

Стандартная операционная процедура «STR-профилирование клеток человека»

Составлено: А.Г. Мензоров, к.б.н., в.н.с.

Содержание и назначение: определяет протокол STR-профилирования клеток человека

Местонахождение: ИЦиГ СО РАН

Пересмотр через: 1 год

Для идентификации линий клеток человека необходимо использовать полиморфные маркеры ДНК. COrDIS Plus – набор реагентов для молекулярно-генетической идентификации личности на основе мультиплексного ПЦР-анализа 19 локусов, содержащих короткие tandemные повторы (STR-локусы) и локуса гена амелогенина в геномной ДНК человека. Из 19 анализируемых STR-локусов 13 составляют стандартную панель CODIS (системы комбинированного индекса ДНК: D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, и VWA), 5 локусов рекомендованы ENFSI (Европейской Сетью Институтов Криминалистики) для расширения европейских национальных баз данных (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 и D22S1045) и локус SE33 - наиболее полиморфный из известных STR-маркеров. Праймеры для ПЦР подобраны с учетом проведения амплификации всех 20 локусов в одной пробирке. Размер всех амплифицируемых ПЦР продуктов < 420 пар нуклеотидов (с учетом всех известных аллелей). Анализ результатов ПЦР проводится методом капиллярного электрофореза с использованием автоматических генетических анализаторов с лазериндуцированной флуоресцентной детекцией. В наборе используется пять флуоресцентных красителей, характеризующихся разными длинами волн эмиссии для возможности одновременной детекции в разных каналах флуоресценции. Праймеры мечены четырьмя флуоресцентными красителями детектируемыми в каналах Blue, Green, Yellow, Red. Стандарт длины S550 мечен пятым, флуоресцентным красителем и детектируется в отдельном канале Orange одновременно с продуктами ПЦР.

В ходе работы мы руководствовались правилами лабораторной практики (Приложение к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н) и ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. М.: Стандартинформ. 2010. 12 с.

Все работы, проводимые в условиях лаборатории, должны вестись в соответствии с правилами пожарной безопасности и охраны труда. Процедуры, требующие стерильности,

проводят в ламинарных боксах, классом безопасности не ниже II. При работе обеспечиваются условия, предотвращающие заражение персонала инфекционными агентами из первичного биоматериала.

Все оборудование проходит процедуру калибровки сотрудниками лаборатории с периодичностью и с использованием методов, как это указано производителем. Все расходные материалы и реактивы должны иметь соответствующие сертификаты качества и храниться соответственно спецификации.

Контроль выполнения пунктов протокола возлагается на Руководителя работ. Ответственность за выполнение данной процедуры несут все сотрудники, участвующие в исследовании.

Оборудование и материалы

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

Лабораторное оборудование (приведены возможные варианты производителей и марок оборудования)

Для большей части оборудования ниже не указан производитель, так как можно использовать приборы разных производителей. Криоконтейнер также можно заменить на аналогичный.

- Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот.
- Набор пипеток 10, 20, 100, 200, 1000 мкл.
- Центрифуга-вортекс для пробирок 0,5 и 1,5 мл.
- Термошейкер для пробирок 1,5 мл.
- Холодильники на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Спектрофотометр для измерения концентрации нуклеиновых кислот Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).
- Лед.
- Термоконтейнер (в том числе пенопластовые коробки).

Расходные материалы и реактивы (приведены возможные варианты производителей материалов и реактивов)

Указанные ниже реагенты можно заменять на аналогичные от других производителей, поэтому, например, для части пластиковых расходных материалов производитель не указан.

- Набор реагентов для STR-профилирования ДНК человека COrDIS Plus (Gordis, CP-192S).
- Пластиковые носы объемом 10, 200 и 1000 мкл.
- Пластиковые пробирки объемом 0,5 и 1,5 мл.

- Тонкостенные пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 200 и 500 мкл.
- Протеиназа К.
- Лизирующий буфер.
- Вакуумная смазка (Corning).
- Изопропанол.
- 70 % этанол.
- Фенол.
- Хлороформ.
- Трис.
- ЭДТА.
- Уксусная кислота (ледяная).
- Деионизированная вода.
- Агароза.
- Бромистый этидий.
- ДНК-маркер 100–1500 пар оснований.
- Клеточная суспензия, полученная при пересадке соответствующих линий.

Подготовка материалов

- Клеточный материал: перед выделением ДНК клеточную суспензию промыть в НФБ, переместить в 1,5 мл пробирку, центрифугировать 5 мин на 1500 об/мин и удалить супернатант. Полученный клеточный осадок можно хранить на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента выделения ДНК.
- 50X ТАЕ буфер: Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота (ледяная) – 8,96 мл, деионизированная вода – 73,3 мл (для приготовления 100 мл раствора). Для получения рабочей концентрации 50X буфер необходимо развести в деионизированной воде 1:49.
- Лизирующий буфер: Tris-HCl pH 7,5 10 мМ, ЭДТА 10 мМ, NaCl 10 мМ, SDS 0,5 %.

STR-профилирование клеток человека

Выделение ДНК

- 1) К клеточному осадку добавить лизирующий буфер из расчёта 300 мкл на образец и протеиназу К в рабочей концентрации 100 мкг/мл.
- 2) Пробирки поместить в термошейкер при $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 500–700 об/мин и дождаться полного растворения образцов (1–2 ч).

3) К полученному клеточному лизату добавить фенол и хлороформ в соотношении 1:1 (объем каждого раствора должен быть не менее 300 мкл) и перемешать. К каждому образцу добавить вакуумной смазки (~ шарик с диаметром до 0.5 см).

4) Центрифугировать при 14000 g 10 мин. Полученный супернатант, располагающийся над слоем вакуумной смазки, перенести в чистую пробирку.

5) Добавить 1 мл изопропанола, перемешать и центрифугировать при 14000 g 10 мин. Убрать супернатант и промыть полученный осадок ДНК 1 мл 70 % этанола.

6) Убрать супернатант и просушить осадок ДНК в течение 10–20 мин при комнатной температуре. Растворить осадок ДНК в небольшом объеме деионизированной воды (20–50 мкл) и измерить концентрацию (согласно инструкциям производителя). Полученные растворы ДНК могут храниться при –20 °С.

STR-профилирование

7) В каждую пробирку необходимо внести 5 мкл Активатора. Затем внести до 20 мкл раствора исследуемой геномной ДНК в количестве 0,2–2 нг. Оптимальное количество вносимой ДНК – 0,5 нг. Вносимый объем ДНК зависит от ее концентрации. Максимально возможный объем вносимого раствора ДНК составляет 20 мкл. При необходимости довести общий объем реакции до 25 мкл деионизированной водой, поставляемой в составе набора.

8) После внесения всех компонентов, реакционную смесь необходимо тщательно перемешать до гомогенного состояния 5–8 кратным пипетированием, либо используя вортекс. При необходимости, собрать раствор на дне пробирки коротким центрифугированием. Тщательное перемешивание необходимо для максимальной эффективности реакции.

9) С каждой серией исследуемых образцов необходимо амплифицировать один положительный контроль (0,5 мкл контрольной ДНК, поставляемой с набором) и один отрицательный контроль (деионизированная вода вместо ДНК).

10) Приведенные ниже условия амплификации рекомендуются в качестве стандартных параметров. Важно соблюдение скорости нагрева 0,3 °С/с. на этапе повышения с температуры с 59 до 72 °С. В связи с высокой сложностью амплификации с участием большого количества пар праймеров данная скорость нагрева критична для оптимальной эффективности реакции.

11) 94 °С 3 мин

12) 98 °С 30 с

13) 59 °С 120 с 4 цикла

14) 72 °С 90 с

15) 94 °С 30 с

- 16) 59 °С 120 с 6 циклов
- 17) 72 °С 90 с
- 18) 90 °С 30 с
- 19) 59 °С 120 с 18 циклов
- 20) 72 °С 75 с
- 21) 68 °С 10 мин
- 22) 15 °С ∞
- 23) Рекомендуемая скорость нагрева с 59 до 72 °С – не более 0,3 °С/1 с.
- 24) Отдать образцы для проведения капиллярного электрофореза.
- 25) Проанализировать результаты.

При подготовке СОП «STR-профилирование клеток человека» использованы следующие литературные источники:

1 GORDIZ [Электронный ресурс]. — Режим доступа:
<http://gordiz.ru/index.php/produkty/kriminalistika/analiz-str-lokusov-cheloveka/3-cordis-plus>,
свободный. — Загл. с экрана.