

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Республіканський центр наукової медичної інформації

"Узгоджено"

Начальник Головного управління

медичної допомоги дорослому

населенню МОЗ України

А.М. Морозов

" 6 " X 1995р

**Вивчення зразків крові методом  
геномної дактилоскопії**

/методичні рекомендації/

КИЇВ -1995

Головна установа-розробник - Інститут молекулярної біології  
та генетики НАН України

Установа-співвиконавець - Головне бюро судово-медичної  
експертизи Міністерства охорони здоров'я України

Автори	Дибков Михайло Васильович	266 07 29
	Телегеев Геннадій Дмитрович	266 07 29
	Друзь Алла Федорівна	446 50 93
	Хоменок Тетяна Олегівна	446 50 93

Рецензент - Дранник Г.М.

Голова експертної комісії - Старовойтова Ріоріта Олексіївна

## 1. Вступ.

При проведенні судово-медичної експертизи важливо достовірно встановити, чи належать залишки крові чи інших біологічних тканин конкретній людині. Донедавна експерт вирішував це питання шляхом дослідження ряду біохімічних маркерів - еритроцитарних, лейкоцитарних, сироваткових тощо. Але навіть за можливості проведення дослідження з використанням великої кількості таких маркерів експерт не може зробити категоричний висновок про належність даного зразка біологічного матеріалу конкретній особі, тобто позитивна ідентифікація неможлива. Для вирішення цієї проблеми з початку 80-х років застосовують аналіз нових генетичних маркерів - поліморфних ділянок ДНК. Особливі перспективи відкрились після виявлення так званих гіперваріабельних ділянок геному (ГДГ), що характеризуються широким поліморфізмом у популяції. У 1985 році Джефрісом (Jeffreys) та спів. були виявлені ГДГ, що локалізуються в кількох локусах хромосом, успадковуються як менделівські кодомінантні маркери та мають широку мінливість у популяції. Ці ділянки, які Джефріс назвав мінісателітами, було запропоновано використовувати для позитивної ідентифікації особистості в судово-медичній експертизі [1,2,3]. Іншими групами дослідників було виявлено кілька інших родин гіперваріабельних ділянок геному. Усі вони мають певні спільні риси. Основою структури є тандемно розміщені копії довжиною 9-16 нуклеотидів, що повторюються від 3 до 29 разів. Тому у одному і тому ж локусі у різних людей може бути різна кількість копій - це і є основою варіабельності. Комбінація ГДГ кожної людини є високоіндивідуальною характеристикою, а тому метод їх виявлення і аналізу було названо геномною дактилоскопією.

Даним методом можна вивчати будь-який матеріал, що містить ДНК: кров, залишки сперми, тканини органів тощо, оскільки локалізація ГДГ у різних тканинах однакова. За приблизними оцінками у ДНК людини нараховується близько 1500 ГДГ. Однак при проведенні експертизи звичайно виявляють одну ГДГ - при застосуванні локуспецифічних зондів, або кілька - при застосуванні полілокусних зондів.

Дослідження поліморфізму проводять за допомогою аналізу поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ-аналіз). Для цього тотальну ДНК, виділену з крові, сперми чи іншої тканини, обробляють рестрикційним ферментом, що не розщеплює внутрішні ділянки ГДГ. Одержані фрагменти ДНК електрофоретично розділяють в агарозному гелі і проводять гібридизаційний аналіз з використанням зондів, що виявляють гіперваріабельні ділянки [4]. Як було зазначено вище, використовують два типи зондів - локуспецифічні, що виявляють одну ГДГ, та полілокусні, що виявляють певну родину ГДГ. На сьогодні використовується безліч зондів обох типів, як виділених з ДНК різних

організмів, так і синтезованих хімічним шляхом. Найбільш відомими є зонди 33.6, 33.15, зонд на основі фагу M13, (CAC)<sub>5</sub>, (GATA)<sub>4</sub> та інші.

Зонди мітяться радіоактивним ізотопом фосфору P<sup>32</sup> або нерадіоактивними методами. Для проведення гібридизації підбирають умови, за яких зонд специфічно зв'язується тільки з даною ГДГ (для локуспецифічного зонду) або певною родиною «мінісателітів». При встановленні локалізації зонду ( за допомогою радіографії при використанні P<sup>32</sup>) одержують маркерну смугу, що вказує на локалізацію рестрикційного фрагменту. При використанні полілокусного зонду дослідник одержує набір вертикальних смуг, що відповідають кількості локусів даної родини ГДГ при використанні певного ферменту та зонду. Оскільки варіабельність за даними локусами велика, положення смуг неоднакове у різних людей. І оскільки імовірність випадкового збігу всіх маркерних смуг дуже мала ( так для зондів 33.6+33.15 ця величина складає  $3 \times 10^{-11}$ , тобто 1 на 30 мільярдів), то набір маркерних смуг було названо «геномним дактиловідбиткомі (DNA fingerprint). Виключенням є картини, що виявляються при аналізі однойцевих близнюків. Їхні геномні дактиловідбитки ідентичні, оскільки близнюки походять з однієї яйцеклітини.

На сьогоднішній день метод геномної дактилоскопії є важливим методом позитивної ідентифікації особистості, вирішення справ про спірне батьківство, викрадення та підміну дітей, пологів та абортів після згвалтування тощо.

Дана робота пропонує авторську модифікацію методики дослідження крові методом геномної дактилоскопії, що була апробована на експертному матеріалі Головного бюро судово-медичної експертизи МОЗ України. В розділі 2 наведено приблизний перелік необхідного обладнання та реактивів, що необхідні для впровадження даного методу.

## **2. ОБЛАДНАННЯ, РЕАГЕНТИ, РЕАКТИВИ.**

### **2.1. Обладнання.**

При використанні радіоактивномічених зондів лабораторія повинна мати приміщення і обладнання для ізотопного блоку класу III.

Настільна центрифуга типу Епандорф з прискоренням 1000-10000g, бажано з охолодженням; центрифуга типу К-24 або аналогічна з максимальним прискоренням 10000- 12000g та охолодженням; термостати з температурою від 37°C до 80°C; холодильник з температурами 4°C та -20°C; вакуумний насос; вакуумна шафа з нагрівачем до 80°C; блоки живлення постійного струму ( 0-200 В, 200 мА ); автоматичні піпетки зі змінним об'ємом на 2-20, 20-200 та 200-1000 мкл з наконечниками до них; пробірки Епандорф на 1,5 мл; ультрафіолетова система з довжиною хвилі 254 нм та

захисним екраном; мембрани нейлонові; фотоапарат, плівка "Мікрат 300"; фільтрувальний папір; ватман ЗММ; вимірювач радіактивності, захисні екрани, маска, рукавиці; рентгенівська плівка РМ-В або РМ-1; касети рентгенівські медичні з посилюючими екранами; камера для горизонтального і вертикального фореузу з планшетами для гелів і гребінками; скляні гомогенізатори на 15- мл; прилад для зварювання поліетилену типу "Молнія".

## **2.2. Реагенти та реактиви.**

Для приготування розчинів необхідно використовувати дистильовану воду та реактиви з чистотою не нижче "ЧДА".

№ 1. Лізуючий сахарозний буфер ( 330 мМ сахарози, 1% Triton X100, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ тріс-НСl рН 7,6). 57 г сахарози розчинити в 350 мл води, додати 5 мл Triton X100, 2,5 мл 1М MgCl<sub>2</sub> ( №9) та 5 мл 1 М тріс-НСl ( №7) і довести об'єм розчину до 500 мл. Зберігати при -20°C. При утворенні осаду розчин не використовувати.

№ 2. Лізуючий розчин. ( 10мМ тріс-НСl, 100мМ NaCl, 2мМ EDTA рН 8,0). До 80 мл води додають 1мл розчину № 7 (рН 8,0), 1,7 мл розчину № 5 та 400 мкл розчину № 8. Довести об'єм до 100 мл. Зберігати при 4°C.

№ 3. 10% SDS ( додецил сульфат натрію). 20 г SDS розчинити при нагріванні до 50°C в 180 мл води ( Обережно! Алерген!) і довести об'єм до 200 мл.

№ 4. Розчин протеїнази К ( 20 мг/мл). 20 мг сухої протеїнази К розчинити в 1 мл води і розфасувати по 50- 100 мкл в пробірки Епендорф. Зберігати розчин при -20°C.

№ 5. Насичений розчин NaCl.

Розчиняють NaCl до повного насичення розчину (сіль не розчиняється навіть при нагріванні). На 200 мл насиченого розчину необхідно 80 г солі.

№ 6. ТЕ-буфер ( 10 мМ тріс-НСl, 1 мМ EDTA рН 7,6).

До 80 мл води додають 1 мл розчину № 7 та 200 мкл розчину № 8. Об'єм доводять до 100 мл. Зберігають при 4°C.

№ 7. 1 М тріс-НСl. 12,1 г тріса розчинити в 80 мл води і довести рН соляною кислотою до необхідних значень: 7,6 та 8,0. Довести об'єми до 100 мл. Зберігати при температурі 4°C.

№ 8. 0,5 М EDTA рН 8,0. 18,6 г солі EDTAx2H<sub>2</sub>O розчинити в 80 мл води. Довести рН до 8,0 додаванням NaOH. Об'єм розчину довести до 100 мл. Зберігати при 4°C.

№ 9. 1М MgCl<sub>2</sub>. 20,3 г MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O (сіль дуже гігроскопічна, використовувати невеликі фасовки!) розчинити в 80 мл води. Довести об'єм до 100 мл. Зберігати при 4°C.

№ 10. 10xТБЕ буфер. 108 г тріса розчинити в 800 мл води, додати 55 г борної кислоти та 9,3г EDTA. Довести об'єм до 1 л і зберігати при кімнатній температурі.

№ 11. 1xTBE

100 мл розчину № 10 змішати з 900 мл води.

№ 12. 0,8% агарозний гель.

Суміш готують перед приготуванням гелю. 0,8 г агарози розвести в 100 мл розчину № 11 і довести до кипіння на водяній бані або в короткохвильовій печі. Кип'ятити до повного плавлення агарози. Охолодити до 65°C.

№ 13. 6x буфер для нанесення на гель.

По 25 мг бромфенолового синього та ксиленцианолу розчиняють у 30% гліцерині до об'єму 10 мл. Зберігають при 4°C.

№ 14. Концентрований розчин бромистого етидію (20 мг/мл). 200 мг бромистого етидію (Обережно, канцероген!) розчиняють в 10 мл води. Зберігати при 4°C.

№ 15. Розчин для забарвлення гелів. 250 мкл розчину №14 додати до 500 мл води. Зберігати при 4°C. Можна використовувати неодноразово.

№ 16. 8М ацетат амонію. 61,6 г солі розчиняють в 50 мл води. Об'єм довести до 100 мл і зберігати при 4°C.

№ 17. 0,2 № HCl. 8,6 мл концентрованої соляної кислоти ( $r=1,12$ ) розчинити в 500 мл води.

№ 18. Денатуруючий розчин ( 0,5 М NaOH, 1,5М NaCl). 10 г NaOH розчинити в 400 мл води, додати 43,5 г NaCl. Довести об'єм до 500 мл.

№ 19. Нейтралізуючий розчин. 34 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  розчинити в 800 мл води та додати 32 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Об'єм розчину довести до 1 л.

№ 20. 10xSSC. 87,7 г NaCl та 55 г цитрату натрію розчинити в 800 мл води. Довести рН до 7,0 додаванням кількох крапель NaOH. Об'єм розчину довести до 1 літра.

№ 21. 3 М ацетат натрію рН 5,2. 24,6 г солі ацетату натрію «хчїрозчинити у 80 мл води. Довести рН до 5,2 оцтовою кислотою. Об'єм розчину довести до 100 мл і профільтрувати.

№ 22. Водонасичений фенол.

Перегнаний при 160°C фенол охолоджують до 70°C, додають 8-гїдроксихинолін до кінцевої концентрації 0,1% і, розфасувавши на невеликі порції, зберігають при -20°C. Для приготування розчину фенолу до алїквоти додати рівний об'єм 0,1 М трїс-HCl (1 мл розчину № 7 змішати з 9 мл води). Зберігати кілька днів при 4°C до зміни забарвлення з жовтого на коричневе.

№ 23. "Хлороформ".

Змішати хлороформ з ізоаміловим спиртом у співвідношенні 20:1. Зберігати під шаром води при кімнатній температурі.

№ 24. Розчин для відмивки фільтрів (2xSSC, 0,1% SDS).

У 600 мл води додають 200 мл розчину № 20 та 10 мл розчину № 3 і доводять об'єм до 1л.

№ 25. 30% акриламід. 29 г акриламиду ( Обережно! Токсично! Проникає через шкіру!) та 1 г N,N'-метиленабісакриламиду розчиняють у воді до об'єму 100 мл.

№ 26. 10% персульфат аммонію. 50 мг персульфату розчиняють в 500 мкл води.

№ 27. Денатуруючий буфер для нанесення на гель.

В 10 мл деіонізованого 90% формаміду розчиняють по 25 мг ксиленціанолу та бромфенолового синього. Зберігають при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

№ 28. Буфер для елюції. 3,1 мл розчину № 16 та 100 мкл розчину № 8 розводять водою до 50

мл.

№ 29. Розчин для гібридизації.

В 50 мл води розчиняють 6,15 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , додають 2 мл  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (к), 7г SDS, 100мкл розчину №8, 0,2 г БСА і доводять об'єм до 100 мл.

### **3. ВИВЧЕННЯ ЗРАЗКІВ КРОВІ МЕТОДОМ ГЕНОМНОЇ ДАКТИЛОСКОПІЇ.**

#### **3.1. Техніка одержання геномних дактиловідбитків.**

##### **3.1.1. Виділення ДНК з крові.**

Дана методика дозволяє отримати очищену ДНК з нативної крові без застосування шкідливих органічних сполук ( фенолу та хлороформу), що використовуються в більшості методик. Для виділення ДНК за даним методом необхідно використовувати кров, що зберігалась не більше однієї доби при  $+4^{\circ}\text{C}$  (див. методику). При недостатній очистці зразків іноді все ж необхідно використовувати стандартний фенол-хлороформний метод для додаткового очищення ДНК.

Для дослідження беруть 5 мл крові у гепаринізовану пробірку чи додають до крові розчин №8 у співвідношенні 9:1 ( якщо за якихось причин не можливе виділення крові одразу після відбору, допускається зберігання при  $+4^{\circ}\text{C}$  протягом однієї доби). Кров охолоджують на льоду і додають рівний об'єм дистильованої води (  $0- 4^{\circ}\text{C}$ ). Гемолізують еритроцити на льоду 5 хвилин. Центрифугують клітини при  $10000g$  ( кількість обертів визначають за документацією на конкретну центрифугу або розраховують) 15 хв при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант зливають, а до осадів додають 10 мл охолодженого на льоду сахарозного буферу (розчин № 1) і старанно гомогенізують в скляному гомогенізаторі 2-3 хв. Суспензію, що містить ядра та залишки клітин, центрифугують при  $4500 g$  20 хв при  $4^{\circ}\text{C}$ . До осаду додають 5 мл розчину №1 та повторюють процедури гомогенізації та

центрифугування. До осаду додають 2 мл лізуючого розчину № 2 та 200 мкл 10% розчину SDS (N3). Обережно змішують ( помітно підвищення в'язкості розчину) та додають 10 мкл протеїнази К (N 4) до кінцевої концентрації 50 мкг/мл. Інкують суміш в термостаті 18 год при 37°C (за можливості при м'якому погойдунні). Додають 1 мл насиченого NaCl ( №5) ретельно, але обережно змішують та центрифугують при 4500g 25 хв за кімнатної температури. Обережно відбирають супернатант, що містить ДНК ( важливо не зачепити осад, що містить білки), і додають 2,5 об'єми 96° етилового спирту та намотують ДНК на скляну паличку або центрифугують при 10000g 15 хв з охолодженням (якщо можливо - при -20°C). ДНК, що намотана на паличку чи осаджена в пробірці, обережно, але швидко промивають 70° етанолом та підсушують на повітрі. Отриману ДНК розчиняють в 100-500 мкл TE ( № 6) і зберігають при 4°C.

### **3.1.2. Визначення концентрації ДНК.**

Концентрацію ДНК звичайно визначають спектрофотометрично і уточнюють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі, однак етап спектрофотометрії не є обов'язковим. Для аналізу розчинів об'ємом 200 мкл користуються спеціальними 1 мм кюветами для спектрофотометрії. Необхідно встановити співвідношення поглинання при 260 та 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ). Концентрація розраховується за формулою  $c=500 \times A_{260}$  [мкг/мл] при товщині шару  $l=1$  мм. За співвідношенням  $A_{260}/A_{280}$  контролюють ступінь забруднення зразків білком. Для очищених препаратів цей показник складає 1,75- 2,00. Якщо співвідношення менше 1,75, рекомендується провести доочистку зразка. Зручно використовувати спектрофотометр з автоматичним визначенням концентрації зразків. Одержана концентрація підлягає обов'язковому уточненню методом електрофорезу в агарозному гелі. Як стандарт звичайно використовують ДНК фагу 1 в кількості 0,1; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мкг ДНК на лунку.

Для проведення фореу камеру заповнюють 1xТБЕ буфером ( № 11). Детальну інформацію про будову камери та умови проведення електрофорезу можна знайти в [5]. При використанні фірмових наборів необхідно ознайомитись з інструкцією по експлуатації. Безпосередньо перед проведенням електрофорезу готують 0,8% агарозний гель ( № 12). Для цього після охолодження розчину до 65°C гель заливають у планшет для гелів ( можна використовувати поліакрилові кришки з використаних імунологічних планшетів одноразового використання), попередньо встановивши гребінку паралельно до краю планшета. Відстань між поверхнею планшета і гребінкою повинна бути 0,2- 0,5 мм. Після повної полімеризації геля ( 30 - 40 хв) обережно виймають гребінку і планшет вміщують в камеру для фореу. Буфер повинен покривати гель на 2- 5мм. Для



нанесення зразків на гель використовують 6хбуфер ( № 13) - на 5мкл проби 1 мкл буферу. Електрофорез проводять при напрузі 60-80В 1-2 год. ДНК просувається від негативно зарядженого електрода "-" до позитивно зарядженого "+". Пробіг ДНК від старту повинен бути не менш ніж 2 см ( контролюють по переміщенню барвників з буферу для нанесення). Для візуалізації ДНК гель профарбовують в розчині бромистого етидію ( № 15) ( Обережно! Канцероген!) 10-20 хв і розглядають при УФ опроміненні (з обов'язковим використанням захисних засобів очей та шкіри !). Концентрацію визначають, порівнюючи дослідний зразок із стандартом.

### **3.1.3. Рестрикція ДНК.**

Для рестрикції відбирають 15 мкг ДНК у пробірку типу "Епендорф", додають 3М розчин NaAc (N 21) до кінцевої концентрації 0,15 М (1/20 об'єму відібраного розчину ДНК) та 2,5 об'єми етанолу. Витримують 1 год при -20°C і центрифугують при 10000 g 20 хв при 4°C на центрифугі типу Епендорф. Осад ДНК швидко промивають 70° етанолом підсушують на повітрі та розчиняють в 40 мкл бідистильованої води. Додають 5 мкл 10хбуферу для ферменту BsuRI ( склад буфера визначається виробником), 50-60одиниць ферменту BsuRI та воду до 50 мкл. Ретельно змішують та інкубують 4 години при 37°C. Для перевірки повноти рестрикції на агарозний гель наносять по 2 мкл зразків, змішавши з 2 мкл буферу № 13 та 10 мкл води. Як маркер використовують ДНК фагу  $\lambda$ , розщеплену ферментом HindIII. При неповній рестрикції додають 30 од ферменту і продовжують інкубацію на 2-3 год. Неповна рестрикція може бути обумовлена недостатньою очисткою ДНК ( іноді необхідна фенол-хлороформна очистка зразків (див."Доочищення зразків")), низькою якістю ферменту чи буферу до нього, забрудненням посуду тощо. Після перевірки повноти рестрикції до зразків додають 0,25 об'єму 8М NH<sub>4</sub>Ac ( № 16) ( до концентрації 2М) та 2 об'єми етанолу. Витримують 1-2 год при -20°C та центрифугують при 10000g 15 хв при 4°C. Осад швидко промивають холодним 70° етанолом, підсушують на повітрі та розчиняють у 30 мкл води. Зразки наносять на препаративний агарозний гель або зберігають при -20°C.

### **3.1.4. Доочищення зразків.**

До ДНК, розчиненої в ТЕ, додають один об'єм розчину фенолу № 22 і ретельно, але обережно емульгують. Центрифугують 10 хв 6000g при кімнатній температурі. Відбирають верхню фазу в іншу пробірку і додають рівний об'єм "хлороформу"№ 23, емульгують і центрифугують 2 хв при 6000g. Відбирають верхню фазу і обробку

«хлороформоміповторюють 2 рази. До очищеного розчину ДНК додають  $\frac{1}{20}$  об'єму розчину № 21 та 2,5 об'єми етанолу. Намотують ДНК на скляну паличку і розчиняють у 200-500 мкл ТЕ. Очищений препарат зберігають при 4°C.

### **3.1.5. Препаративний електрофорез.**

Готують 0,9% агарозний гель ( № 12) і заливають великий планшет довжиною 20-25см. Товщина гелю має бути 4-5 мм. Вносять в лунки 5 та 10 мкг розщепленої ДНК кожного із зразків, що вивчаються, (10 та 20 мкл розчину рестриктів), розщеплену ДНК випадкової людини як негативний контроль та маркер молекулярної ваги, наприклад  $\lambda$ /HindIII. Електрофорез проводять 36 год при 40- В. Гель профарбовують бромистим етидієм (№15) та фотографують на плівку "Мікрат-300" при оранжевому світлофільтрі.

### **3.1.6. Перенесення на фільтр.**

Можливі кілька варіантів перенесення ДНК на фільтр. Це "блоттінг" за Саузерном, електроблоттінг, вакуумне перенесення та ін. Для двох останніх способів необхідні спеціальні прилади. Методики перенесення ДНК з їх використанням можна звичайно знайти в документації до приладів.

#### **Перенесення за Саузерном.**

Для фіксації розділених в агарозі ДНК-фрагментів використовують нітроцелюлозні та нейлонові ( капронові) мембрани з діаметром пор 0,2 - 0,45 мкм. Нейлонові мембрани зручніші у використанні і дозволяють отримувати якісні картини.

Після фотографування гель обробляють в 0,2М розчині HCl ( № 17) 10 хв. Промивають гель водою та занурюють в денатуруючий розчин ( № 18) на 30 хв при м'якому погойдуванні. Промивши водою, гель обробляють нейтралізуючим розчином ( №19) два рази по 30 хв. По розміру геля вирізають нейлоновий фільтр (! Всі процедури необхідно виконувати в гумових рукавичках або ж проводити маніпуляції, особливо з фільтром, за допомогою пінцетів!) та стос фільтрувального паперу товщиною 7-10 см (можна використовувати будь-який гігроскопічний папір чи інші матеріали, крім початкового шару 1 см). Готують 500 -1000 мл 10xSSC ( № 20). На строго горизонтальній поверхні ставлять кювету, всередині якої розміщено столик з гладкою верхньою поверхнею, і збирають прилад для перенесення ДНК за рис.1. Розчин 10xSSC не повинен сягати верхньої поверхні столика. Важливо видалити всі пухирці повітря між столиком і ватманом 3ММ, ватманом і гелем, і особливо між гелем та мембраною. Зверху прикладають вантаж 0,5 -1 кг. Перенесення триває 16-18 год. Після цього підсушують

фільтр на повітрі та фіксують ДНК на мембрані прогріванням при 80°C протягом 2 год, бажано у вакуумі.

### **3.1.7. Гібридизація та радіоавтографія.**

Розчини для прегібридизації та гібридизації підбирають в залежності від типу зонду, що використовують для виявлення ГДГ.

#### **Гібридизація з зондом на основі фагу M13.**

Зонд одержують шляхом добудови на одноланцюговій матриці фагу M13 з подальшою очисткою синтезованого зонду в поліакриламідному гелі. Як затравку використовують спеціально синтезований 15-мерний олігонуклеотидний праймер.

Усі роботи з радіоактивними ізотопами проводяться згідно з Вимогами норм радіаційної безпеки НРБ-76/87 та Основними санітарними правилами ОСП-72/87.

У пробірку з висушеним [a-P<sup>32</sup>]-ЦТФ (100 мкКі) додають 1 мкг одноланцюгової форми фагу M13, 8 нг праймеру, 2 мкл буферу для ферменту «фрагмент Кленоваі, та воду до 10 мкл. Витримують 30 хв при 60°C і додають по 2 мкл 0,5 мМ розчинів дАТФ, дТТФ, дГТФ та 3- од "фрагменту Кленова". Доводять об'єм суміші до 20 мкл і інкубують 7хв при 37°C. Реакцію зупиняють, додавши 2 мкл розчину №8.

Очищення зонду проводять в 8% денатуруючому поліакриламідному гелі ( детальніше див. [5]). Для приготування гелю беруть 6,3 г сечовини, додають 13,3 мл розчину № 25, 0,5 мл № 26, 5 мл №10 та додають воду до 50 мл. Після приготування скла для заливки гелів до суміші додають 10 мкл ТЕМЕД, перемішують і швидко заливають гель. Після полімеризації скло з гелем вміщують в апарат для вертикального фореку і проводять префореку при 200 В 30 хв. Суміш з неочищеним зондом змішують з рівним об'ємом розчину № 27, прогривають 5 хв при 95°C і вносять в лунку гелю. Фореку проводять при 20 В/см 1 год. Гель експонують в темноті з плівкою РМ-В кілька хвилин для виявлення локалізації зонду ( фрагменти 100 -700 п.н.). Вирізають смугу гелю, що містить зонд, не зачепивши ДНК фагу M13, що лишилась на старті, подрібнюють та додають рівний об'єм розчину для елюції №28. Інкубують 18 год при 37°C. Центрифугують при 10000g 10 хв і відбирають супернатант, не зачіпаючи осад гелю. Додають до залишків гелю 0,5 об'єму розчину № 28, змішують і повторно центрифугують. Відбирають супернатант, об'єднують з першою фракцією, додають 2,5 об'єми етанолу та витримують 2 год при -20°C.

Центрифугують при 10000g 20 хв при 4°C. Зливають супернатант і розчиняють осад в 100 мкл води.

Фільтр з перенесеною на нього ДНК змочують в розчині № 20 і герметично запаюють в

поліетиленовий пакет. Зрізавши кут в пакеті, додають розчин № 29 з розрахунку 10 мл на 400 см<sup>2</sup> фільтру, герметично заварюють та інкубують 18 год при 60°C. Додають очищений зонд та інкубують 24 год при 60°C.

Фільтр дістають з пакету та відмивають від надлишку зонду в розчині ( № 24) 3 рази в об'ємі 300 мл при кімнатній температурі. Фільтр підсушують на повітрі за захисним екраном і загортають в плівку типу Saran. В темноті закладають фільтр поміж двох листів рентгенівської плівки РМ-В у медичну рентгенівську касету з посилюючими екранами. Експонують плівку в залежності від активності зонду 2-20 діб. Проявляють одну плівку і в разі необхідності подовжують експозицію з другою плівкою. В результаті отримують радіоавтограф - геномний дактиловідбиток.

### **3.2. Аналіз геномних дактиловідбитків.**

#### **3.2.1. Встановлення батьківства.**

Для вирішення питання про спірне батьківство необхідно провести порівняльний аналіз зразків крові осіб, що проходять по справі. Зразки рестриційованої ДНК дитини наносять на гель між зразками матері та відповідача для полегшення аналізу. Обов'язковий негативний контроль - ДНК випадкової людини, розщепленої при тих же умовах, що і дослідні зразки.

Оскільки маркерні смуги наслідуються за кодомінантним принципом, усі маркерні смуги дитини повинні наслідуватись або від матері або від батька приблизно в пропорції 1:1.

Батьківство виключають, якщо у дитини виявлені дві чи більше маркерні смуги, що не просліджуються а ні у матері , а ні у відповідача. Одна така смуга може бути проявом мутаційних змін у ГДГ.

Позитивне встановлення батьківства констатують, Якщо у дитини не виявлено зайвих смуг, тобто всі маркерні смуги дитини походять від матері або відповідача приблизно в пропорції 1:1. Імовірність випадкового збігу геномних профілів підраховують за формулою  $P_{\text{вип}} = v^d \times 100\%$ , де  $v$  - частота співпадання двох маркерних смуг у даній популяції, а  $d$ - кількість маркерних смуг у дитини, що мають батьківське походження і не виявляються у матері. Величина  $u$  залежить від зонду, ферменту та популяції, що вивчається. Звичайно використовують пари зонд-фермент, за яких дана величина лежить в межах 0,2- 0,35. Тоді при наявності 6 смуг, що співпадають у відповідача та дитини і не виявляються у матері, і  $v = 0,3$  імовірність випадкового збігу складає 0,07%. Для підвищення достовірності використовують два або кілька зондів, що виявляють різні ГДГ. Це можливо при почерговій гібридизації одного фільтра з кількома зондами. Аналогічно

проводять аналіз зразків при розгляді справ про викрадення, підміну дітей, встановлення родинних зв'язків, абортів після згвалтувань тощо.

### **3.2.2. Ідентифікація особистості.**

Основним лімітуючим фактором використання стандартної процедури геномної дактилоскопії є кількість і якість біологічного матеріалу. Для проведення геномної дактилоскопії необхідно 5-10 мкг нативної ДНК. Тому більш перспективним є ПЛР-аналіз (аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції) залишків крові та сперми. Але, якщо кількість і якість матеріалу відповідає умовам, що наведені вище, можлива ідентифікація особистості. Для дослідження проводять виділення ДНК з крові у об'єкта чи об'єктів, що вивчаються, та порівнюють з ДНК виділеної з залишків крові або інших біологічних тканин. Позитивна ідентифікація констатується, якщо всі маркерні смуги об'єкта абсолютно ідентичні смугам дослідного зразка.

Висновок про виключення походження зразка від даного об'єкта робиться, якщо виявлені не співпадаючі або додаткові маркерні смуги. Імовірність випадкового збігу маркерних смуг підраховується аналогічно.

### **3.2.3. Приблизний текст висновку експерта при дослідженні зразків крові методом геномної дактилоскопії.**

Кров досліджували методом геномної дактилоскопії. Для виділення ДНК до зразків крові об'ємом 5 мл додавали один об'єм води. Після гомогенізації клітини висаджували центрифугуванням. До осаду клітин додавали 10 мл буфера А (320 мМ сахароза, 5 мМ  $MgCl_2$ , 1% Triton X100, 10 мМ трис-НСІ рН 7,6). Після гомогенізації осаджували ядра центрифугуванням. Отримані ядра інкубували протягом ночі з ДСН (додецил сульфатом натрію) і протеїназою К. Білки висаджували, додаючи NaCl до кінцевої концентрації 1,5 М. До супернатанту додавали 2,5 об'єми етилового спирту та намотували ДНК на паличку, підсушували та розчиняли в ТЕ буфері (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА рН 8,0). Зразки ДНК рестриціювали ферментом BspR1 протягом 4-х годин при 37°C та піддавали електрофорезу в 0,9% агарозі (36 годин). Після чого проводили електроперенос на капронові мембрани. ДНК на мембранах фіксувалася прогрівом у вакуумі при 80°C. Фільтри гібридували з радіоактивноміченим зондом на основі ДНК фагу M13. Прегібридизацію та гібридизацію проводили протягом 24 і 48 годин відповідно, в р-ні для гібридизації (7% ДСН, 0,263 М  $NaH_2PO_4$ , 1 мМ EDTA, 1% БСА). Відмивання фільтрів проходило при кімнатній температурі в р-ні 2xSSC - 0,1% ДСН. Висушені фільтри

експонувалися з рентгенівською плівкою 3- днів при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Результати аналізу:

згідно з наведеною методикою були проаналізовані зразки крові. В.(відповідач), М.(мати), Д.(дитина). В проаналізованому регіоні (3-20 т.п.н.) виявлено: у матері 12 маркерних смуг, у дитини 15 маркерних смуг, у відповідача 12 маркерних смуг.

Кількість співпадаючих маркерних смуг:

у матері і дитини, і не виявляються у відповідача -5;

у відповідача і дитини, і не виявляються у матері - 6 (d).

У дитини не виявлено маркерних смуг, що не просліджуються у матері або відповідача.

Імовірність батьківства відповідача розраховувалася за формулою  $P=(1-v^d)\times 100\% = (1 - 0,22^6)\times 100\% = 99,99\%$ .  $v$ - середня частота випадкового співпадання 2-х маркерних смуг.

В підсумках указується, що дослідженням крові методом геномної дактилоскопії встановлено співпадаючих смуг : у матері і дитини, і не виявляються у відповідача -5; у відповідача і дитини, і не виявляються у матері - 6. У дитини не виявлено маркерних смуг, що не просліджується у матері або відповідача.

Таким чином, результати дослідження дозволяють стверджувати, що відповідач є біологічним батьком дитини з імовірністю 99,99%.

Використання методу дозволяє проводити позитивну ідентифікацію особистості за залишками крові, сперми чи інших біологічних тканин при вирішенні справ про спірне батьківство, викрадення та підміну дітей, пологів та абортів після згвалтувань тощо.

#### 4. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.

1. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA // Nature. 1985, V.314, P.67-73.
2. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. Individual -specific 'fingerprints' of human DNA //Nature. 1985, V.316, P.76-80
3. Jeffreys A.J., Brookfield J.F.Y., Semenov R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints //Nature. 1985, V. 317, P.818-819.
4. Анализ генома. Методы. / Под ред. К. Дейвиса/- М.: Мир,1990.- 246 с., ил.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984.
6. Стегнова Т.В., Рогаев Е.И., Иоанесян Л.С., Сыроковашева Е.Ю., Пименов М.Г. Исследование крови человека методом генотипоскопии. ( ДНК -дактилоскопия): Методические рекомендации. - М.: ВНКЦ МВД СССР, 1991. -24 с.
7. Vassart G., Georges M., Monsieurr R., at all. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA //Science. 1987, V. 235, P.683-684.