

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.1:577.1

© Коллектив авторов.

ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ ДНК ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБЪЕКТОВ И ОПТИМИЗАЦИЯ АМПЛИФИКАЦИИ

В.И. Федченко, С.О. Гурьев, А.А. Калошин.

Государственное учреждение Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН.
119121, Москва, ул. Погодинская, дом.10,
факс: 245 08 57; эл. почта: fedval@ibmh.msk.su.

Предложен способ выделения и очистки ДНК из сильнозагрязненных предметоносителей. Он включает: 1) стандартную обработку биоматериала протеиназой К с последующей фенол-хлороформной экстракцией; 2) освобождение от катионов на смоле лауэкс-50W и низкомолекулярных примесей гель фильтрацией на сефадексе G-50. Синтезированы модифицированные олигонуклеотидные праймеры и оптимизированы условия амплификации для двух variable number of tandem repeats (VNTR) локусов аполипопротеин В (ароВ) и D17S5, широко применяющихся при ДНК-типировании человека с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Повышение стабильности и специфичности амплификации VNTR локусов ароВ и D17S5 достигнуто благодаря оптимизации длины и состава праймеров и изменения режима амплификации. Чувствительность предложенного способа амплификации составляет 2-4 нг ДНК-матрицы. Использование условий "гнездовой" амплификации для локуса ароВ позволило добиться повышения чувствительности метода до нескольких копий ДНК мишени.

Ключевые слова: очистка ДНК, VNTR локусы, ароВ, D17S5, полимеразная цепная реакция, праймеры, маркеры молекулярного веса.

ВВЕДЕНИЕ. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) стал в последние годы ключевой технологией не только в фундаментальных разделах молекулярной биологии и генетики, но и в медико-биологических лабораториях, работающих в области судебной медицины и криминалистики. В судебно-медицинской и криминалистической практике при идентификационных экспертизах одной из важнейших задач является выделение ДНК из предмета-носителя. От качества ДНК-матрицы в значительно большей степени, чем от ее количества, зависит успех в проведении ПЦР и, как следствие, возможность однозначного ответа при идентификационных экспертизах. К настоящему времени разработано много методов выделения ДНК из различных источников [1-9]. Наиболее широкое применение в судебной медицине и криминалистике получил метод, основанный на обработке образца протеиназой К в додецилсульфате натрия (ДСН) с

ОЧИСТКА ДНК ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБЪЕКТОВ

последующей фенол-хлороформной экстракцией и осаждением ДНК этанолом. Этот метод надежен только в случае использования образцов цельной крови [1-3], а также свежих пятен крови или спермы на хлопковых тканях [4, 5, 7]. Однако, такие предметы-носители довольно редки в экспертной практике. Чаще всего эксперты имеют дело с сильнозагрязненными и деградированными препаратами ДНК. В последнее время многие фирмы начали выпускать наборы реактивов (киты) для тонкой очистки ДНК. Эффективность работы таких наборов анализируется в обзорной статье [7]. При выборе метода выделения и очистки ДНК необходимо учитывать характер предмета-носителя и его возраст. Описано несколько методик для выделения ДНК из костей [8], пятен крови на различных тканях [4], и малых количеств биологических тканей [5 - 7]. Оригинальный метод выделения ДНК, полностью исключаящий применение органических растворителей и протеиназную обработку предложен Lahiri с соавторами [9].

В данной работе предложена простая методика выделения ДНК из проблемных объектов, дающая надежный результат при ПЦР. Она особенно эффективна в случае наиболее часто встречающихся в судебной медицине и криминалистике объектов: джинсовые ткани, разложившийся биологический материал и т.д. Повышение эффективности наиболее часто используемых при генотипировании человека VNTR-локусах - аroV и D17S5 было достигнуто за счет оптимизации размера и последовательности олигонуклеотидных праймеров этих локусов, а также режимов амплификации. Использование локуса аroV для двухстадийной ПЦР с внутренними и внешними праймерами, так называемый "гнездовой" метод амплификации, позволило увеличить чувствительность метода до нескольких копий ДНК-мишени [10, 11].

МЕТОДИКА. Материалы и реактивы. В работе были использованы дезоксирибонуклеозидтрифосфаты производства Филиала ИБХ РАН (г. Пушкино), Smart-Taq-полимераза - "Биомастер" (Москва). Другие реактивы (соли, смолы и др.) - зарубежного производства ("Serva" и "Boehringer" Mannheim (Германия), "Sigma" (США)).

Выделение ДНК. В работе использовали препараты ДНК человека, выделенные из цельной крови, а также образцы ДНК, выделенные из загрязненных биологических объектов, главным образом, пятен крови на различных видах хлопковых (джинсовой) и синтетических тканей. ДНК выделяли по методу, описанному в работе [1-3] с модификацией. Экстракцию из пятен крови проводили по методу Combe с соавт. [7].

Первый этап выделения ДНК: 25 мкл цельной крови или пятно крови от ткани размером 1х1 см суспендировали в 400 мкл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, 2% ДСН, 0,2 мг протеиназы К и инкубировали при 65°C в течении 3 часов (все реактивы - фирмы "Sigma"). В случае пятна крови на тканых материалах, освобождались методом центрифугирования, пропуская образец через наконечник на 200 мкл. Ткань задерживалась в наконечнике, а образец ДНК собирали в 1,5 мл центрифужную пробирку. Далее все операции проводили, так же как и с цельной кровью: 450 мкл перегнанного фенола, уравновешенного 0,1 мМ трис-НСl, pH 8,0 добавляли к каждой пробе и хорошо перемешивали в течение 1 минуты и центрифугировали на микроцентрифуге 5 мин при 1200 g. Водную фазу отбирали и проводили экстракцию смесью хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). К полученной водной фазе добавляли 0,1 объем 3 М ацетата натрия, pH 5,6 и 0,6 объема изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре в течение 10 мин. ДНК осаждали центрифугированием на микроцентрифуге при 1200 g в течение 10 мин. Осадок промывали охлажденным 75% этанолом, подсушивали на воздухе и растворяли в 30-50 мкл деионизованной воды.

Второй этап выделения ДНК: Дальнейшую очистку ДНК, полученных из сильнозагрязненных объектов, проводили на микроколонках с дауэкс-50W и сефадекс G-50. Колонкой служила амплификационная пробирка на 0,5 мл, с

игольчатым отверстием в дне. Дно пробирки закрывали кусочком фильтра GF/A ("Whatman", Англия) и наслаивали 300 мкл сефадекса G-50 и 50 мкл дауэкс-50W, предварительно уравновешенного буфером. 10 mM трис-HCl pH 8,0 и 1 mM ЭДТА, который удаляли центрифугированием на микроцентрифуге при 4000 g в течение 5 мин. На колонку наслаивали 30-50 мкл раствора ДНК и центрифугировали в пробирку (типа Eppendorf на 1,5 мл) при 4000 g в течение 5 мин. Собранный материал использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР.

Количественный анализ ДНК. Анализ человеческой ДНК в образцах проводили методом, описанным в руководстве "Молекулярное клонирование" [12].

Амплификация и типирование VNTR-локусов. Амплификацию аroB и D17S5 проводили по методу, описанному Boerwinkle с соавт. [13] и Horn с соавт. [14], соответственно. Амплификационные образцы (25 мкл смеси) содержали 67 mM трис-HCl, pH 8,8, 16,6 mM сульфата аммония, 0,02% твин-20, 0,2 mM каждого dNTP, от 10 до 100 нг ДНК, 0,25 мкМ каждого праймера и 2,5 ед. Taq-полимеразы. Реакцию проводили на многоканальном амплификаторе MC-2 производства АО "ДНК-технология" (Россия) со следующими параметрами - для локуса аroB: один цикл при 94°C 2 мин, 30 циклов при 94°C 10 сек, 62°C 10 сек, 72°C 10 мин, один цикл 72°C 3 мин; для локуса D17S5: один цикл при 94°C 2 мин, 30 циклов при 94°C 10 сек, 66°C 10 сек, 72°C, 10 сек, один цикл 72°C 2 мин.

Электрофоретическое разделение амплифицированных фрагментов ДНК проводили на 2% агарозном геле в трис-боратном буфере, как описано ранее [12]. Для маркировки аллелей локусов использовали специально синтезированные нами маркеры молекулярного веса аллелей локусов (см. рис.1 и рис.2). Электрофорез проводили при 8 вольт/см; краситель бромфеноловый синий при этом смещался на 12-15 см от старта.

Оптимизация праймеров. В качестве праймеров для локуса аroB использовали как стандартные [13], так и оригинальные праймеры следующего состава: прямой праймер, 5'-ATCCAAACCCACAATGATCCACC; обратный праймер, 5'-CCTTCTCACTTCCCAAATACAATTCC.

При двухстадийной ПЦР для локуса аroB использовали внешние праймеры следующего состава: прямой праймер 5'-CCTCTAGAACACATGGTGTG; обратный праймер: 5'-ACCAGAGGTTGTTCTCTCA. Внутренние праймеры были стандартные [13].

Праймеры для локуса D17S5 имели как стандартные последовательности [14], так и оригинальные: прямой праймер, 5'-ACTCAACTCCACACCACCCCAACCCCTC и обратный праймер, 5'-CTCCCCACACTCTTTATTCTTCACCCTTC.

Все праймеры синтезированные твердофазным триэфирным методом на автоматическом синтезаторе отечественного производства ООО "Биоссет" ASM-800 (Новосибирск).

Влияние бычьего сывороточного альбумина (БСА) на амплификацию. Амплификацию всех образцов ДНК проводили по каждому локусу в присутствии или отсутствии БСА (фракция V) фирмы "Sigma" (США) в диапазоне конечных концентраций 50-500 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В образцах ДНК из биологических объектов часто присутствуют растворимые загрязнения как органической, так и неорганической природы. Некоторые из этих примесей являются ингибиторами ДНК-полимеразной реакции [16-17]. В работе [17] утверждается, что из известных протоколов очистки таких объектов наиболее эффективен метод экстракции органическими растворителями совместно с использованием смолы центрикон-100 [18]. По нашим данным, этот метод также отличается наименьшими потерями ДНК и наибольшей стабильностью результатов. К числу недостатков этого метода можно отнести его трудоемкость, необходимость применения специального оборудования и малую пригодность при очистке ДНК из сильнозагрязненных объектов. Предлагаемый нами способ очистки ДНК из сильно загрязненных

ОЧИСТКА ДНК ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБЪЕКТОВ

объектов является двухстадийным. На первой стадии применяется стандартный фенол-хлороформный метод с предварительной обработкой протеиназой К [1-3].

На второй стадии образец пропускается через микроколону, заполненную дауэкс-50W и сефадекс G-50. На верхнем слое (дауэкс-50W) происходит очистка ДНК от катион-содержащих примесей, на нижнем слое (сефадекс G-50) происходит дополнительная гель-фильтрация от низкомолекулярных примесей. Нами были выделены образцы ДНК из сильно загрязненных биологических объектов, содержащих различные красители (в том числе индиго), а также гем-содержащие ингибиторы ДНК-полимераз, присутствующие в некоторых предметах носителях, например, разложившемся биологическом материале. Практика показывает, что добиться амплификации на ДНК, выделенных из таких объектов, чрезвычайно трудно, а иногда невозможно. Стабильность ПЦР после очистки матрицы предлагаемым нами методом достаточно высока. Для очень сильно загрязненных носителей с частично деградированной ДНК рекомендуется двухстадийная очистка. При этом практически исключаются потери раствора ДНК: с колонки элюируется тот же объем, что и наносится. Быстрота и простота метода также выгодно отличает его от других протоколов.

Специфичность амплификации может быть существенно повышена добавлением в реакционную смесь БСА в конечной концентрации 160 мкг/мл [15]. Ингибирование реакции амплификации обнаруживалось в случае образцов ДНК, выделенных на первом этапе из сильно загрязненных или джинсовых тканей, и не устранялось при добавлении БСА (160 мкг/мл) в реакционную смесь [15]. Добавление БСА в амплификационную смесь к матрице ДНК, полученной после второй стадии очистки, приводит к стабилизации реакции и даже к увеличению продукта. При этом имеет значение то, что БСА присутствует не в буфере для ДНК-полимеразы ($\times 10$), а добавляется непосредственно в реакционную смесь в необходимой концентрации (рис. 1 дорожка 3 и рис. 2 дорожка 2).

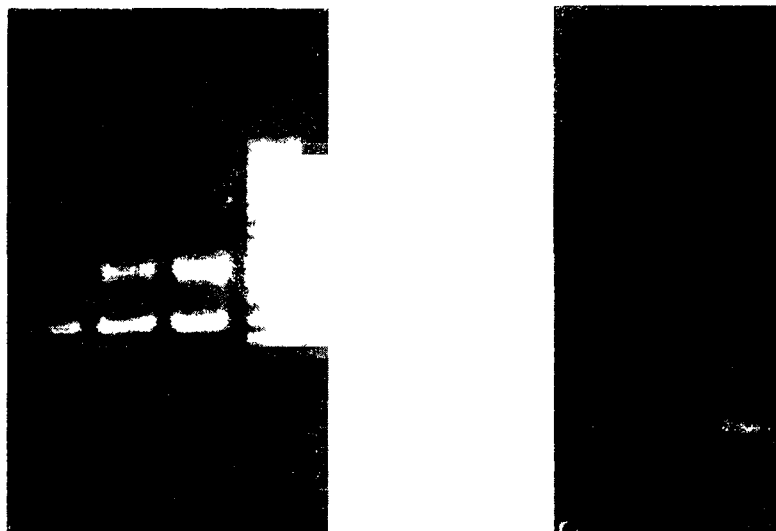


Рисунок 1.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации локуса *AroB* в 2% агарозном геле (в реакционной смеси ПЦР содержится 2 нг ДНК): Дорожки: 1 - стандартные праймеры длиной 20 нп; 2 - удлиненные праймеры длиной 24 и 26 нп; 3 - удлиненные праймеры с добавлением БСА до концентрации 160 мкг/мл, 4 - маркерные аллели для *AroB* локуса

Мы столкнулись с тем, что применение олигонуклеотидных праймеров, специфичных к полиморфным локусам *aro B* и *D17S5*, не всегда приводило к воспроизводимым результатам, а также имело ограниченную чувствительность при низких (меньше 10 нг) концентрациях матрицы. Для решения этой проблемы мы удлинит

праймеры для локуса аroB до 24 и 26 пар нуклеотидов (пн) вместо обычных 20 пн. а в случае локуса D17S5 до 29 пн взамен обычных 21 пн. Соответственно была изменена и температура отжига праймеров при проведении реакции ПЦР. Наиболее оптимальной для локуса аroB оказалась температурой отжига 62°C и для локуса D17S5 - 64-66°C. При более высокой температуре отжига происходит более избирательная посадка праймеров на ДНК-матрицу. В случаях низкой концентрации ДНК, ее деградации или сильной загрязненности ингибиторами этот фактор имеет существенное значение, что можно видеть на рисунке 1 (дорожка 2) и рисунке 2 (дорожка 3). Чувствительности описанных выше праймеров достаточно для того, чтобы проводить удовлетворительные амплификации с матрицы ДНК, содержащейся в реакционной смеси в количестве 2-4 нг.

В экспертной практике нередко случаи исчезающе малого количества биологического материала на предметоносителе (например, волос, слюна на конверте и т.п.). Провести удовлетворительную амплификацию выделенных с таких предметов ДНК по VNTR- и даже STR-локусам затруднительно. Мы применили метод "гнездовой" амплификации для локуса аroB для повышения чувствительности и специфичности ПЦР [10, 11]. Контрольный образец ДНК разводили последовательно до минимального значения 10 пг на одну реакционную смесь. Это соответствует одной-двум копиям ДНК-матрицы (см.рис.2). На рисунке 2 видно, что ДНК гетерозиготна по данному локусу, присутствуют обе аллели (дорожки 1 и 3). На дорожках 2 и 4 присутствуют только по одной аллели (в одном случае легкая аллель, в другом тяжелая аллель). Это объясняется тем, что при внесении ДНК-матрицы в реакционную смесь из раствора столь низкой концентрации, статистически захватывается молекула ДНК либо с одной, либо с другой аллелью. Таким образом, наглядно продемонстрировано достижение теоретически возможного предела чувствительности метода ПЦР, когда в реакционной смеси находятся единичные копии ДНК-матрицы.

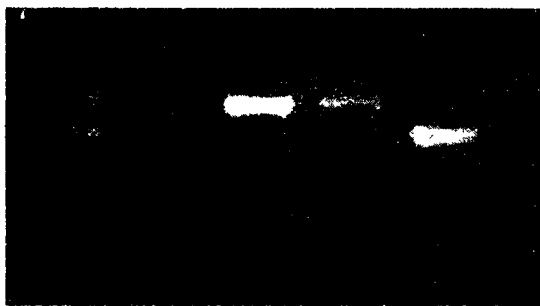


Рисунок 2.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации локуса D17S5 в 2% агарозном геле (в реакционной смеси ПЦР содержится 2 нг ДНК): Дорожки: 1 - стандартные праймеры длиной 21 пн; 2 - удлиненные праймеры с добавлением БСА до концентрации 160 мкг/мл; 3 - удлиненные праймеры длиной 29 пн; 4 - маркерные аллели для D17S5 локуса.

Таким образом, в данной работе решены две проблемы, с которыми сталкиваются лаборатории при проведении молекулярно-генетической персонификации: 1) разработан надежный способ выделения и очистки ДНК из сильно-загрязненных объектов; 2) оптимизированы размер и последовательность соответствующих олигонуклеотидных праймеров и подобраны условия амплификации ДНК для двух локусов (аroB и D17S5), позволяющие проводить амплификации при содержании ДНК матрицы от 4- до 10 нг. Применение "гнездового" метода амплификации для локуса аroB позволило значительно понизить концентрацию матрицы ДНК до 10 пг. Предлагаемый нами метод очистки ДНК можно использовать не только в судебно-медицинских и криминалистических лабораториях, но и в любых других при выделении различных ДНК из биологического материала.

ОЧИСТКА ДНК ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОБЪЕКТОВ

Коллектив авторов выражает глубокую признательность профессору, зав. лаб. биохимии аминов и циклических нуклеотидов ГУ НИИ БМХ РАМН Медведеву А.Е. за ценные советы и критические замечания в процессе работы и написания статьи.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Muller S.A., Dykes D.D. and Polesky H.F. (1982) Nucl. Acids Res., **16**, 1215-1223.
2. Lin D., Blom B. and Holmlund G. (1988) Gene Anal. Techn., **5**, 97-101.
3. Gustincich S., Manfioletti G., Del Sal G., Carninci P. (1991) BioTechniques., **11**, 298-302.
4. Roos J.A., Nelson G.B., Holden K.L., (1992) Nucl. Acids Res., **19**, 6053-6054.
5. Zeillinger R., Schneeberger C., Speiser P., Kury F. (1993) Bio-Techniques., **14**, 202-203.
6. Ефремов И.А., Носиков В.В., Скоблилов Е.Ю., Законова А.Ф., Иванов П.Л. (2001) Судебно-медицинская экспертиза, **44**, 11-17.
7. Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobczalski C.A., Stanley D.M., Bacchtel F.B. (1994) J. Forensic Sci., **39**, 1254-1269.
8. Hochmeister M.N., Budowle B., Borer U.V., Eggmann U., Comey C.T., Dirnholer R. (1991) J. Forensic Sci., **36**, 1649-1661.
9. Lahiri D.K., Bye S., Nurnberger J.I., Hodes M.E., Crisp M. (1992) J. of Biochem. Biophys. Meth., **25**, 193-205.
10. Honda K., Nakatome M., Islam M.N., Bai H., Ogura Y., Kuroki H., Yamazaki M., Terada M., Misawa S., Wakasugi C. (1995) Forensic Sci., **40**, 637-640.
11. Schmitt C., Schmutzler A., Prinz M., Staak M. (1994) Forensic Sci Int., **66**, 129-41.
12. Maniatis T., Fritach E.F. and Sambrook (1993) J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
13. Boerwinkle E., Xiong W., Fourest E. and Chan L. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 212-216.
14. G.T., Richards B., and Klinger K.W. (1989) Nucl. Acids Res., **17**, 2140.
15. Hagelberg E., Sykes B., and Hedges R. (1989) Nature, **342**, 485.
16. Singer-Sam J., Tanguay R.L., Riggs A. (1989) Amplifications, **3**, 11.
17. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991) Bio-Techniques, **10**, 506-513.
18. Лабораторное руководство фирмы Amicon Corporation Company.

Поступила 15.01.2004

EFFECTIVE METHOD OF DNA PURIFICATION FROM BIOLOGICAL AND NON-BIOLOGICAL CONTAMINATIONS AND OPTIMIZATION OF ITS AMPLIFICATION

V.I.Fedchenko, S.O.Guriev, A.A.Kaloshin

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia;
fax: 245-08-57; e-mail: fedval@ibmh.msk.su

A new modification of DNA purification has been developed. It includes: 1) standard treatment of biological material with proteinase K followed by phenol-chlorophorm extraction; 2) subsequent sample purification using microcolumns packed with Dowex-50 and Sephadex G-50. Oligonucleotide primers often used for DNA typing in man by means of polymerase chain reaction have also been modified. These are VNTR (variable number of tandem repeats) loci of apoB and D17S5. The increase of stability and specificity of amplification of VNTR loci of apoB and D17S5 was achieved by increase of primer length and amplification cycle. The sensitivity of this mode of amplification is 2-4 ng DNA-tenplate. Employment of the nested amplification for apoB locus increased sensitivity of this method up to a few copies of DNA.

Key words: polymerase chain reaction, primers, DNA purification, apoB D17S5.