

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ СОҒЛИҚНИ САҚЛАШ ВАЗИРЛИГИ  
ТОШКЕНТ ТИББИЁТ АКАДЕМИЯСИ

2023

2011 йилдан чиқа бошлаган

TOSHKENT TIBBIYOT AKADEMIYASI  
**AХВОРОТНОМАСИ**



**В Е С Т Н И К**

ТАШКЕНТСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ

СПЕЦВЫПУСК ПОСВЯЩЁН

50-летию образования Ташкентского  
областного филиала Республиканского  
научно-практического центра  
судебно-медицинской экспертизы

11 сентября 2023

**МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СУДЕБНО МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЦСЭ им.Х.СУЛАЙМАНОВОЙ**

Ахмедова Д.Ш., Тошева Д.М.

Республиканский центр судебной экспертизы имени Х.Сулаймановой при Министерстве Юстиции Республики Узбекистан. Ташкент, Узбекистан

**Аннотация.** В данной статье рассмотрены методы экстракции ДНК из биологических материалов человека, применяемых в экспертной практике лаборатории СБЭ ДНК человека РЦСЭ имени Х.Сулаймановой. Изложены особенности методик их преимущества и недостатки.

**Ключевые слова** экстракция ДНК, экстракция ДНК органическими растворителями, экстракция ДНК с помощью магнитных частиц, автоматизация экстракции ДНК набор PrepFiler™ для выделения ДНК.

**Актуальность.** Выделение ДНК из биологических объектов это первый и наиболее важный этап судебно-молекулярно-генетической экспертизы. От качества процесса исполнения зависит результат исследования. Неправильно выбранный метод экстракции ДНК может привести к загрязнению или к полной потере ДНК. Необходимо учитывать при выборе метода: состояние объекта, давность образования следа и условия её хранения вещественного доказательства.

В настоящее время в судебно-молекулярно-генетическом анализе ДНК применяются множество методов экстракции ДНК. Большинство протоколов экстракции состоят из трех стадий:

- лизис клеток под воздействием буферных растворов для высвобождения в реакционную среду нуклеиновых кислот и других клеточных веществ: белков, липидов и т.д.;

- экстракция нуклеиновых кислот от других клеточных веществ путем применения различных химических реагентов различной природы;

- очистка нуклеиновых кислот, т.е. удаление ингибиторов ПЦР.

Не редко проводится четвертая стадия, концентрирование нуклеиновых кислот, которая выполняется для концентрирования аналитов с низкой концентрацией.

В различных методах и подходах выделения нуклеиновых кислот вышеперечисленные стадии могут быть пропущены или же добавлены в зависимости от метода анализа и исследуемого биологического материала. Например, при анализе клеток крови или слюны содержащих большое количество генетического материала проведение концентрирования ДНК не обязательно, однако при выделении нуклеиновых кислот из биологического материала, где выход аналита близок к низкому порогу чувствительности ПЦР концентрирование является обязательной стадией исследования.

Для извлечения ДНК из клеток можно применяют механический, ферментативный или химический лизис клеток. Химические методы основаны на применении различных поверхностно-активных веществ – детергентов, хаотропных и ферментных систем. Сочетание детергентов и хаотропных солей используют для солиubilизации стенок и мембран клеток для дезактивации внутриклеточ-

ных нуклеаз. Ферменты, например протеиназа может быть использованы для селективного разрушения некоторых типов биологического материала, главным образом содержащих белки. Механический метод извлечения ДНК может применяться любой тип биологического материал, однако он имеет существенный недостаток, а именно высокая возможность перекрестного загрязнения и сложность автоматизации.

В настоящее время в нашей лаборатории для молекулярно-генетического анализа применяются следующие методы выделения ДНК:

- Экстракция ДНК смесью органических растворителей – «органический метод»;

- Экстракция ДНК с помощью магнитных сфер – на основе коммерческого набора “PrepFiler” (TermoFisher, США).

**Метод экстракции ДНК органическими растворителями** является классическим методом экстракции ДНК и применим к биологическим материалам содержащим значительное количество генетического материала. Например, цельная кровь, видимые пятна крови, слюны, спермы на вещественных доказательствах, а также кости, мягкие ткани и их фрагменты недавно умершего человека, волосы с корневой частью, абортный материал и т.п.

На первой стадии метода экстракции ДНК органическими растворителями проводят лизис клеток в буферной системе (pH 7.5, содержащую 10mM трис-HCl, 10mM ЭДТА; 50mM NaCl, 2% SDS) в присутствии фермента протеиназа К при температуре +56 °С, в режиме постоянного перемешивания. После проведения лизиса клеток в соотношении 1:1 лизат смешивается со смесью органических растворителей фенол-хлороформ-изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1. При центрифугировании этой смеси происходит распределение нуклеиновых кислот водную фазу, белков на межфазной границе фаз и других биологических макромолекул в нижнюю органическую фазу. При этом фенол удаляет из водной фазы белки, а хлороформ – остатки фенола, изоамиловый спирт является пеногасителем и улучшает разделения органической и водной фаз. После перенесения водной фазы содержащей ДНК в новую пробирку проводят осаждения этило-

вым спиртом для удаления солей и маленьких органических молекул, подсушивают и ресуспендируют в буферном растворе pH7.5.

Протоколы экстракции ДНК с применением органических растворителей имеют такие преимущества, как получение ДНК хорошего качества и высокой концентрации, подходит для разных биологических объектов, хорошо работает со старым разложившимся материалом (кости, мышечная ткань и т.п.), выделенная ДНК очень стабильна и хорошо хранится в замороженном состоянии, низкая себестоимость, не требуют специальных материалов. Недостатки включают длительность и трудоемкость всего процесса (включают этапы: инкубацию, экстракцию, осаждение, промывание, высушивание, повторное ресуспендирование) выделения, не всегда удается удалить ингибиторы ПЦР (текстильные красители, ворс и т.п.), большие риски контаминации (из-за большой смены наконечников и пробирок), трудно автоматизировать, из-за токсичности реагентов. Также из-за сложного многостадийного манипулирования экстракция органическими растворителями не является идеальной и непрактична для работы с большими количествами образцов.

**Метод экстракции ДНК с помощью магнитных сфер.** Данный метод прочно занял место в судебно-молекулярно-генетическом анализе ДНК. Этот метод основан на способности магнитных частиц связывать нуклеиновые кислоты, и этот процесс может меняться в зависимости от pH среды: при низком значении pH среды магнитные частицы приобретают положительный заряд, который притягивает отрицательно-заряженные нуклеиновые кислоты. Белки и другие вещества не связываются с магнитными частицами и смываются промывочным буфером. Для элюции нуклеиновых кислот с магнитных частиц, их заряд нейтрализуется путем увеличения pH до 8.5. Очищенная ДНК переходит в буфер для элюции и может быть использована для дальнейших манипуляций.

В настоящее время на основе данного метода разработаны коммерческие наборы для выделения ДНК, например набор "PrepFiler" (TermoFisher, США). Набор представляют собой комплекты буферов и раствор магнитных частиц, предназначенных для выделения ДНК из широкого спектра криминалистических образцов, включая такие сложные образцы, как: кости, зубы, адгезивные материалы (окурки сигарет, липкие ленты и клапаны конвертов). Усовершенствованная методика выделения ДНК использованием поверхностной химии магнитных частиц обеспечивает увеличению выхода ДНК и достаточно высокой чистоты конечного продукта. Для выделения ДНК по стандартному протоколу из большинства типов криминалистических образцов, включая физиологические жидкости, пятна и мазки физиологических жидкостей, образцы биологических тканей. Из 1 мкл крови, в котором содержится от 4000 до 11000 ядерных клеток, можно получить приблизительно 25 – 65 нг

ДНК. Набор подходит для работы с образцами, содержащими потенциальные ингибиторы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделенная ДНК может быть использована в дальнейшем для проведения количественного анализа.

Протокол экстракции ДНК набора "PrepFiler" (TermoFisher, США) включает: Лизис клеток – проводится при 70°C добавлением лизирующего буфера набора и реагента дитиотреола (ДТТ) в режиме постоянного покачивания 900 об/мин в течение 40 минут. Далее лизированный образец остужается до комнатной температуры и встряхивается на вортексе. На дне не должно быть осадки магнитных частиц. В пробирку лизатом вносят 10 мкл магнитных частиц и 180 мкл изопропилового спирта для связывания ДНК с магнитными частицами, закрывают крышку, встряхивают на вортексе и еще раз центрифугируют. Помещают пробирку с лизированным образцом в шейкер и перемешивают при комнатной температуре на скорости 1000 об/мин в течение 10 минут.

Для удаления ингибиторов ПЦР – используется два буфера А и В, в составе которых содержится этиловый спирт. После проведения промывки в высушенному лизату добавляется 50 мкл элюирующего буфера набора и проводится инкубация при 70 °C при 900 об/мин в течение 5 минут. Пробирку с образцом ДНК помещают в магнитный штатив и держат до тех пор, пока осадок не перестанет накапливаться. После этого жидкость на дне пробирки переносят в чистые, стерильные пробирки, и используют для качественной и количественной оценки выделенной ДНК.

Таким образом, магнитный метод экстракции ДНК можно рекомендовать для экстракции биологических объектов с чрезвычайно малым содержанием ДНК такие как: смывы пятен крови, потожировые пятна, подногтевое содержимое и т. п.

Преимуществом набора "PrepFiler" является, возможность работы с биоматериалами содержащими чрезвычайно малое количество ДНК; применим для большого спектра биологических материалов, таких как: пятна крови, слюны, потожировых выделений, спермы, волос, костей и т.п.; возможность значительно сокращать время экстракции ДНК из костей и зубов; возможность хранения реагентов при комнатной температуре. Набор полностью удаляет ингибиторы ПЦР, что значительно повышает эффективность дальнейшего исследования STR-локусов.

На основе магнитного метода многие производители криминалистического оборудования разработали автоматизированные системы для выделения ДНК. Одной из таких является система AutoMate Express, которая проста в использовании, является надежный настольным прибором, в котором используются наборы "PrepFiler Express" и "PrepFiler Express BTA", упакованные в предварительно заполненные, запечатанные фольгой картриджи. Наборы PrepFiler разработаны специально

для улучшения количества и качества ДНК, выделенной из анализируемых образцов, тем самым увеличивая потенциал получения максимальной информации из последующих анализов коротких tandemных повторов (STR). Основные характеристики продукта: Самые различные варианты объема элюирования на рынке, с 7 объемами элюирования от 20 до 250 мкл. Предназначен для повышения выхода и общей чистоты ДНК, выделенной как из обычных, так и из сложных криминалистических образцов.

Обеспечивает высокое качество ДНК, не содержит ингибиторов ПЦР и подходит для последующего применения, например, для количественного анализа ПЦР в реальном времени и анализа с короткими tandemными повторами (STR). Простое и быстрое отделение субстрата от лизата с помощью уникальной колонки PrepFiler LySep. Быстрая и легкая настройка с готовыми к использованию предварительно заполненными картриджами. Закрытая система, которая минимизирует риск загрязнения и ошибок. Обработывает от 1 до 13 образцов за один запуск. Быстрое внедрение с предварительно утвержденными, предварительно запрограммированными инструментальными протоколами.

Интегрированное решение, включающее новые реагенты, расходные материалы и средства автоматизации для обеспечения экономии времени, рентабельности и надежности извлечения ДНК. Улучшает показатели успеха последующего генотипирования (STR) и качество профиля.

Автоматическая экспресс-система использует две различные конфигурации предфильтровальной химии. Комплект для экспресс-анализа ДНК PrepFiler подходит для большинства стандартных типов образцов, встречающихся в криминалистических лабораториях, таких как телесные жидкости на различных подложках, включая бумагу FTA, ватные тампоны, хлопчатобумажную ткань, джинсовую ткань и многие другие. Комплект для экспресс-анализа ДНК PrepFiler Express VTA был разработан специально для сложных образцов, таких как кости, зубы и образцы клея, например, сигаретные окурки и ленточные подъемники. Оба формата поставляются со всеми реагентами и пластмассовыми компонентами, включая колонки PrepFiler

LySep, необходимые для выполнения 52 операций по извлечению ДНК на приборе AutoMate Express. В состав экспресс-комплектов входит инновационная колонка PrepFiler LySep Column, которая значительно оптимизирует автономную часть экстракции. Буфер лизиса PrepFiler Lysis или буфер лизиса PrepFiler VTA добавляется непосредственно в колонку Лисеп PrepFiler вместе с образцом для инкубации. Затем колонка PrepFiler LySep быстро центрифугируется, что позволяет протекать лизису через разрывную мембрану, в то время как субстрат остается позади в колонке. Затем пробоотборник просто готов к помещению на прибор AutoMate Express. Это устраняет необходимость в ручном переносе лизисата и субстрата, экономя время и сводя к минимуму перекрестное загрязнение и события транспозиции образца.

#### **Заключение.**

При выборе метода исследования на этапе экстракции ДНК и достижения поставленной цели, а именно получения качественного препарата ДНК вне зависимости от типа биологического материала необходимо учитывать исходное содержание генетического материала, учитывать возможные риски, а также учитывать себестоимость методик. Поэтому целесообразно для объектов, содержащих заведомо большое количество генетического материала использовать метод экстракции органическими растворителями, а для объектов содержащих следовое количество генетического материала, также загрязненных ингибиторами ПЦР использовать набор "PrepFiler" и прибор AutoMate Express.

#### **Литература.**

1. Burden D. Guide to the distription of biological samples//Random primers.2012.Vol 25,no 12 P.1-25.
2. Moore D.D. Chory J., Ribaud R.K. Isolation and purification of the large D\NA restriction fragments from agarose gels// Current protocol in immunology. 1993.Vol.8, p10.5.1-10.5.12.
3. PrepFiler™ Набор для выделения ДНК из образцов для криминалистического анализа, руководство пользователя, AppliedBiosystems, 4390932
4. AutoMate Express™ Instrument User Guide, 4441982.

