

РЭСПУБЛІКА БЕЛАРУСЬ



ПАТЭНТ

НА ВЫНАХОДСТВА

№ 11054

Метод выделения ДНК, пригодной для проведения ПЦР, из
загрязненного биологического следа

выдадзены

Нацыянальным цэнтрам інтэлектуальнай уласнасці
ў адпаведнасці з Законам Рэспублікі Беларусь
«Аб патэнтах на вынаходствы, карысныя мадэлі, прамысловыя ўзоры»

Патэнтаўладальнік (патэнтаўладальнікі):

Государственное учреждение "Научно-исследовательский институт криминалистики и судебной экспертизы Министерства юстиции Республики Беларусь"; Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

Аўтар (аўтары):

Цыбовский Иосиф Станиславович; Кузуб Николай Николаевич;
Веремейчик Вера Михайловна; Картель Николай Александрович
(ВУ)

Заяўка № а 20050853

Дата падачы: 2005.08.31

Зарэгістравана ў Дзяржаўным рэестры
вынаходстваў:

2008.06.06

Дата пачатку дзеяння:

2005.08.31

Генеральны дырэктар

Л.І. Варанецкі



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 11054

(13) С1

(46) 2008.08.30

(51) МПК (2006)

G 01N 33/48

A 61B 5/00

(54) МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК, ПРИГОДНОЙ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР, ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО СЛЕДА

(21) Номер заявки: а 20050853

(22) 2005.08.31

(43) 2007.06.30

(71) Заявители: Государственное учреждение "Научно-исследовательский институт криминалистики и судебной экспертизы Министерства юстиции Республики Беларусь"; Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(72) Авторы: Цыбовский Иосиф Станиславович; Кузуб Николай Николаевич; Веремейчик Вера Михайловна; Картель Николай Александрович (ВУ)

(73) Патентообладатели: Государственное учреждение "Научно-исследовательский институт криминалистики и судебной экспертизы Министерства юстиции Республики Беларусь"; Государственное научное учреждение "Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси" (ВУ)

(56) RU 2001135838 А, 2004.

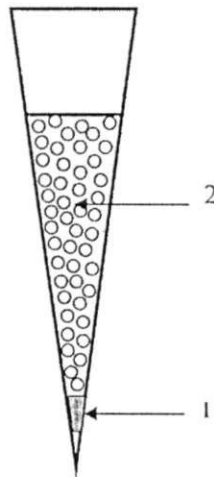
ЕА 000785 В1, 2000.

RU 2205010 С2, 2003.

RU 2208638 С2, 2003.

(57)

Метод выделения ДНК, пригодной для проведения ПЦР, из загрязненного биологического следа, отличающийся тем, что ДНК высвобождают из биологического следа, подвергают первичной очистке, концентрируют путем адсорбционно-распределительной хроматографии на кальций-тарtratном геле и очищают путем гель-проникающей хроматографии на микроколонке с TSK-гелем "Тоуорpearl HW-65F" или "Тоуорpearl HW-60F".



Фиг. 1

Изобретение относится к биохимии, а именно к способам выделения, получения и очистки ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) или РНК (рибонуклеиновая кислота): к созданию универсальных методик и легкодоступных средств удаления контаминаций любого рода при выделении ДНК из загрязненных биологических следов и микроследов на вещественных доказательствах при криминалистической идентификации личности методами ДНК-анализа. Изобретение направлено на одновременное концентрирование ДНК и удаление различных примесей и загрязнений, ингибирующих или модифицирующих процесс полимеразной цепной реакции: биополимеров и продуктов их деградации; водорастворимых химических соединений; сорбирующихся на ДНК гидрофобных дериватов биологических структур; а также мелких фрагментов ДНК, образующихся при ее разрушении и обладающих праймероподобными свойствами.

Состояние проблемы

Большинство биологических следов, являющихся объектами криминалистической идентификации, имеются в минимальных количествах, загрязнены примесями различного рода, а также могут быть подвержены гнилостным изменениям. В большинстве случаев в процессе выделения возникает необходимость в концентрировании ДНК, при этом происходит параллельная экстракция целого спектра различных соединений биологического и не биологического происхождения, а также продуктов распада биологических структур. В результате полимеразная цепная реакция (ПЦР) с такими ДНК не протекает или же видоизменяется до получения не интерпретируемой картины амплифицированных фрагментов ДНК.

В зависимости от физико-химических характеристик можно выделить 4 группы загрязнений, содержащихся в образце ДНК. Группа 1 - другие биополимеры клетки (белки и гликозилированные белки, полисахариды и модифицированные мукополисахариды, РНК), а также продукты их распада. Группа 2 - примеси из предмета-носителя пятна (водорастворимые химические красители с одежды, бытовые и почвенные наслоения, горючесмазочные материалы и др.). Группа 3 - трудно растворимые дериваты, являющиеся компонентами клеток или образующиеся при разложении биоструктур (меланины, воскоподобные структуры, гематопорфирины, хлоропорфирины, гуминовые кислоты и т.п.). Группа 4 - продукты распада самой ДНК (короткие однонитевые и двунитевые фрагменты ДНК).

Как правило, наличие в образце ДНК других биополимеров, химических красителей, гематопорфиринов вызывает ингибирование ПЦР. Присутствие короткоцепочечных праймероподобных фрагментов ДНК модифицирует протекание ПЦР, что обуславливает получение не интерпретируемого результата анализа. В обоих случаях генотип образца ДНК не может быть установлен, образец не идентифицирован.

Известны различные методы выделения и очистки ДНК для последующего проведения ПЦР.

Одним из наиболее распространенных является метод, основанный на использовании метал-хелатных сорбентов [1]. Широкому распространению данного метода способствует простая схема экстракции ДНК путем кипячения биологических образцов в присутствии анионного сорбента с повышенной избирательностью сорбции двухвалентных катионов (типа выпускаемого фирмой "BioRad" сорбента "Chelex.100"). В данном методе очистка и концентрирование ДНК не происходит. Метод малоэффективен при исследовании сильно загрязненных образцов и при низких концентрациях ДНК.

Другим известным подходом является использование специальных устройств со встроеной ультрафильтрационной мембраной с заданным размером пор (так называемых центрифужных концентраторов), выпускаемых под торговыми марками "Centri-con", "Mikrocon" и др.) [2]. В процессе центрифугирования ДНК концентрируется с одновременным удалением водорастворимых примесей и продуктов распада ДНК определенного размера. Однако сорбированные на полимерной матрице ДНК более крупные примеси и

гидрофобные дериваты типа меланинов или гематопорфиринов данным методом полностью не удаляются.

Имеется ряд предложений, включающих в качестве материала, сорбирующего ДНК, кремний или его производные (окись кремния): стеклянные частицы, такие как стеклянная пудра или коммерческий хроматографический силикагель; стеклянные микроволокна в сочетании с фильтровальной бумагой; диатомовую землю. Данный подход ориентирован на лизис биологического материала с использованием хаотропных агентов и трудноприменим к высохшим и загрязненным объектам криминалистического исследования. Отделение стеклянных частиц от лизисного раствора производится центрифугированием или с применением специальных фильтровальных устройств. При этом зачастую данные методы не обеспечивают оптимальных уровней экстракции ДНК из лизисных смесей. Сорбция ДНК на стеклянных частицах зачастую очень сильная, в результате чего существует риск утраты значительной части ДНК при ее ресорбции с поверхности частиц.

Предложен вариант магнито-чувствительных стеклянных частиц с контролируемым размером пор, однако ДНК с поверхности таких частиц трудно извлечь [3, 4]. Вторым вариантом представляет собой стеклянные частицы, покрытые агарозой с включениями ферромагнитных частиц. Третий тип частиц предполагает включение магнитного материала в матрикс из полимера двуокиси кремния. Отмечено, что два последних типа частиц проявляют тенденцию к выщелачиванию железа в условиях, оптимальных для сорбции ДНК. Наличие железа осложняет дальнейшую работу с образцом ДНК. Кроме того, при изготовлении таких частиц трудно обеспечить оптимальную емкость сорбции и другие параметры частиц.

Наиболее близким к заявляемому (прототип) является метод выделения биологических матриц с использованием кремниево-магнитных частиц, которые представляют собой ферромагнитный материал, включенный в силикагелевый матрикс [5]. Данные частицы способны адсорбировать не менее 2 мкг ДНК на 1 мг частиц, при этом не менее 60 % ДНК в дальнейшем можно элюировать с поверхности частиц. Частицы должны быть оптимизированы по форме, размеру, размеру пор и т.п. Таким образом, процесс изготовления этих частиц представляет собой достаточно сложную процедуру. Недостатком данного метода является и невысокая избирательность частиц по отношению к ДНК: материал, адсорбированный на таких частицах, представляет собой ДНК только "преимущественно". Таким образом, метод не гарантирует полного удаления других биополимеров (белки, РНК), мелких фрагментов ДНК или веществ, образовавших комплекс с молекулой ДНК.

Задачей настоящего исследования является создание универсального метода выделения высокоочищенной ДНК из любых биологических следов на вещественных доказательствах для целей криминалистической идентификации, обеспечивающего одновременно концентрирование ДНК и удаление всех типов загрязнений. Многие из биологических следов сильно загрязнены, в значительной степени деградированы в результате микробиологического или другого воздействия. Часть из них (потожировые выделения, замытые следы) требует значительного концентрирования ДНК.

Поставленная задача решается заявляемым методом, включающим сочетание адсорбционно-распределительной хроматографии на кальций-тартратном геле (на микроколонках или в объеме) с гель-проникающей хроматографией на микроколонках с крупнопористым синтетическим полимерным сорбентом, в качестве которого используется гель "TSK-gel Toyopearl HW-65F" или "TSK-gel Toyopearl HW-60F" (TSK-гель).

Отличие заявляемого способа от прототипа состоит в том, что концентрирование и очистка ДНК осуществляется сочетанием адсорбционной хроматографии на кальций-тартратном геле и гель-проникающей хроматографии на микроколонках с TSK-гелем, что обеспечивает полное удаление всех типов загрязнений: водорастворимых веществ, загрязнений, адсорбированных на молекуле ДНК, и низкомолекулярных праймероподобных фрагментов ДНК.

Сущность метода заключается в следующем.

ДНК из любого биологического объекта высвобождают путем общепринятых процедур лизиса и подвергают стандартной фенол/хлороформной процедуре первичной очистки.

ДНК из фенольного экстракта концентрируют с использованием кальций-тарtratного геля (КТГ).

Стадия 1. Адсорбционно-распределительная хроматография на микроколонках с кальций-тарtratным гелем.

Вариант 1. Изготавливают микроколонку из наконечника для автоматической пипетки на 300 мкл путем помещения в носик наконечника микропробки из ваты. Общий вид микроколонки приведен на фиг. 1. (1 - микропробка из ваты; 2 - активный компонент колонки: КТГ или TSK-гель).

Микроколонку отжигают в УФ-свете, затем в нее аккуратно добавляют 120 мкл воды, в которую помещают взвесь КТГ до образования столбика, эквивалентного 100 мкл. На колонку дробно наносят фенольный экстракт (обычно 0,5-1,5 мл). При выделении ДНК из потожировых выделений или других сильно разбавленных жидкостей наносимый объем увеличивают до необходимого. После того, как весь нанесенный объем фенольного экстракта протек, на КТГ добавляют 200 мкл 0,1М фосфатного буфера pH 7,4 (раствор 1). После протекания раствора 1 через колонку на поверхность КТГ-колонки наносят 55 мкл 0,25М фосфатного буфера pH 7,4 (раствор 2). Затем колонку помещают в чистую пробирку-эппендорф и наносят 35-40 мкл раствора 2. Вытекающий из колонки раствор собирают в пробирку.

Вариант 2. Адсорбционно-распределительная хроматография с кальций-тарtratным гелем в объеме.

Для каждого образца фенольного экстракта берут чистую пробирку "эппендорф", в которую вносят 70 мкл 50 % суспензии КТГ. Фенольный экстракт переносят в пробирку с сорбентом и смесь интенсивно перемешивают на микровстряхивателе на протяжении 10-15 сек. Закрытые пробирки помещают в вертикальном положении на платформу устройства для вибрационного перемешивания (шейкера) или кладут на чистую поверхность в горизонтальном положении (что обеспечивает максимальную площадь соприкосновения сорбента с жидкостью) и периодически их встряхивают на протяжении 15-20 мин. Смесь центрифугируют при 2000-5000 g 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют (декантированием или отсасыванием) и отбрасывают.

К осадку сорбента приливают 400 мкл раствора 1. Смесь интенсивно встряхивают и центрифугируют при 2000-5000 g 5 мин. Надосадочную жидкость удаляют и отбрасывают.

К осадку сорбента приливают 50 мкл раствора 2. Смесь интенсивно встряхивают, выдерживают при комнатной температуре 10-15 мин и центрифугируют при 2000-5000 g 5 мин.

Полученный образец представляет собой концентрат ДНК в 0,25М фосфатном буфере pH 7,4, который может содержать сопутствующие примеси - адсорбированные на молекуле ДНК вещества полифенольной природы (меланины и т.п.), гидрофобные фрагменты распада гемоглобина (гематопорфирины и др.), часть химических красителей с ткани, короткоцепочечные фрагменты самой молекулы ДНК.

Применение кальций-тарtratного геля для выделения белков и нуклеиновых кислот описано в [6]. Кальций-тарtratный гель представляет собой сферические частицы из комплексной соли и может быть легко получен в лаборатории путем смешивания раствора K-Na-виннокислого с раствором CaCl₂ (10-65 °C) с последующей обработкой раствором KH₂PO₄ при pH 8,5-9,0 и температуре 80-100 °C. Кальций-тарtratный гель эффективно сорбирует отрицательно-заряженные биополимеры, однако сорбированные белки, РНК и одонитевые ДНК легко удаляются при более низких концентрациях фосфат-ионов (раствор 1), чем двунитевые молекулы ДНК. Незаряженные полисахариды не взаимодействуют с кальций-тарtratным гелем и удаляются в процессе нанесения ДНК на колонку. ДНК

тидов (п.н.), а марки "Тоуорpearl HW-60F" - 7 п.н. (фиг. 2). Для сравнения, структура специфических праймеров образована из 25-30 нуклеотидов.

Таким образом, предложенное сочетание хроматографии на кальций-тарtratном геле с гель-проникающей хроматографией на микроколонках с TSK-гелем обеспечивает унификацию качественных параметров всех выделяемых образцов ДНК независимо от исходного состояния объекта, из которого выделяется ДНК. Предлагаемая процедура универсально эффективна при работе со всеми типами биологических следов на вещественных доказательствах. При этом обеспечивается достижение нового качественного параметра - удаление низкомолекулярных праймероподобных фрагментов ДНК, что расширяет экспертные возможности при работе с деградированными объектами. Качественные изменения в образце ДНК до гель-фильтрации на TSK-геле и после нее видны из сравнения дорожек ("1" - стадия 1; "2" - стадия 2) на фиг. 2.

Источники информации:

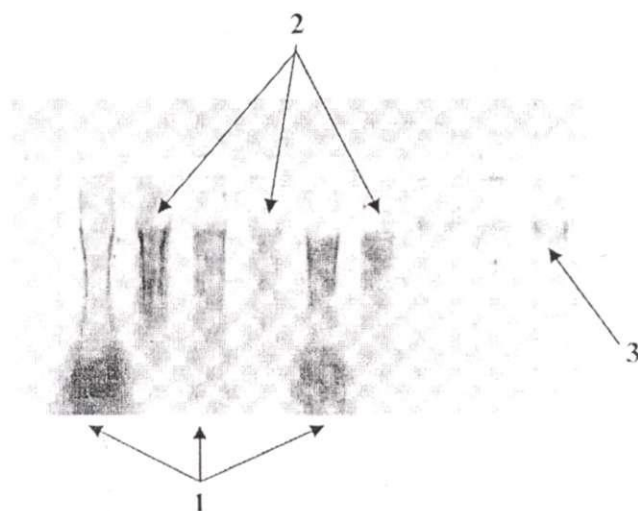
1. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // BioTechniques. - 1991. - Vol. 10. - № 4. - P. 506-513.

2. Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis // J. Forensic Sci. - 1994. - Vol. 39. - P. 1254-1269.

3. Патент США 4 395 271.

4. Патент США 4 233 169.

5. Патент США 6 027 945 (прототип).



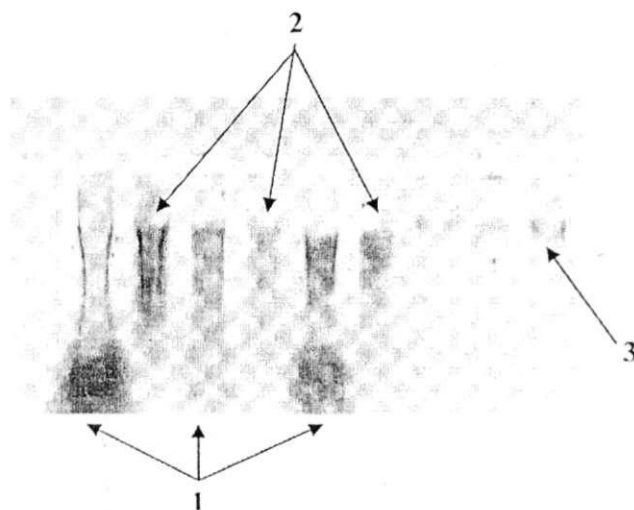
Фиг. 2

тидов (п.п.), а марки "Тоуорpearl HW-60F" - 7 п.п. (фиг. 2). Для сравнения, структура специфических праймеров образована из 25-30 нуклеотидов.

Таким образом, предложенное сочетание хроматографии на кальций-тартратном геле с гель-проникающей хроматографией на микроколонках с TSK-гелем обеспечивает унификацию качественных параметров всех выделяемых образцов ДНК независимо от исходного состояния объекта, из которого выделяется ДНК. Предлагаемая процедура универсально эффективна при работе со всеми типами биологических следов на вещественных доказательствах. При этом обеспечивается достижение нового качественного параметра - удаление низкомолекулярных праймероподобных фрагментов ДНК, что расширяет экспертные возможности при работе с деградированными объектами. Качественные изменения в образце ДНК до гель-фильтрации на TSK-геле и после нее видны из сравнения дорожек ("1" - стадия 1; "2" - стадия 2) на фиг. 2.

Источники информации:

1. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material // *BioTechniques*. - 1991. - Vol. 10. - № 4. - P. 506-513.
2. Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis // *J. Forensic Sci.* - 1994. - Vol. 39. - P. 1254-1269.
3. Патент США 4 395 271.
4. Патент США 4 233 169.
5. Патент США 6 027 945 (прототип).



Фиг. 2