

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

**УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
І ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ**

"УЗГОДЖЕНО"

Начальник Головного управління
медичної допомоги дорослому
населенню МОЗ України



Т.В. Лобода

“30” грудня 1996 р.

**Використання ампліфікації високополіморфних локусів
ДНК в судово-медичній експертизі рідкої крові.**

(методичні рекомендації)

КИЇВ -1996

Установа-розробник : Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Установи-співрозробники: Головне бюро судово-медичної експертизи Міністерства охорони здоров'я України;
Бюро судово-медичної експертизи управління охорони здоров'я Полтавської облдержадміністрації;
Українська медична стоматологічна академія.

Автори:	Малюта Станіслав Станіславович	266 07 29
	Телегеев Геннадій Дмитрович	266 07 29
	Дибков Михайло Васильович	266 07 29
	Друзь Алла Федорівна	446 50 93
	Хоменок Тетяна Олегівна	446 50 93
	Почерняєв Констянтин Федорович	(05322)
72946		
	Балацький Віктор Миколайович	(05322) 72946
	Важнича Олена Митрофанівна	(05322) 72946

Рецензенти : Г.М. Дранник, доктор мед. наук, професор, зав. лабораторією імунології УНДІУН;

Т.І. Бужиєвська, доктор мед. наук, професор, зав. кафедрою медичної генетики Київської медичної академії післядипломної освіти

Одним з найважливіших розділів судової медицини є експертиза рідкої крові, яка проводиться в справах про спірне батьківство, материнство, заміну дітей, а також з метою встановлення особистості.

Методичні рекомендації про використання ампліфікації високополіморфних локусів ДНК для вирішення питань експертизи рідкої крові в Україні розроблені вперше.

В порівнянні з методами, які звичайно використовуються в таких експертизах (методи визначення маркерів ізосерологічних систем крові), метод ампліфікації високополіморфних (ВП) локусів ДНК дозволяє встановити генотип досліджуваних осіб, без встановлення якого вирішити питання про спірне походження дітей в більшості випадків неможливо.

Метод ампліфікації ВП локусів ДНК або полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) - це метод ампліфікації (розмноження копій) ДНК, за допомогою якого протягом кількох годин можна виділити та розмножити у 10^8 - 10^{12} разів певну послідовність ДНК. Подальше розділення отриманих фрагментів ДНК шляхом електрофорезу у агарозному чи поліакриламідному гелі дозволяє ідентифікувати специфічні ділянки ДНК без використання радіоактивних зондів, на відміну від методу аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів ДНК, або методу геномної дактилоскопії, який також дозволяє ідентифікувати особу за допомогою ДНК. Цей метод менш трудомісткий за класичний фінгерпринт, а також дозволяє здійснювати аналіз слідових кількостей ДНК, у тому числі частково деградованої ДНК. Однак висока чутливість методу підвищує небезпеку помилок внаслідок наявності навіть мізерних домішок сторонньої ДНК.

Досвід провідних лабораторій України та інших країн дозволив відібрати для ПЛР-аналізу ряд систем для вивчення високо-поліморфних ділянок геному людини, використання яких дає найкращі результати. Одночасне використання в аналізі 3-4 систем дозволяє проводити порівняння різних зразків ДНК і, за його результатами, робити висновки про їх походження в більшості випадків з вірогідністю до 99 % та вище. Таку точність підтвердження батьківства рутинними методами отримати практично неможливо.

Методичні рекомендації призначені для впровадження в роботу відділень судово-медичної імунології та судово-медичної цитології бюро судово-медичної експертизи.

2. ОБЛАДНАННЯ, РЕАГЕНТИ, РЕАКТИВИ

2.1. Обладнання

Центрифуга типу К-24 або аналогічна з максимальним прискоренням 10000-12000g та охолодженням з центрифужними пробірками; термостат з температурою 37°C ; холодильник з температурами 4°C та -20°C; блоки живлення постійного струму (0-300 В, 200 мА); автоматичні піпетки зі

змінним об'ємом на 2-20, 20-200 та 200-1000 мкл з наконечниками до них; пробірки Епендорф на 1,5 мл та 0,5 мл (придатні для ПЛР!); ультрафіолетова система з довжиною хвилі 254 нм та захисним екраном; фотоапарат, плівка "Мікрат 300"; камери для горизонтального і вертикального електрофорезу з планшетами для гелів і гребінками; скляні гомогенізатори на 50 мл; настільна центрифуга типу Епендорф; термоциклер; спектрофотометр.

2.2. Реагенти та реактиви

- N 1. Буфер для лізису клітин - 330 мМ сахарози, 1% Triton X100, 5мМ MgCl₂, 10 мМ тріс-НСl рН 7,6)
- N 2. Буфер для лізису ядер - 75 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА, рН 8,0
- N 3. 10% SDS (додецил сульфат натрію)
- N 4. Розчин протеінази К (20 мг/мл)
- N 5. 5 М ацетат калію, рН 4,8
- N 6. 96° етанол
- N 7. 70° етанол
- N 8. 50 мМ MgCl₂
- N 9. Суміш dNTP по 2,5 мМ кожного
- N 10. 10*буфер для проведення ПЛР - 670 мМ тріс-НСl, рН 8,4; 20мМ БСА (бичачого сироваткового альбуміну); 166 мМ сульфату амонію; 100мМ 2-меркаптоетанолу
- N 11. Прямий та зворотній праймери для проведення ПЛР для кожного з досліджуємих локусів
- N 12. Легке мінеральне масло для ПЛР
- N 13. Агароза для електрофорезу
- N 14. 30% акриламід. 29 г акриламіду (Обережно! Токсично! Проникає через шкіру!) та 1 г N,N'-метиленбісакриламіду розчиняють у воді до об'єму 100 мл
- N 15. Персульфат аммонію
- N 16. ТЕМЕД
- N 17. 5*Тріс-боратний буфер (5*ТВЕ) для електрофорезу 0,089 М тріс; 0,089 М борної кислоти; 0,002 М ЕДТА, рН 8,0
- N 18. Буфер для нанесення на гель (6-кратний): 0,25% бромфенолового синього; 0,25% ксиленціанолу; 30% гліцерину
- N 19. Розчин бромистого етідію (10 мг/мл)
- N 20. Маркер розмірів ДНК - ДНК фагу λ розщеплена ферментом Pst I
- N 21. Таг чи Tth полімераза
- N 22. Стабілізатор (цитрат натрію, гепарін, глюгіцир)

3. ВИВЧЕННЯ ЗРАЗКІВ КРОВІ МЕТОДОМ ПЛР-ДАКТИЛОСКОПІЇ

3.1.1. Забір матеріалу

Кров для генотипоскопії беруть в лабораторії Бюро судмедекспертизи за тими ж правилами, що й для імунологічних реакцій. Обов'язковим є не тільки суворе дотримання процесуальних норм, але і стерильність посуду,

інструментів.

Кров у кількості 5-10 мл одержують шляхом венепункції, стабілізують 5% розчином цитрату натрію (у співвідношенні 10:1) або гепарином (1-2 краплі) чи глюгіциром (2:1) і до виділення ДНК зберігають у закритих стерильних пробірках при +4°C для попередження бактеріального забруднення. У виняткових випадках можна взяти кров з пальця в кількості до 1 мл.

3.1.2. Виділення ДНК з крові

5 мл крові змішують з 30 мл холодного буферу N 1, гомогенізують в скляному гомогенізаторі 2-3 хв і витримують при 4°C протягом 30 хвилин. Звільнені в результаті лізису клітин ядра висаджують центрифугуванням 4500g 30 хв. Обережно зливають надосадову рідину і ресуспендують осад ядер у 5 мл буферу N 2. Додають при м'якому перемішуванні 0,5 мл 10% розчину SDS (N 3) та протеїназу K (N 4) до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Інкують суміш 16 год при 37°C.

Додають 2,5 мл 5 М розчину КАс (N 5), перемішують і витримують при 4°C 30 хв. Центрифугують при 6000 g 40 хв. Обережно, щоб не зачепити осад, переносять надосадову рідину в скляний стакан. Додають 15 мл охолодженого до -20°C етанолу (N 6) і намотують нитки ДНК на скляну паличку або запаяний кінець пастерівської піпетки. Згусток обережно промивають у розчині 70° етанолу (N 7) і висушують на повітрі. Скляну паличку вміщують в пробірку типу "ЕпENDORF", розчиняють ДНК у 500 мкл бідистильованої води і витримують 16-20 год при 4°C. Після розчинення ДНК, паличку виймають, пробірку закривають і зберігають при -20°C.

3.1.3. Оцінка якості та концентрації виділеної ДНК

Вимірюють оптичне поглинання (A) одержаних розчинів ДНК при довжинах хвиль 260 та 280 нм. Співвідношення $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ відповідає чистій ДНК. Концентрацію визначають виходячи з того, що $A_{260}=1$ при концентрації ДНК 50 мкг/мл і товщині шару 1см.

3.1.4. Ампліфікація ДНК (полімеразна ланцюгова реакція)

Принцип реакції полягає у багатоцикловогому направленому синтезі фрагменту ДНК з дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP) за допомогою термостабільної ДНК полімерази. Специфічність синтезу, тобто синтез тільки вибраної ділянки геному, визначається синтетичними затравками (праймерами), що обмежують дану ділянку і спрямовують синтез (розмноження) необхідного фрагменту (рис.1).

Проведення реакції ампліфікації:

Автоматичною піпеткою із змінними об'ємом вносять слідуючі компоненти: 5 мкл реакційного буферу N 10; 4 мкл суміші dNTP N 9; по 1 мкл прямого та зворотнього праймерів (концентрація $A_{260}= 0,1$ опт. од.); розчин $MgCl_2$ (оптимальна кількість підбирається експериментально); 1мкг ДНК; 2-3 од. термостабільної ДНК-полімерази (N21); деіонізована вода до 50 мкл.

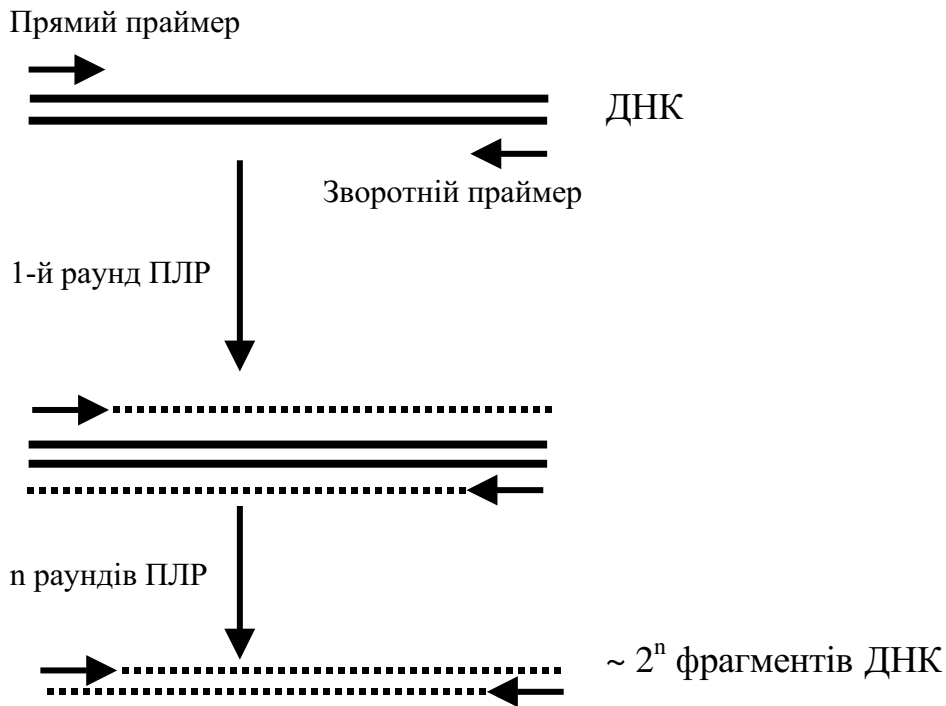


Рис. 1.Схема полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Нашаровують на суміш 50 мкл мінерального масла (N 12) для попередження випаровування зразка.

Проводять 25-30 циклів ампліфікації за умов, підібраних для кожної конкретної пари праймерів. Після проведення ПЛР ампліфікати зберігають при -20°C .

3.1.5. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації

Для визначення кількості та розмірів алелів у одержаній реакційній суміші використовують електрофорез в агарозному або поліакриламідному гелі.

3.1.5.1. Приготування 2% агарозного гелю та проведення горизонтального електрофорезу

Додають 2 г агарози для електрофорезу до 20 мл 5-кратного буферу ТБЕ і доводять об'єм суміші до 100 мл. Нагрівають суміш на киплячій водяній бані до повного плавлення агарози.

У кришку 96-лункового імунологічного планшету вставляють гребінку з об'ємом лунки 50 мкл. Охолоджують розплав агарози до 60°C і заливають в кришку до утворення меніску. Після затвердіння гелю (30-40 хв) гребінку обережно виймають. Заливають прилад для горизонтального електрофорезу 1*ТБЕ буфером, щоб гель був вкритий шаром 5-7 мм. Автоматичною піпеткою відбирають 15 мкл реакційної суміші і змішують з 3 мкл буферу N 18. Одержану суміш вносять у лунки гелю. В одну з лунок вносять маркер розмірів

ДНК N 20.

ДНК рухається від аноду (-) до катоду (+). Проводять електрофорез при напрузі 120 В (10 В/см) одну-дві години. За просуванням зразків спостерігають по барвниках з буфера для нанесення.

Після завершення форефу гель обережно виймають з кришки та фарбують у розчині бромістого етидію N 19 5-10 хв. Гель промивають водою 10-15 хв і розміщують на екрані транслюмінатора. В ультрафіолетових променях профарбовані фрагменти ДНК випромінюють оранжеве світло. Гель фотографують на плівку "Мікрат-300" крізь оранжевий світлофільтр.

3.1.5.2. Приготування 6% поліакриламідного гелю та проведення вертикального електрофорезу в ньому

Змішують 3 мл 30% розчину акриламідну (N 14); 3 мл 5*ТБЕ; 9 мл води; 20 мг персульфату аммонію; 10 мкл ТЕМЕД. Заливають суміш у рамку для гелю, як вказано в інструкції виробника, вставляють гребінку з об'ємом лунки 50 мкл. Після полімеризації (1-2 год при кімнатній температурі) виймають гребінець, рамку вставляють в прилад для вертикального електрофорезу, заливають ТБЕ буфер, щоб він вкривав гель шаром 0,5 см. Проводять префорез 30 хв при 150В. Вносять у лунки 20 мкл ампліфікату, змішаного з 5 мкл буферу N 18. ДНК рухається зверху вниз: від аноду (-) до катоду (+). Форез проводять при силі струму 10 мА близько 2-х годин. Бромфеноловий синій рухається у 6% поліакриламідному гелі разом з фрагментами ДНК розміром 50 п.н. Фарбування та фотографування гелю проводять аналогічно п.3.1.5.1.

3.2.1. Аналіз електрофореграм

Електрофореграма кожного з ампліфікатів ДНК повинна мати вигляд однієї чи двох смуг в залежності від зиготності. Розташування смуг повинно відповідати розмірам алелів даного локусу. Розмір ампліфікованого фрагменту визначають за допомогою ДНК маркерів. В якості маркеру можна використовувати ДНК фагу λ , оброблену ферментом PstI (N20), чи будь-який інший маркер необхідних розмірів.

Присутність на електрофореграмі інших фрагментів свідчить про неспецифічну ампліфікацію. Причиною цього може бути нестандартність наборів реактивів для ПЛР. В такому випадку необхідно провести підбір умов реакції за параметрами: зменшити концентрацію іонів Mg; зменшити кількість полімерази; зменшити кількість ДНК; збільшити температуру відпалювання праймерів.

3.2.2. Обчислення вірогідності підтвердження батьківства і оформлення результатів експертизи

Оскільки локуси, що досліджуються при проведенні експертизи, успадковуються за кодомінантним принципом, то маркерні смуги дитини повинні успадковуватись від матері та батька - по одній смузі від кожного з батьків (по кожному з досліджених локусів) (див рис.2.).

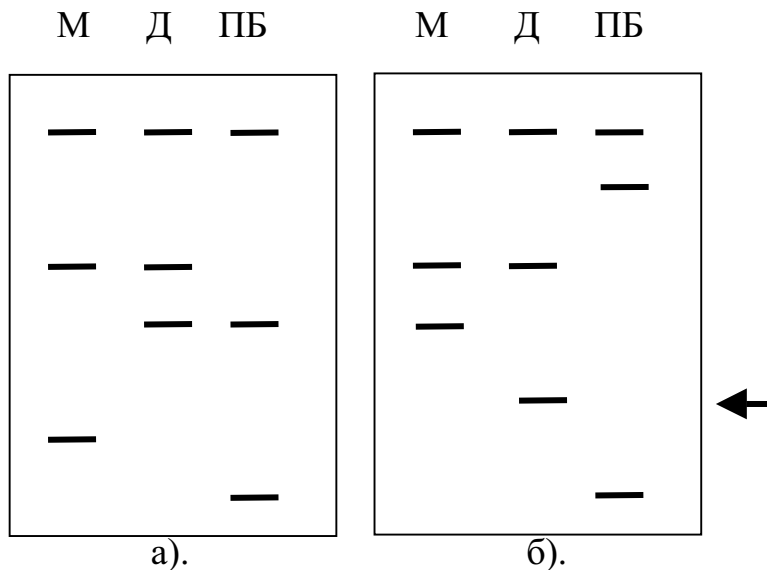


Рис. 2. Схематичне зображення електрофореграми ампліфікатів ДНК одного локусу. а) картина при підтвердженні батьківства; б) картина при виключенні батьківства (стрілкою вказана маркерна смуга, що не могла бути успадкована а ні від матері, а ні від дослідженого чоловіка(гаданого батька). М - мати; Д - дитина; ГБ - гаданий батько.

Висновок про виключення батьківства робиться, якщо у дитини було виявлено маркерні смуги (мінімум по двох системах), що не могли бути успадковані від матері та чоловіка, вказаного як батько, або якщо у дитини не просліджується маркерних смуг, характерних чоловікові, вказаному як батько.

У випадку, коли по досліджуваним локусам у дитини виявлені лише ті алелі, які характерні матері та передбачуваному батькові (тобто виключення батьківства не спостерігається), то проводиться розрахунок підтвердження батьківства. Для цього вираховують імовірність випадкового успадкування кожного з алелів (імовірність, з якою дитина могла б успадкувати даний алель від іншого чоловіка (жінки) з даної популяції).

Розрахунок імовірності випадкового успадкування алеля проводять за формулою: $P = 2p - p^2$, де P - імовірність випадкового успадкування алеля, p - частота алеля в популяції (з обов'язковим зазначенням джерела інформації).

Якщо було досліджено декілька локусів, вираховують кумулятивну імовірність випадкового спадкування алелів.

Кумулятивна імовірність випадкового спадкування алелів ($P_{\text{кум}}$) дорівнює добутку імовірностей випадкового спадкування алелів по окремим локусам.

Розрахунок імовірності підтвердження біологічного батьківства проводять за формулою ; $n = (1 - P_{\text{кум}}) \times 100\%$ (n - імовірність підтвердження біологічного батьківства).

При оформленні результатів експертизи в розділі "Дослідна частина" висновку експерта наводять джерело інформації (дані методичні

рекомендації), вказують марку ампліфікатора та фірму-виробника ферменту чи набору для ПЛР. У разі модифікації запропонованої методики ретельно подаються всі внесені зміни. Наводяться фото (якщо вони є) електрофореграм ампліфікатів по кожній з застосованих систем або розшифровка електрофореграм з наведенням розмірів виявлених алелів. Негативи зберігаються в лабораторії. Результати досліджень можна привести у вигляді таблиці; при необхідності дається розрахунок імовірності підтвердження батьківства.

Впровадження цих рекомендацій у судово-медичну практику дозволить суттєво підвищити точність та якість експертиз по встановленню особистості.

Література

1. Анализ генома. Методы: Пер. с англ. / Под. ред. К. Дейвиса. - М.: Мир, 1990. - 246 с.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М.: Мир, 1984.-480 с.
3. Соколов Б.П., Джемелинский В.В., Калинин В.Н. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // Молекул.генет., микробиол. и вирусол. - 1989. - N.6. С.45-46.
4. Чистяков Д.А., Гаврилов Д.К. и др. Анализ распределения аллелей четырех гипервариабельных тандемных повторов среди неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве, с помощью полимеразной цепной реакции // Молекулярная биология. 1993. - Т.27. - В.6. - С.1304-1314.
5. Дибков М.В., Телегеев Г.Д., Друзь А.Ф., Хоменок Т.О Вивчення зразків крові методом геномної дактилоскопії. Методичні рекомендації. // Республіканський центр наукової медичної інформації МОЗ України,- Київ,- 1995.
6. Boervinkle E., Xiong W., Fourest E., Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: Application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. - V.86. - P.212-216.
7. Horn Y.T., Richards B., Klinder K.W. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction // Nucl. Acids Res. 1989. - Vol.17. - N.5. - P.2140.
8. Jeffreys A.J., Wilson V., Neumann R., Keyle J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells // Nucl. Acids Res.- 1988.V. 16.- N. 23.- P. 10953 - 10971.