

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2020-11-87-27>

УДК 575.113

Базиліук Ж.І.

Харківський науково-дослідний експертно-криміналістичний центр
Міністерства внутрішніх справ України

ЕВОЛЮЦІЯ МЕТОДІВ СЕКВЕНУВАННЯ ДНК ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В СУДОВІЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЕКСПЕРТИЗІ

Анотація. Стрімкий розвиток технології секвенування впроваджує нові можливості для встановлення генетичних ознак людини в судовій молекулярно-генетичній експертизі. Головною метою цих досліджень є встановлення ге-нетичних ознак безвісти зниклих осіб, їх родичів, проведення батьківства, ви-явлення слідів біологічного походження та їх ідентифікація. В статті розглянуто поступовий розвиток технології секвенування ДНК, від класичних методів секвенування за допомогою капілярного електрофорезу, до методів секвенування третього покоління, які здатні зчитувати інформацію від мільйонів фрагментів ДНК без попереднього їх клонування, та перспектива використання цих методів. Дослідження в судовій експертній діяльності однонуклеотидних поліморфізмів (SNP), секвенування STR-локусів та мітохондріальної ДНК, STR-локусів та SNP-маркерів Y-хромосоми, забезпечить високий рівень інформативності, визначення фенотипових ознак людини, можливість встановлення генетичних ознак із значно деградованої ДНК.

Ключові слова: молекулярно-генетична експертиза, секвенування, STR-локуси, секвенування нового покоління, SNP-маркери, полімеразна ланцюгова реакція.

Bazyliuk Zhanna

Kharkiv Scientific Research Forensic Center
of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine

EVOLUTION OF DNA SEQUENCING METHODS AND PROSPECTS FOR THEIR USE IN FORENSIC DNA EXAMINATION

Summary. The study of the human genome makes it possible to use genetic information to identify individual traits, diagnosis of diseases and forecasting and prevention of their development, promotes a personal approach when choosing treatment methods; population research, ethnogenesis and evolutionary processes. Introduction of DNA sequencing methods in domestic genetic fingerprinting will contribute to a more informative establishment of human genetic traits. The main purpose of molecular genetic research is to establish the genetic features of missing people, their relatives, to conduct paternity, to identify traces of biological origin and their identification. This article talks about the gradual development of DNA sequencing technology, which is conventionally divided into three types. The first type includes sequencing using capillary electrophoresis and pyrosequencing. The second type is high-throughput pyrosequencing, semiconductor, cyclic ligase, and the use of fluorescently labeled precursors, based on the sequencing of millions of DNA fragments simultaneously. The third stage includes methods that do not require prior sample preparation. These are methods of nanoporous sequencing, sequencing of one molecule, one-molecular sequencing. Today, each of the sequencing methods is aimed at performing different tasks. A number of methods are promising in the field of molecular-genetic examination. In world jurisprudence, sequencing is implemented mainly with the help of devices – Illumina's, MiSeq FGx, Ion Torrent PGM from ThermoFisher and Ion S5. Research in forensic expertise of single nucleotide polymorphisms (SNP), sequencing of STR-loci and mitochondrial DNA, STR-loci and SNP-markers of the Y chromosome, will provide a high level of information, determination of human phenotypic traits, the possibility of establishing genetic traits from significantly degraded DNA. This article deals with modern problems of identification of human genetic traits and the prospect of introduction of the newest methods of sequencing for their qualitative and complete establishment.

Keywords: DNA-typing, sequencing, STR-loci, next-generation sequencing, single nucleotide polymorphism, polymerase chain reaction.

Постановка проблеми. Секвенування ДНК – найперспективніший з методів дослідження генетичної інформації. Дослідження геному людини дає можливість використовувати генетичну інформацію для діагностики хвороб та прогнозування і упередження їх розвитку, сприяє персональному підходу під час вибору методів лікування; сприяє дослідженню популяцій, етногенезу та еволюційних процесів. Впровадження методів секвенування ДНК у вітчизняну генну дактилоскопію сприятиме більш інформативному встановленню генетичних ознак людини. На сьогоднішній день у вітчизняній науковій літературі недостатньо розглянуто методи секвенування ДНК людини з огляду на перспективи їх використання у судових молекулярно-генетичних дослідженнях.

Аналіз останніх досліджень на публікацій. Особливості проведення судових молекулярно-генетичних експертиз розглянуто в роботах Перепечиної І.О., Галдецької І.Г., Волинської А.М., Петричук С.В. та інших, проте не розглянуто перспективи впровадження новітніх методів секвенування під час проведення молекулярно-генетичних досліджень.

© Базиліук Ж.І., 2020

Мета роботи. Головною метою цієї роботи є розгляд розвитку методів секвенування ДНК та визначення перспективи їх використання у сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях.

Виклад основного матеріалу. На сьогоднішній день проведення судових молекулярно-генетичних експертиз в експертно-криміналістичній діяльності державних установ України базується на дослідженні поліморфних локусів ДНК.

Геном людини складається з різноманітних за своєю складністю послідовностей ДНК, як унікальних, так і високоповторюваних. Унікальні фрагменти ДНК містять послідовність нуклеотидів, в яких зашифрована певна генетична інформація. Таким чином, поліморфізм нуклеотидної послідовності зумовлений відмінностями в послідовності нуклеотидів різних алелей одного локусу [5].

Фрагменти високоповторюваних ДНК складаються з тандемних повторів, які можуть бути однаковими за будовою, або схожими за нею. Такі ділянки тандемних повторів мають високий рівень поліморфізму, оскільки різниця в довжині повторів фрагментів обумовлює відмінність в довжині алелей одного локусу – поліморфізм довжини [5].

Дослідження поліморфних локусів ДНК в експертно-криміналістичній діяльності засновано на проведенні полімеразної ланцюгової реакції тандемних повторів. Виокремлюють VNTR-локуси та STR-локуси. VNTR-локуси – характеризуються змінним числом повторів від семи та більше пар нуклеотидів, довжина алелей цих локусів від 200 пар нуклеотидів. Незважаючи на високий рівень поліморфізму цих локусів, їх дослідження в експертній діяльності є неможливим. Під час роботи з деградованою ДНК можливе помилкове встановлення гомозиготності певного локусу або неможливість встановити повний профіль взагалі [5].

Робота з STR-локусами є найперспективнішою, оскільки довжина алелей складає від 100 до 500 пар нуклеотидів, що забезпечує високий рівень імовірності її збереження в деградованій ДНК та виявлення всіх алелей в гетерозиготних зразках [5].

Окрім дослідження STR-локусів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, з подальшим розділенням ДНК-фрагментів за допомогою капілярного електрофорезу, для встановлення генетичних ознак людини проводять секвенування мітохондріальної ДНК, яке забезпечує встановлення спорідненості за материнською лінією, що є необхідним у разі деградації ядерної ДНК. Наразі, методи секвенування є багатoinформативними в медико-діагностичних дослідженнях, прогнозуванні і упередженні розвитку хвороб; сприяють дослідженню популяцій, етногенезу та еволюційних процесів [1].

Одним з перших методів секвенування ДНК – секвенування по Сенгеру, або метод термінації ланцюга, базується на ферментативному добуванні комплементарного ланцюга ДНК на основі одноланцюгової матриці. Проводять чотири незалежні реакції ампліфікації, до кожної з реакції додаються чотири види дезоксинуклеотид трифосфатів (dNTP), один з яких має радіоактивну мітку, та по одному виду дидезоксинуклеотид трифосфатів (ddNTP) в меншій кількості.

Завдяки наявності в реакційній суміші модифікованих аналогів дезоксинуклеотид трифосфатів, під час їх вбудовування в комплементарний ланцюг ДНК відбувається термінація, що зумовлює гетерогенний розмір отриманих фрагментів ДНК. В результаті секвенування по Сенгеру можна отримати фрагменти довжиною 1000 пар нуклеотидів, якість яких значно зменшується після 700 пар нуклеотидів. Саме за допомогою цього методу вперше розшифровано геном людини [2; 4].

Автоматизовані модифікації методу секвенування по Сенгеру використовують сьогодні, замінивши радіоактивну мітку на флюоресцентну. Розділення фрагментів відбувається під час капілярного електрофорезу, а явище флюоресценції реєструють детекторами, що дає можливість зчитувати послідовність усього секвенованого фрагмента ДНК. В сучасній лабораторній практиці цей метод дає можливість протягом одного робочого циклу в одному капілярі визначити послідовність ДНК довжиною до 1000 пар нуклеотидів [4; 5].

Метод секвенування по Максаму та Гілберту базується на хімічній деградації під дією специфічних агентів радіоактивно міченого фрагмента ДНК. ДНК, яку було мічено, розділяють на чотири аліквоти та додають до них реагент, що модифікує одне чи декілька азотистих основ. Пуринові основи модифікують диметилсульфатом та обробляють соляною кислотою, під час чого вищеплюється метиладенін. Подальша інкубація в лужному середовищі призводить до розриву фрагмента ДНК в місцях вищеплення азотистої основи. Піримідинові основи модифікують гідразіном, що призводить до модифікації як цитозину так і тиміну, якщо реакцію проводили в безсольовому середовищі, у разі проведення обробки в присутності натрій хлориду – модифікується лише цитозин. Обробка ДНК піперидином дозволяє отримати фрагменти ДНК різної довжини. Дізнатися структуру досліджуваного фрагмента ДНК можна за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі [2].

Метод піросеквенування ДНК характеризується детекцією пірофосфату, що звільняється при приєднанні ДНК-полімеразою нуклеотиду до ланцюга. Під час послідовного додавання до суміші дезоксинуклеотид трифосфатів, їх приєднання до фрагмента ДНК супроводжується виділенням пірофосфату, який у присутності сульфурілази та за участі аденозин-5'-фосфосульфата, перетворюється в АТФ, який сприяє окисненню люциферина в оксілюциферин, що супроводжується явищем біolumінесценції. Люмінесценція реєструється цифровою камерою прилада. Метод піросеквенування дешевший за метод Сенгера, проте унеможливує секвенування фрагментів, більших за 500 пар нуклеотидів, на відміну від методу Сенгера [2].

Методи секвенування нового (другого) покоління спрямовані на зменшення собівартості та збільшення продуктивності, сучасні методи секвенування здатні визначати нуклеотидні послідовності геномів різноманітних організмів, зокрема людини. До методів другого покоління відносять високопродуктивне секвенування (компанія 454 Life Sciences), циклічне лігазне секвенування (компанія Applied Biosystems), напівпровідникове секвенування (компанія Ion

Torrent). Для цих видів секвенування характерний однаковий метод пробопідготовки – фрагментація довгих ланцюгів ДНК до 50–1000 пар нуклеотидів, обробка кінців фрагментів з подальшим приєднанням адаптерних олігонуклеотидів, ампліфікація фрагментів для збільшення їх кількості, створення молекулярних колоній за допомогою клональної ампліфікації кожного фрагмента на твердому субстраті [4].

Компанією 454 Life Sciences було розроблено методику високопродуктивного піросеквенування за допомогою нанотехнологій. Модифікація методу полягає у проведенні емульсійної ПЛР із попередньою підготовкою тисяч фрагментів ДНК до їх секвенування. Після основних етапів підготовки, до підложки з лунками, в якій містяться мільярди мікросфер, послідовно додають чотири види нуклеотидів. Після емульсійної ПЛР на кожній мікросфері містяться тисячі копій матричного фрагмента ДНК. Під час потрапляння до лунки певного нуклеотида, який є комплементарним до нуклеотида матричного фрагмента ДНК, його приєднання до ланцюга, що синтезується, ініціює каскад хімічних реакцій з вивільненням пірофосфата та утворенням явища хемолюмінесценції. Дно підложки знаходиться в оптичному контакті з оптико-волоконним світоводом, що дає можливість реєструвати явище люмінесценції із тисяч лунок одночасно. Оскільки в процесі секвенування синтезом невелика кількість ДНК-матриць втрачає свій синхронізм, точність у секвенуванні фрагментів ДНК забезпечується багатокопійністю визначеної послідовності. Таке багаторазове прочитування певного фрагменту сприяє вирівнюванню сигналу під час вбудовування певного нуклеотида, що значно збільшує точність секвенування фрагментів ДНК [3].

Компанією Applied Biosystems була представлена платформа «SOLID», основана на процесі циклічного лігазного секвенування. Після стандартної пробопідготовки у вигляді емульсійної ПЛР та з'єднання фрагментів ДНК з мікросферами, до одноланцюгової ДНК приєднують праймер та синтезований флуоресцентно мічений олігонуклеотидний зонд. Послідовне приєднання зондів до матриці ДНК фіксується, частина кожного зонда з міткою відмивається. Для визначення повної послідовності фрагмента ДНК реакцію повторюють з п'ятьма праймерами, кожен з яких зміщений на один нуклеотид відносно місця посадки попереднього праймера. Довжина одного фрагмента ДНК, синтезованого таким способом, складає від 25 до 75 пар нуклеотидів [3; 4].

Компанія Ion Torrent запровадила метод секвенування на напівпровідниковому чипі. За допомогою пробопідготовки у вигляді емульсійної ПЛР утворюється бібліотека ДНК, яку фіксують на мікроелектронному чипі з мільйонами мікролунок з іонотутливою поверхнею, зв'язаному з датчиками. Послідовно додаються різні нуклеотиди, їх вбудовування в ланцюг супроводжується зміною рН, що детектується приладом. Довжина секвенування фрагментів складає 400 пар нуклеотидів із точністю 99,5% [4].

Процес секвенування Illumina відрізняється від вищезазначених методів кластерною ПЛР на підкладці, поверхня якої вкрита праймерами двох видів, з'єднаних лінкерами. Продукти амплі-

фікації певного фрагмента ДНК залишаються біля місця синтезу цього фрагмента та в подальшому ампліфікуються поряд. ДНК денатурують та проводять секвенування одноланцюгових фрагментів додаючи праймери та флуоресцентно мічені різними кольорами термінуючі нуклеотиди. Приєднаний термінуючий нуклеотид хімічно модифікують для від'єднання флуоресцентної мітки та термінатора для подальшого приєднання наступного термінуючого нуклеотида. Продовжують добування комплементарного ланцюга та детектують флуоресценцію від мільйонів кластерів одночасно. Довжина одного фрагмента ДНК, секвенуваного цим методом, складає 300 пар нуклеотидів [2; 4].

Методи секвенування третього покоління спрямовані на зменшення недоліків методів другого покоління, а саме – складної пробопідготовки, незначної довжини секвенування фрагментів, довготривалості циклів, необхідності багаторазового повторного секвенування [4].

Технологія секвенування однієї молекули компанії Helicos полягає у секвенуванні фрагмента ДНК без попередньої ампліфікації. Система забезпечує визначення повторів мільярдів нуклеотидів за добу з точністю 99,9%. Проте секвенування на приладах компанії Helicos Biosciences є занадто дорогим [4].

Метод нанопорового секвенування компанії Oxford Nanopore заснований на зміні електропровідності нанопори під час процесу міграції молекули ДНК через пору. Зміна електропровідності дає можливість визначити вид нуклеотиду, що проходить за певний проміжок часу [4].

Одномолекулярне секвенування в реальному часі компанії Pacific Bioscience дає можливість секвенування фрагментів ДНК довжиною до 10000 пар нуклеотидів. ДНК-полімераза буде досліджуваний фрагмент ДНК використовуючи нуклеотиди, які попередньо було мічено флуоресцентними мітками. Процес приєднання нуклеотида детектує лазер прибору [4].

На сьогоднішній день кожен з методів секвенування спрямований на виконання різних задач. Ряд методів є перспективним в галузі молекулярно-генетичної експертизи. В світовій судовій практиці секвенування переважно проводять за допомогою приладів Illumina's, MiSeq FGx, Ion Torrent PGM від ThermoFisher та Ion S5.

Оскільки в судовій практиці часто виникає проблема зі встановленням генетичних ознак із сильно деградованої ДНК, наприклад із обгорілих кісткових решток, впровадження методів секвенування постає перспективним варіантом для успішного встановлення повного профілю. Так, у дослідженні Ambers було показано, що використання методу масивного паралельного секвенування для дослідження одномолекулярних поліморфізмів (SNP), у поєднанні зі стандартними методами дослідження STR-локусів та секвенуванням мітохондріальної ДНК, є високоінформативним інструментом для визначення походження останків людей та їх фенотипічних відмінностей. У випадках масової гибелі людей, секвенування певних ділянок геному є інформативним для реконструювання деяких кісток черепа та щелепи, що сприяє позитивній ідентифікації загиблих [6].

Зокрема, Renata Zbiec – Piekarska вказує на перспективність дослідження маркерів метилювання для визначення біологічного віку людини, а саме маркерів метилювання промоторної частини гена ELOVL2, визначення яких проводилось методом піросеквенування. Ці дослідження вказують на можливість встановлення біологічного віку людини за слідами крові, яка перебувала в приміщенні до п'яти років, що є важливим ідентифікаційним фактором для судової молекулярно-генетичної експертизи [11].

Також, було секвеновано за допомогою прилада 454 GS Junior (Roche) чотири STR-локуса D2S1338, D3S1358, D12S391 и D21S11, для дослідження складних випадків батьківства. Секвенування цих локусів підтвердило факт батьківства та виявило ряд мутацій в алелях, які отримала дитини. Локуси D2S1338, D3S1358, D12S391 и D21S11 є перспективними для включення до наборів для секвенування в судовій молекулярно-генетичній експертизі [8].

Оскільки поліморфізм послідовності існує на оточуючих ділянках локуса та в самих коротких тандемних повторах, актуальним питанням є секвенування ділянки сайту зв'язування праймера з матрицею ДНК та секвенування алелей цих локусів. Мутації в сайті зв'язування праймера з матрицею ДНК призводять до випадіння алелей та встановлення хибної гомозиготності. В результаті мутацій розмір алелі може бути поза «алельною драбиною» (леддером), що може призводити до хибного встановлення профілю людини. Margaret C. Kline в своєму дослідженні показала можливість випадіння алелей, використовуючи ряд стандартних праймерів, та перспективі використання різних праймерів для можливості секвенування коротких тандемних повторів з мутаціями у сайті зв'язування праймера та в самій алелі [9].

Перспективним в галузі молекулярно-генетичних досліджень є дослідження однонуклеотидних поліморфізмів (SNP), які представляють собою точкові ДНК, однонуклеотидні інсерції та делеції. В геномі людини існує велика кількість однонуклеотидних замін, що є інформативним для ідентифікації ознак людини. Беззаперечною перевагою у дослідженні цих поліморфізмів є невелика довжина таких амплі-

конів – 60–80 пар нуклеотидів, що є важливим під час дослідження деградованої ДНК. Також, за допомогою дослідження SNP-маркерів можна визначити походження людини, її фенотипові ознаки – колір очей, волосся, шкіри [7].

Оскільки на сьогоднішній день в вітчизняній експертній молекулярно-генетичній діяльності розділення алелей STR-локусів відбувається на основі довжини ампліфікованих фрагментів, впровадження сучасних технологій, що базуються на визначенні нуклеотидної послідовності фрагментів ДНК, забезпечить новий рівень в ідентифікації генетичних ознак, аналізі складних сумішей ДНК [10].

Висновок. Впровадження новітніх методів дослідження ДНК є перспективним в галузі молекулярно-генетичних досліджень. По-перше, використання технологій секвенування нового покоління забезпечить виявлення нових алелей та мутацій під час проведення батьківства.

По-друге, секвенування дає можливість встановлювати всіх учасників складних сумішей ДНК, які під час дослідження стандартним методом визначають як непридатні для ідентифікації. Оскільки на сьогодні дослідження STR-локусів обмежується визначенням довжин фрагментів ДНК, це призводить до визначення суміші більш ніж з двох осіб, як непридатної для ідентифікації, або ймовірності помилкового встановлення генетичних ознак осіб, що мають схожі профілі. Впровадження методів секвенування дає можливість безпомилкового виявлення особи – складника суміші, навіть за низької концентрації її ДНК у суміші.

По-третє, сучасні методи секвенування ДНК забезпечать більш інформативне встановлення генетичних ознак обгорілих кісткових решток, визначення певних фенотипових ознак загиблих людей, що є важливим для їх ідентифікації.

Таким чином, використання в судовій експертній діяльності таких генетичних маркерів, як SNP та STR, разом з секвенуванням мітохондріальної ДНК та дослідженням Y-хромосоми, забезпечить високий рівень інформативності, визначення фенотипових ознак людини, можливість встановлення генетичних ознак з високодеградованої ДНК, виявлення нових алелей та мутацій, безпомилкової ідентифікації осіб у складних сумішах ДНК.

Список літератури:

1. Бурчинський В.Г., Хохолева Т.В., Дем'янчук А.П., Кривда Г.Ф., Кривда Р.Г., Івашина О.Х. Використання ДНК-аналізу у судово-медичних експертизах речових доказів та експертизах спірного батьківства (материнства, підміни дітей) (Методичні рекомендації). Київ: Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи, 2012. 32 с.
2. Каюмов А.Р. Молекулярный анализ генома : Учебно-методическое пособие. Казань : КФУ, 2016. 60 с.
3. Костюк С.А. Секвенирование – методы расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК. Сообщение 2. *Медицинские новости*. 2017. № 7. С. 11–14.
4. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Проблемы особоопасных инфекций*. 2014. № 2. С. 73–79.
5. Стороженко И.В., Культин А.Ю., Мельников А.В. Исследование ДНК тканей и выделений человека на автоматизированных системах: Учебное пособие. Москва : ЭКЦ МВД России, 2011. 144 с.
6. Ambers A., Churchill J., King J., Stoljarova M., Gill-King H., Assidi M., Abu-Elmagd M., Buhmeida A., Budowle B. More comprehensive forensic genetic marker analyses for accurate human remains identification using massively parallel DNA sequencing. *BMC Genomics*. 2016. V. 17. № 9. P. 21–30.
7. Budowle B. SNP typing strategies. *Forensic Science International*. 2004. № 146. P. 139–142.
8. Dalsgaard S., Rockenbauer E., Gelardi Ch., Borsting C., Fordyce S. Morling N. Characterization of mutations and sequence variations in complex STR. *Forensic Science International: Genetics*. 2013. № 4. P. 218–219.
9. Kline M., Hill C., Decker A., Butler J. STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Forensic Science International: Genetics*. 2011. № 5. P. 329–332.

10. McKiernan H., Danielson P. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*. 2017. P. 371–394.
11. Zbieć-Piekarska R., Spolnicka M., Kupiec T., Makowska Z., Spas A., Parys-Proszek A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*. 2014. № 14. P. 161–167.

References:

1. Burchynskiy V.H., Khokholieva T.V., Demianchuk A.P., Kryvda H.F., Kryvda R.H., Ivashyna O.Kh. (2012). *Vykorystannia DNK-analizu u sudovo-medychnykh ekspertyzakh rechovykh dokaziv ta ekspertyzakh spirnoho batkivstva (maternynstva, pidminy ditei) (metodychni rekomendatsii)* [The use of DNA analysis in forensic experiments of speech evidence and examination of paternal paternity (maternity, child support) (methods of recommendation)]. Kyiv: Ukrainskiy tsentr naukovoï medychnoi informatsii ta patentno-litsenziinoï roboty. (in Ukrainian)
2. Kaiumov A.R. *Molekulyarnyy analiz genoma. Uchebno-metodicheskoe posobie* (2016) [Molecular analysis of the genome. Uchebno-metodicheskoe posobie]. Kazan': KFU. (in Russian)
3. Kostyuk S.A. (2017). Sekvenirovanie – metody rasshifrovki nukleotidnoy posledovatel'nosti DNK. Soobshchenie 2 [Sequencing – methods of decoding the nucleotide sequence of DNA. Message 2]. *Meditzinskie novosti*, vol. 7, pp. 11–14.
4. Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. (2014). Sovremennye metody sekvenirovaniya DNK (obzor) [Modern methods of DNA sequencing (review)]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*, vol. 2, pp. 73–79.
5. Storozhenko I.V., Kul'tin A.Yu., Mel'nikov A.V. (2011). *Issledovanie DNK tkaney i vydeleniy cheloveka na avtomatizirovannykh sistemakh: Uchebnoe posobie* [DNA testing of human tissues and secretions on automated systems: A textbook]. Moskva: EKTs MVD Rossii. (in Russian)
6. Ambers A., Churchill J., King J., Stoljarova M., Gill-King H., Assidi M., Abu-Elmagd M., Buhmeida A., Budowle B. (2016). More comprehensive forensic genetic marker analyses for accurate human remains identification using massively parallel DNA sequencing. *BMC Genomics*, vol. 17, no. 9, pp. 21–30.
7. Budowle B. (2004). SNP typing strategies. *Forensic Science International*, vol. 146, pp. 139–142.
8. Dalsgaard S., Rockenbauer E., Gelardi Ch., Borsting C., Fordyce S., Morling N. (2013). Characterization of mutations and sequence variations in complex STR. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 4, pp. 218–219.
9. Kline M., Hill C., Decker A., Butler J. (2011). STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 5, pp. 329–332.
10. McKiernan H., Danielson P. (2017). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics*, pp. 371–394.
11. Zbieć-Piekarska R., Spolnicka M., Kupiec T., Makowska Z., Spas A., Parys-Proszek A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W. (2014). Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 14, pp. 161–167.