



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53564

(13) A

(51) 7 A61B5/117

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ОСОБИ

1

(21) 2002076388

(22) 31 07 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Кривда Григорій Федорович, Сиволап Юрій Михайлович, Кривда Руслан Григорович, Кожухова Наталія Едуардівна

(73) ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

2

(57) Спосіб ідентифікації особи шляхом геномної дактилоскопії методом полімеразної ланцюгової реакції, що включає виділення ДНК із кісткової тканини трупа, який відрізняється тим, що використовують лізуючий буфер з додатковим включенням 1 % лаурилсаркозилу Na, при цьому екстракцію ДНК досліджуваного об'єкта проводять за температури 65°C протягом 50 - 60 хв, а потім - інкубацію за температури 37°C протягом 2-х діб

Винахід відноситься до області судової медицини і може бути використаний при ідентифікації особи по залишкам біологічного походження.

Ідентифікація особи здійснюється шляхом геномної дактилоскопії з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), при цьому, ДНК виділяють з кісткової тканини з застосуванням лізуючих агентів.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є метод виділення ДНК з кісткової тканини з використанням лізуючого буфера, який складається з 10mM Трису, pH 8.0, 100mM NaCl, 50mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS [1]. Наважка кістки масою 2 - 3г, одержану за допомогою механічного гомогенізатора, або з застосуванням рідкого азоту, переносили в конічну в пробірку з додаванням 30мл свіже виготовленого лізуючого буфера, з додаванням 1000мкл протеїнази К (концентрація 20мг/мл). Інкубували за температурою 56°C на протязі ночі, для повного лізису кісткової тканини. Зразок м'яко перемішували, 30мл розчину переносили у іншу пробірку і додавали до її вмісту 50мл суміші фенол / хлороформ / ізоаміловий спирт у співвідношенні 25 : 24 : 1, м'яко перемішували і центрифугували за максимальними обертами. Процедуру повторювали двічі. Надосадну рідину відбирали і переносили у верхній резервуар колонки "Центрікон - 100". Центрифугували 20 хвилин при 1000g до концентрування ДНК до об'єму 10 - 20мкл при кімнатній температурі. Після центрифугування відкидали вміст нижнього резервуару. У верхній резервуар колонки "Центрікон - 100", де концентрується розчин ДНК об'ємом 10 -

20мкл, додавали 2мл ТЕ-буфера та повторювали фільтрування 2 рази. Профільтрували розчин ДНК 3 рази через мембрану "Центрікон - 100" (сконцентрувавши ДНК до об'єму 10 - 20мкл). Зразок зберігали при температурі - 20°C.

Залежно від сумарного об'єму реакційної суміші ПЛР (від 7,5мкл до 50мкл) вибирали кількість отриманої ДНК для проведення реакції ампліфікації.

Однак, застосування вказаного вище методу для виділення ДНК із кісткової тканини має декілька недоліків: лізується не вся маса препарату, а її частина, що в подальшому може обумовити недостатній вихід ДНК, необхідний для типування, вказаний метод потребує застосування таких отруйних хімічних реактивів, як фенол, також потребує застосування досить коштовного приладдя типу "Центрікон - 100", або установки для ультрафільтрації.

В основу винаходу поставлена задача вдосконалення способу ідентифікації особи шляхом виділення ДНК із кісткової тканини, що є фрагментом геномної дактилоскопії методом ПЛР, що дозволить підвищити вірогідність ідентифікації.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно винаходу, на першому етапі геномної дактилоскопії - виділенні ДНК використовують лізуючий буфер з додатковим включенням 1% лаурилсаркозилу Na, при цьому екстракцію ДНК досліджуваного об'єкта проводять за температурою 65°C на протязі 50 - 60хв, а потім - інкубацію за температурою 37°C на протязі 2-х діб.

Спосіб здійснюється наступним чином. Із фра-

(13) A

(11) 53564

(19) UA

гмента трубчасті кiстки одержували кiсткову стружку за допомогою дрібного терпуга, потім 300 Омг одержаної маси переносили в 2 Омл епендорф і додавали 1.5мл 0.5М ЕДТА рН 8.0. Інкубували за кімнатною температурою на протязі 12 годин, центрифугували при 3000об/хвил, надосадну рідину видаляли. До одержаного осаду додавали 800 Омкл лізуючого буфера.

Склад лізуючого буфера

0.5М ЕДТА рН 8.0

1% лаурилсаркозил Na

0.5мг/мл протеїнази К

Інкубували за температурою 65°C на протязі 1 години, потім за 37°C на протязі двох діб. Після чого спостерігався повний лізис тканини. Після інкубації обробляли три рази сумішшю хлороформ / ізоаміловий спирт у співвідношенні 24 : 1 для інактивації протеїнази К та інших білків. Потім до водно-соп'яового шару додавали 1 / 3 об'єму 8М ацетату амоніа. Інкубували у холодильнику на протязі 30хвил. Центрифугували при 14000об/хвил на протязі 25хвил. Супернатант переносили у чисті пробірки і осаджували ДНК рівним об'ємом ізопропанолу. Промивали 70% етиловим спиртом на протязі 5хвил, центрифугували при 14000об/хвил, супернатант зливали, повторювали процедуру декілька разів, далі одержаний осад висушували за кімнатною температурою. Розчинювали в 100 Омкл ТЕ-буфера, проводили додаткову очистку Chelex-100 ("Bio-Rad", США) додавали Chelex-100 до кінцевої концентрації 5% і інкубували 30хвил при 56°C. Проби ДНК зберігали при температурі 4°C.

Якість виділеної ДНК визначали за результатами ампліфікації з використанням методу ПЛР з трьома парами праймерів, котрі гомологічні таким локусам генома людини: локус Amel (статева хромосома), локус HUMWVA (хромосома 12p 12-pter), локус HUMLPL (хромосома 8p 22).

Ампліфікацію ДНК проводили згідно Protocol II PCR Methods and Applications, 1991, v.1, №2 на термоциклері "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія) і термоциклері PTC-200 ("MJ Research", США). Для ампліфікації використовували набори "Promega" (США) і "Тапотили" (Росія). Ампліфіковані фрагменти ДНК розподіляли в 4% агарозних і 10% поліакриламідних гелях, фарбували етідієм бромідом і сріблом - відповідно. Документували ампліфіковані фрагменти, використовуючи систему для відеодокументації "Image Master YDS" ("Amersham pharmacia biotech", США).

Таким чином, за рахунок використання лізуючих агентів без механічного впливу на ДНК змінюється склад лізуючого буфера, що дозволяє виключити застосування сильних руйнуючих впливів на кiсткову тканину для визволення ДНК з клітин, в результаті чого ДНК деградує, а також в результаті зміни температурних і часових режимів інкубації на тривалу і м'яку інкубацію відбувається повний лізис клітин і повне відділення ДНК від білків та інших молекул, додаткова очистка одержаного розчину ДНК Chelex-100 ("Bio-Rad", США) дозволяє видалити інгібітори ПЛР.

Приклад конкретного використання способу

Випадок з практики СМЕ

У відділення був доставлений скелетований труп невідомого чоловіка у віці 25 - 30 років. При дослідженні фрагментів ребер, взятих від трупа, були виявлені антиген А та ізогемагглютенін а-В, однак категорично висловитися про групову належність біоматеріала не було можливим через сильну забрудненість.

Розглянувши матеріали уголовного діла з приводу зникнення гр. Г., прокуратура призначила генотипоскопічну експертизу, на рішення якої поставлене питання про біологічну спорідненість громадянки Ш. відносно чоловіка, скелетований труп якого було знайдено (встановлення материнства).

При проведенні геномної дактилоскопії методом ПЛР виділяли ДНК запропонованим способом з фрагментів трубчастих кісток, які належали скелетованому трупу невідомого чоловіка. При порівняльному аналізі ДНК, виділеної із крові гр. Ш., і ДНК, виділеної із фрагмента трубчасті кiстки, були виявлені загальні алелі за 10 локусами, що дозволило з вірогідністю 99,97% припустити материнство гр. Ш. по відношенню до чоловіка, скелетований труп якого було знайдено.

В порівнянні з прототипом запропоноване технічне рішення дозволяє за рахунок молекулярно-генетичних досліджень ДНК фрагментів трубчастих кісток трупа методом ПЛР підвищити ступінь вірогідності способу ідентифікації особи практично до 100%.

Література

1. Antonio Alonso, Simin Andelinovic, Edwin Huffine / DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples / Profiles in DNA - 2001 - V 4 №3 - P 3 - 8