останков Николая II (скелет №4), найденных в первом захоронении на Старой Коптяковской дороге под Екатеринбургом, и крови, обнаруженной на рубашке Николая II. Это позволит, наконец, поставить последнюю точку в вопросе идентификации личности Николая II и членов его семьи.