

**Рецензент:**

**Носиков В.В.** – заведующий лабораторией молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии Государственного научного центра РФ «ГосНИИ генетика», доктор биологических наук, профессор.

**Корниенко И.В., Харламов С.Г.**

**К 67** Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК и ее количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения: Учебно-методическое пособие.- Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета, 2012. - 216 с., 37 ил., 15 табл., библиогр.  
ISBN 978-5-9275-1022-1

В учебно-методическом пособии подробно описаны методы выделения ДНК из различных биологических объектов. Рассмотрены методики качественной и количественной оценки препаратов ДНК.

Учебно-методическое пособие предназначено для судебно-медицинских экспертов и экспертов-биологов, а также других специалистов, занимающихся исследованием ДНК.

ISBN 978-5-9275-1022-1

УДК 343.9  
ББК 28.04

© Корниенко И.В., Харламов С.Г., 2012  
© Южный федеральный университет, 2012

**СОДЕРЖАНИЕ**

Введение .....	7
Источники ДНК .....	8
Структура и химические свойства ДНК .....	11
Организация сбора, транспортировки и хранения биологических образцов для ДНК-типирования .....	15
Основные этапы процедуры ДНК-типирования .....	16
Сбор образцов биологических тканей .....	17
Организация работы по сбору биологических образцов .....	18
Меры по предотвращению контаминации при отборе биологических образцов .....	20
Обеспечение качества и аутентичности биологических образцов .....	21
Требования, предъявляемые к образцам .....	21
Транспортировка биологического материала .....	23
График режимов перевозки замороженных образцов .....	24
Хранение биологических образцов в депозитарии .....	24
Организация приемки биологических проб .....	28
Организация хранения поступивших в депозитарий биологических образцов .....	29
Помещение для хранения образцов крови .....	32
Хранение образцов выделенной ДНК .....	32
Компьютерное обеспечение учета биологического материала .....	34
Выделение нуклеиновых кислот .....	35
Виды контаминаций препаратов ДНК .....	45
Методы экстракции ДНК .....	51
1. Подготовка рабочего места и инструментария .....	51
2. Выделение ДНК из крови и ее следов .....	52
2.1. Выделение ДНК из крови и ее пятен с помощью ионообменной смолы Chelex 100.....	58
2.2. Выделение ДНК из жидкой крови и ее пятен методом	

экстракции органическими реагентами .....	61
2.3. Выделение ДНК из жидкой крови методом нуклеосорбции.....	66
2.4. Сбор и хранение крови на ФТА-носителях. Выделение ДНК, иммобилизовано на ФТА-носителях .....	68
3. Выделение ДНК из пятен спермы, слюны и мочи.....	74
3.1. Выделение ДНК из смешанных пятен спермы и влагалищного секрета с использованием метода органической экстракции и дифференциального лизиса1 .....	74
3.2. Выделение ДНК из смешанных пятен спермы и влагалищного секрета с использованием метода органической экстракции и дифференциального лизиса2 .....	77
3.3. Выделение ДНК из смешанных пятен спермы и влагалищного секрета пятен спермы с помощью ионообменной смолы Chelex 100 .....	79
3.4. Выделение ДНК из следов слюны на клапане конверта методом органической экстракции .....	81
3.5. Выделение ДНК из следов слюны на клапане конверта с помощью ионообменной смолы Chelex 100 .....	83
3.6. Выделение ДНК из следов слюны на окурках сигарет методом органической экстракции .....	84
3.7. Выделение ДНК следов слюны на окурке с помощью ионообменной смолы Chelex 100 .....	85
3.8. Выделение ДНК из следов слюны на ткани с помощью ионообменной смолы Chelex 100 .....	87
3.9. Выделение ДНК из следов слюны на жевательной резинке методом органической экстракции .....	88
3.10. Выделение ДНК из мочи методом органической экстракции .....	90
4. Особенности выделения ДНК из костной ткани .....	92
4.1. Выделение ДНК из костной ткани методом органической экстракции .....	98

4.2. Выделение ДНК из декальцинированной костной ткани методом органической экстракции .....	102
4.3. Выделение ДНК из тканей зуба методом органической экстракции .....	104
5. Экстракция ДНК из ногтевых пластинок и волос .....	106
5.1. Выделение ДНК из ногтевой пластинки методом органической экстракции .....	109
5.2. Выделение ДНК из волоса методом органической экстракции .....	111
5.3. Выделение ДНК из волоса с помощью ионообменной смолы Chelex 100 и протеиназы К .....	113
6. Методы выделения ДНК из фрагментов хряща, сухожилий и мягких тканей .....	114
6.1. Выделение ДНК из фрагментов сухожилий, хряща и мягких тканей методом экстракции органическими реагентами .....	114
6.2. Выделение ДНК из мягких тканей с помощью ионообменной смолы Chelex 100 .....	116
6.3. Выделение ДНК из мягких тканей с помощью ионообменной смолы Chelex 100 и протеиназы К .....	117
7. Выделение ДНК из фиксированных тканей .....	118
7.1. Преэкстракционная обработка образцов .....	123
7.2. Выделение ДНК из фрагментов тканей, фиксированных в парафине .....	124
7.3. Выделение ДНК из фиксированных тканей без предварительной обработки органическими растворителями ..	125
7.4. Выделение ДНК из фиксированных тканей без предварительной депарафинизации .....	126
8. Выделение ДНК из древних костей .....	128
8.1. Особенности работы с древней ДНК и проблемными биологическими объектами .....	132
8.2. Выделение ДНК из древних костей методом органической экстракции .....	148

8.3. Выделение ДНК из древних костей с помощью этанольной преципитации в присутствии голубого декстрана .....	155
9. Экстракция ДНК из различных биологических источников с помощью коммерческих тест-систем .....	158
9.1. Выделение ДНК из пятен крови и тампонов с защечным эпителием при помощи набора реагентов DNA IQ™ (Promega) .....	158
10. Концентрирование и очистка экстрактов ДНК при помощи колонок-концентраторов .....	161
10.1. Концентрирование и очистка экстрактов ДНК при помощи устройства «Amicon Ultra-4» .....	161
10.2. Концентрирование и очистка экстрактов ДНК при помощи устройства «Amicon Ultra-0.5» .....	163
11. Качественная и количественная оценка выделенной ДНК .....	164
11.1. Спектрофотометрический анализ растворов нуклеиновых кислот .....	165
11.2. Оценка качества препаратов ДНК при помощи электрофореза в агарозном геле .....	169
11.3. Фотодокументирование результатов электрофореза в агарозном геле .....	175
11.4. Оценка качества и количества препаратов ДНК при помощи полимеразной цепной реакции «в реальном времени» .....	177
Приложение 1. Факторы, вызывающие деградацию нуклеиновых кислот .....	185
Условия хранения препаратов нуклеиновых кислот .....	186
Приложение 2. Минимально необходимое оборудование для экстракции ДНК .....	187
Приложение 3. Реагенты для экстракции ДНК .....	188
Приложение 4. Растворы для экстракции и анализа выделенной ДНК .....	189
Список литературы .....	200

## ВВЕДЕНИЕ

Высокая чувствительность ПЦР-анализа выдвигает жесткие требования к правилам выделения ДНК из биологического материала, поэтому большое внимание следует уделять методам экстракции и очистки ДНК. Необходимо индивидуально подбирать соответствующий метод выделения в зависимости от вида объекта, его состояния и вида ткани. Для использования ДНК в идентификационных целях необходимо, прежде всего, получить ее в чистом виде.

В эукариотических клетках ядерная ДНК ассоциирована с положительно заряженными белками – гистонами, образуя стабильный хроматин. Однако ДНК в виде хроматина при обычных манипуляциях ее очистки легко разрушается с образованием более мелких фрагментов. Это связано с тем, что длина одной молекулы ДНК из диплоидной клетки во много раз превышает ее поперечный диаметр. Таким образом, простое перемешивание или даже неосторожное взятие пипеткой раствора ДНК приводит к существенному уменьшению ее молекулярной массы. Кроме того, ДНК может быть подвержена деградации нуклеазами, находящимися преимущественно в лизосомах и переходящими в активное состояние при гомогенизации тканей. Нуклеиновые кислоты чувствительны к расщеплению ферментами (нуклеазы, например, могут быть обнаружены даже на кончиках пальцев исследователя), они не терпят экстремальных значений pH и температуры. Из этого следует, что применение одних и тех же методов экстракции ДНК без учета специфики биологического материала не позволяет получать препараты ДНК, отвечающие всем условиям качественной экспертизы.

В качестве объектов ДНК-идентификации могут выступать практически любые биологические ткани и жидкости, в которых содержание ДНК может сильно варьировать.

В настоящем учебно-методическом пособии рассмотрены наиболее распространенные в судебно-медицинской практике