

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ СКРЫТЫХ СЛЕДОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Кривда Р.Г., Стоева М.И.

Одесский национальный медицинский университет

Исследованы практические вопросы оптимизации способов выделения ДНК из скрытых следов биологического материала. Проанализирована эффективность метода тейплифтинга для отбора контактных следов пальцев рук на предметах бытового назначения с гладкой поверхностью. Проведено смешанное исследование для решения вопроса о возможности установления ДНК-профиля лица, находившегося в контакте с предметом последним. Данное исследование продемонстрировало эффективность метода тейплифтинга для отбора биологического материала, содержащего контактные следы пальцев рук. В то же время установление ДНК-профиля лица, контактировавшего с объектами последним, по результатам данного анализа оказалось малоэффективным.

Ключевые слова: ДНК-профиль, скрытые следы, биологический материал, тейплифтинг.

Постановка проблемы. Выделение ДНК из объектов, содержащихся на месте преступления, становится неотъемлемой частью идентификации биологического материала [1-3]. При этом важным является отбор максимального количества пригодного материала.

Анализ последних исследований и публикаций. По результатам исследования М. Phillips и S. Petricevic [10] в результате простого контакта с практически любым объектом, в том числе одеждой [13], в виде прикосновения, на объекте остается биологический материал в виде контактных следов, потенциально содержащий клеточный материал, который может быть использован для дальнейшего ДНК-анализа [9], хотя количество оставленного в результате контакта биологического материала варьирует в зависимости от темпов регенераторных процессов и эксфолиации эпителия [6-8]. Однако, в то же время такие важные источники ДНК, как контактные следы, содержат минимальное количество ДНК, как определяет V. Castella и P. Mangin (2008), что требует разработки эффективной и чувствительной техники отбора биологического материала. В то же время, некоторые авторы демонстрируют простые подходы к анализу смешанных ДНК-профилей на основании количественной оценки интенсивности RFU-пиков (relative fluorescence units) [4].

Выделение не ренных ранее частей общей проблемы. В силу того, что некоторые биологические жидкости человека при высыхании на предметах окружающей среды не оставляют видимых следов, это обстоятельство осложняет первичный обор материала и позволяет судить о наличии на объекте следов биологического происхождения лишь предположительно, в то время как множество вещественных доказательств содержащих биоматериал, бывает упущено. В то же время использование различные методов визуализации следов биологического происхождения, которые являются эффективными лишь в случае наличия большого количества биологического материала [5, 14] нарушают структуру ДНК и делают ее непригодной для дальнейшего анализа. Метод тейплифтинга – отбора биоматериала на клейкую ленту [11, 12], благодаря простоте выполнения, позволяет обработать большую площадь объектов-носителей при минимальном воздействии на ДНК и позволяет упустить этап визуализации следов.

Цель работы. Целью нашего исследования было определение ДНК-профилей из контактных следов рук, находящихся на бытовых предметах, в частности – офисного оборудования – с помощью метода тейплифтинга.

Изложение основного материала. В качестве объекта исследования выступали скрытые следы биологического материала в виде контактных следов рук. В качестве носителей материала использовали установленный набор предметов бытового назначения, перечень которых представлен ниже. Группа предметов, используемая одним добровольцем, составляла единицу исследования и рассматривалась как 1 рабочее место.

Материалы и методы. Подготовка образцов объектов. Для проведения исследования сравнивали 2 типа рабочих мест: рабочие места индивидуального пользования и рабочие места общего пользования. Было оборудовано 17 офисных рабочих мест, в состав которых входил следующий инвентарь: стол ДСП столешница 1000 x 700 см с помеченной краской центральной областью 30 x 30 см, ноутбук, папка картонная с листами бумаги офисной Zoom плотностью 80 г/м², белизной СIE 150 (STORA ENSO, Финляндия), расчерченной на квадраты 2 x 2 см мышь компьютерная, ручка шариковая с пластмассовым корпусом (Vigotax, Украина), кружка керамическая объемом 250 мл диаметр 70 мм, телефон мобильный 13 x 6,5 см с пластиковым корпусом. Все рабочие места непосредственно после подготовки к исследованию были обработаны ДНК-разрушающей системой DNAzap™ PCR DNA Degradation Solution («Invitrogen», США). В качестве отрицательного контроля выступало не содержащее следов биологического материала рабочее место.

Исследование проводилось с участием 15 добровольцев с заранее определенным генотипом, которым предлагалось пользоваться в течение 6 часов подготовленным индивидуальным для каждого добровольца рабочим местом, и затем в течение 2-х часов – общим рабочим местом, в привычном для них режиме. Смешанный эксперимент был проведен для исследования сценария при наложении отпечатков пальцев от нескольких индивидуумов с целью определения ДНК-профиля лица, находившегося в контакте с объектами последним. Условия проведения исследования: температура в помещении – 22°C.

Все составляющие инвентаря, бывшие в употреблении добровольцами, были обработаны с помощью кусочков клейкой ленты 24 x 20 мм, 40 мкм фирмы «Axent» (Германия). Методика сбора заключалась в повторном прикладывании кусочков клейкой ленты к участкам исследуемых объектов, с наибольшей вероятностью содержащих следы биологического материала, до утраты ими адгезивных свойств, при этом обрабатывалась ограниченная

Таблица 1

центральная область стола 30 x 30 см, верхняя поверхность клавиш клавиатуры (монитор ноутбука не подвергался обработке), кнопки мыши, корпус ручки, ручки кружек, передняя и задняя поверхность корпуса мобильного телефона, правые нижние углы листов бумаги (квадрат 2 x 2 см).

После отбора материала кусочки клейкой ленты переносились в пробирки типа эппендорф. При этом кусочки клейкой ленты с 1 единицы исследования помещались в разные эппендорфы, надосадочную жидкость удаляли путем центрифугирования при 145 оборотов в минуту в течение 2 минут, осадок переносили в одну пробирку, таким образом, чтобы материал, собранный с одного рабочего места, находился в одной пробирке (всего 17 пробирок).

ДНК-экстракция проводилась с помощью набора для выделения ДНК из криминальных объектов PrepFiler®Forensic DNA Extraction Kit («Applied Biosystems», США) с соблюдением инструкций производителя.

Определение концентрации ДНК проводилось с помощью флуориметра Qubit 2.0 Instrument Q 32866 («Invitrogen», США).

Выделенную геномную ДНК типировали методом ПЦР по 15 гипервариабельным микросателлитным локусам;

Аmplификацию проводили в формате мультиплексной ПЦР, т.е. один мультиплекс на все 15 локусов с использованием набора реагентов «AmpFISTR®Identifiler Plus» («Applied Biosystems», США). Исследование проводили с использованием термоджиклера «GeneAmp®PCR 2720» («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Автоматический анализ продуктов амплификации с использованием набора «AmpFISTR®Identifiler Plus» и разделение флуоресцентно-меченных ПЦР-фрагментов проводилось с использованием метода капиллярного гель-электрофореза в 4 капиллярных матрицах длиной 36,0 см с полимером POP-4TM («Applied Biosystems», США).

Полученные результаты. В процессе работы проводили учет количества ДНК, выделенной после отбора скрытых следов биоматериала с помощью метода тейплифтинга. В ходе проведения смешанного эксперимента устанавливали, возможно ли определить ДНК-профиль индивидуума, контактировавшего с объектами рабочего места последним. Полученные данные в отношении выделенной ДНК при использовании метода тейплифтинга для отбора биологического материала с предметов индивидуального пользования отображены в таблице 1.

Как видно из представленной таблицы, среднее значение количества выделенной ДНК из 15 отобранных проб равно $M=0,058$, стандартное отклонение составляет $\delta=0,012649$, мода (M_0) – 0,05, медиана (Me) на уровне 0,05. Для определения ДНК-профилей проводили разделение и визуализацию продуктов амплификации, сравнивая ДНК образцов добровольцев и исследуемых объектов (результаты демонстрирует второй столбец таблицы).

Критерием позитивной идентификации биологического материала было получение продуктов амплификации выделенной ДНК по 15-и микросателлитным локусам и локусу для определения половой принадлежности Amel, т.е. определение «полного» профиля ДНК. Из таблицы видно, что часть положительных identifications личности по скрытым следам биологического происхождения составила 13,3%.

Следует отметить, что полученные ДНК-профили объектов полностью совпадали с соответствующими образцами.

**Выход ДНК
при использовании метода тейплифтинга**

№ п/п	Количество ДНК, нг/мкл	ДНК-профиль
1	0,05	13
2	0,05	15+Amel
3	0,06	12
4	0,08	13
5	0,05	14
6	0,05	13
7	0,05	12
8	0,09	13
9	0,07	13
10	0,06	13
11	0,06	11
12	0,05	14
13	0,05	15+Amel
14	0,05	14
15	0,05	12
16 (конт- роль)	-	-

Таким образом, полученные данные продемонстрировали, что метод тейплифтинга, используемый при отборе биологического материала из скрытых следов, таких, как контактные следы пальцев рук, дает возможность получить полные ДНК-профили в 2 случаях из 15. Получение неполных ДНК-профилей может быть связано с деградацией экстрагированной ДНК или наличием ингибиторов ПЦР в биоматериале.

Результаты смешанного эксперимента. Задачей смешанного эксперимента было определение ДНК-профиля последнего индивидуума, находившегося в контакте с предметами. Для проведения эксперимента с объектами рабочего места № 17 последовательно находились в контакте все 15 добровольцев. После отбора биологического материала с объектов-носителей с помощью метода тейплифтинга и выделения ДНК полученный ДНК-профиль сравнивали с известным генотипом добровольца, контактировавшего с объектами последним. Эксперимент не показал значимой тенденции к установлению ДНК-профиля последнего контактировавшего с объектами лица в силу того, что с рабочего места общего пользования был получен мультиаллельный профиль.

Выводы из данного исследования и перспективы. 1. Метод тейплифтинга дает возможность отобрать количество ДНК достаточное для проведения дальнейшего ДНК-анализа с установлением полного профиля ДНК в 2 случаях из 15.

2. Использование метода тейплифтинга при работе с контактными следами рук на предметах с гладкой поверхностью дает возможность получить полный ДНК-профиль в 13,3% случаев, что позволяет рекомендовать его для отбора скрытых следов биологического материала с предметов бытового назначения, например, в условиях осмотра места происшествия.

3. Положительными характеристиками данного метода можно считать его относительную доступность и простоту выполнения, минимальное воздействие на биологический материал, что исключает его преждевременную деградацию, и объект-носитель.

4. При наличии на одном объекте следов от различных индивидуумов, определение ДНК-профиля лица, находившегося в контакте с предметом последним, не представляется возможным из-за получения мультиаллельного ДНК-профиля.

Список літератури:

1. Бурчинський В. Г. Використання ДНК-аналізу у судово-медичних експертизах речових доказів та експертизах спірного батьківства (материнства, підміни дітей). – В. Г. Бурчинський, Т. В. Хохолєва, А. П. Демянчук та ін. – Київ, 2012. – 26 с.
2. Кривда Г. Ф. Судово-медичне дослідження речових доказів / Г. Ф. Кривда, А. П. Демянчук, В. О. Котельникова та ін. – Херсон: Наддніпряночка, 2014. – 460 с.
3. Clayton T. M. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling / T. M. Clayton, J. P. Whitaker, R. Sparkes, P. Gill // *Forensic Sci. Int.* – 1998. – № 91 (1). – P. 55–70.
4. Gill P. Application of low copy number DNA profiling / P. Gill // *Croat. Med. J.* – 2001. – № 42 (3). – P. 229–232.
5. Hoofstat D. E. DNA typing of fingerprints using capillary electrophoresis: effect of dactyloscopic powders / D. E. van Hoofstat, D. L. Deforce, I. P. Hubert De Pauw // *Electrophoresis.* – 1999. – № 20 (14). – P. 2870–2876.
6. Lowe A. The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces / A. Lowe, C. Murray, J. Whitaker // *Forensic Sci. Int.* – 2002. – № 129. – P. 25–34.
7. Oorschot R. A. DNA fingerprints from fingerprints / R. A. van Oorschot, M.K. Jones // *Nature.* – 1997. – № 387 (6635). – P. 767.
8. Wiegand P. DNA-Untersuchung von Hautepithelzellen asserviert am Rollkragenpullover und am Hals des Opfers // *Rechtsmedizin* 1998. – № 8. – P. 226–228.
9. Pesaresi M. Quali-quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints / M. Pesaresi, L. Buscemi, F. Alessandrini, A. Tagliabracci // *Prog. Forensic Genet.* – 2003. – № 9. – P. 947–951.
10. Phipps M. The tendency of individuals to transfer DNA to handled items / M. Phipps, S. Petricevic // *Forensic Sci. Int.* – 2007. – № 4. – P. 168.
11. Li R. Using Hydrophilic adhesive tape for collection of evidence for forensic DNA analysis / Li R, H. Harris // *Journal of Forensic Sciences.* – 2003. – № 48. – P. 1318–1321.
12. Richard C. L. Using hydrophilic adhesive tape for collection of evidence for forensic DNA analysis / C. L. Richard, A. H. Howard // *Journal of Forensic Science.* – 2006. – № 48. – P. 48.
13. Schulz M. M. A strategy for STR-analysis of cryptic epithelial cells on several textiles in practical casework / M. M. Schulz, W. Reichert // *Prog. Forensic Genet.* – 2000. – № 8. – P. 514–516.
14. Zamir A. Threat mail and forensic science: DNA profiling from items of evidence after treatment with DFO / A. Zamir, C. Oz, B. Geller // *J. Forensic Sci.* – 2000. – № 45 (2). – P. 445–446.

Кривда Р.Г., Стоєва М.І.

Одеський національний медичний університет

ОПТИМІЗАЦІЯ СПОСОБІВ ВИДІЛЕННЯ ДНК ІЗ ПРИХОВАНИХ СЛІДІВ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Анотація

Досліджено практичні питання оптимізації способів виділення ДНК із прихованих слідів біологічного матеріалу. Проаналізована ефективність методу тейпліфтингу для відбору контактних слідів рук на предметах побутового призначення з гладенькою поверхнею. Проведено змішане дослідження для вирішення питання щодо можливості встановлення ДНК-профілю особи, що знаходилась у контакті з предметом останньою. Дане дослідження продемонструвало ефективність методу тейпліфтингу для відбору біологічного матеріалу, що містить контактні сліди пальців рук. У той же час встановлення ДНК-профілю особи, що контактувала з об'єктами останньою, за результатами даного аналізу виявилось малоефективним.

Ключові слова: ДНК-профіль, приховані сліди, біологічний матеріал, тейпліфтинг.

Kryvda R.G., Stoieva M.I.

Odessa National Medical University

OPTIMIZATION OF DNA-EXTRACTION METHODS IN LATENT TRACES OF FORENSIC BIOLOGICAL MATERIAL

Summary

The practical aspects of optimization of DNA-extraction methods in latent traces of forensic biological material were investigated. The effectiveness of tape-lift method for collection of contact hand traces on the domestic objects was analyzed. The mixture experiment was carried out to investigate whether DNA-profile can be successfully obtained from the person who had touched the object last. This study has demonstrated the effectiveness of tape-lift method for collection of contact trace-containing biological material. The DNA-profile establishment of the person who had touched the object last, however, wasn't obtained.

Keywords: DNA-profile, latent traces, biological material, tape-lift method.