



Исследовательская статья

Выделение и генетический анализ чистых клеток из биологических образцов в судебно-медицинской экспертизе: Точность цифрового подхода



Ф. Фонтана^{a,*}, К. Рапоне^b, Дж. Брегола^a, Р. Аверса^a, А. Де Мео^b, Дж. Синьорини^a, М. Серджио^a, А. Феррарини^a, Р. Ланцелотто^a, Дж. Медоро^a, Дж. Джиорджини^a, Н. Манареси^a, А. Берти^b

^a Menarini Silicon Biosystems S.p.A., Bologna, Italy

^b Reparto Investigazioni Scientifiche Carabinieri R.I.S., Roma, Italy

ИНФОРМАЦИЯ О СТАТЬЕ

История публикации:

Поступила в редакцию 17 февраля 2017

Получена после правки 20 апреля 2017

Принята в печать 30 апреля 2017

Доступна онлайн 1 мая 2017

Ключевые слова:

Биологические образцы для судебно-медицинской экспертизы
Выделение чистых клеток
Цифровая сортировка клеток
DEPAgtaу
Генотипирование
Единичная клетка

РЕЗЮМЕ

Современные технологии генотипирования позволяют получать достоверные генетические профили для идентификации преступника даже из биологических образцов чрезвычайно малого объема. Безусловная проблема возникает, когда необходимо выделить генетические профили из смешанных следов, состоящих из биологического материала от двух или более индивидов. В этом случае после профилирования ДНК часто получают комплексные профили, которые затем являются предметом статистического анализа.

В принципе, когда в образец попадают разные биологические жидкости от нескольких лиц, их индивидуальные генетические профили можно получить, если до генотипирования разделить разные типы клеток (напр., эпителиальные клетки, клетки крови, спермы).

Для решения этой задачи были изучены разные методики, такие как флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS) или лазерная захватывающая микродиссекция (LCM), но до сих пор ни один из этих методов не гарантировал полного разделения разных типов клеток, присутствующих в смешанном биологическом образце.

Получены многократные подтверждения того, что в других областях применения, таких как онкология, DEPAgtaу™-технология – основанная на анализе изображений цифровая микрофлюидная сортировка, – позволяет получать чистые клетки с точностью до одиночной клетки. Данная работа рассматривает применимость технологии DEPAgtaу™ для анализа биологических образцов в судебно-медицинской экспертизе с точки зрения проблемы разделения смешанных следов биологического происхождения.

Во-первых, мы отчитываемся о результатах разработки рабочего процесса DEPAgtaу™ для конкретного приложения, позволяющего обнаруживать и извлекать чистые гомогенные популяции клеток из модельных смесей кровь/сперма/слина и сперма/слина и обеспечивать полное генетическое совпадение с генетическими профилями соответствующих доноров. Помимо этого, мы оценили эффективность стандартных судебно-медицинских методов количественной оценки ДНК и генотипирования на небольшом числе DEPAgtaу™-выделенных клеток, показав, что чистые, практически полные профили можно получить всего из десяти гаплоидных клеток. И, наконец, мы изучили применимость метода для реальных образцов из судебного дела, продемонстрировав, что описанный подход обеспечивает полное разделение клеток с исключительной точностью.

Во всех исследованных случаях технология DEPAgtaу™ проявила себя как передовая технология для разделения биологических образцов в судебно-медицинской экспертизе путем прецизионного выделения чистых клеток для неопровержимой идентификации полученных генетических профилей.

© 2017 Авторы. Опубликовано Elsevier Ireland Ltd. Статья находится в открытом доступе под CC BY-NC-ND лицензией (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Введение

Биологические улики, собранные как часть расследования на месте преступления (например, кровь, телесные жидкости, волосы и другие ткани) потенциально несут огромное количество генетической и негенетической информации.

* Автор для переписки: Giuseppe di Vittorio 21/B3, 40013 Castel Maggiore, Bologna, BO, Italy.

E-mail address: ffontana@siliconbiosystems.com (F. Fontana).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.023>

1872-4973/© 2017 Авторы. Опубликовано Elsevier Ireland Ltd. Находится в открытом доступе по лицензии CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Анализ собранных биологических улик может обеспечить информацию о природе биологических жидкостей с помощью стандартных биохимических и иммунохроматографических исследований. Однако конечной и наиболее важной целью судебно-медицинской экспертизы является определение генетического профиля для идентификации донора [1].

В судебно-медицинской экспертизе стандартный рабочий процесс для генотипирования включает выделение ДНК, количественную оценку, амплификацию коротких tandemных повторов и анализ с использованием коммерческих наборов реагентов. Этот метод является высокоэффективным и в настоящее время позволяет получить полный генетический профиль из такого малого количества ДНК, как сотни пикограмм [2].

Несмотря на высокую эффективность, в случае биологических образцов, состоящих из телесных жидкостей от двух или более индивидов, новейшие технологии генотипирования могут быть неточными. В большинстве таких случаев будут получены соответственно смешанные генетические профили (комплексный профиль ДНК). В настоящее время биологические смешанные образцы представляют одну из основных проблем криминалистической генетики [2].

Генетический вклад индивидов в биологическом образце, как правило, не сбалансирован. Даже если смесь состоит из равных объемов двух или более разных биологических жидкостей (например, крови/слюны), соотношение соответствующих ДНК все еще будет различным, поскольку количество клеток, присутствующих в жидкостях, разное. Это еще больше усложняет процесс идентификации благодаря серии стохастических эффектов, таких как преимущественная амплификация, которая может влиять на ПЦР [2].

Во многих случаях один из источников в биологическом образце смешанного типа представлен на минимальном уровне. Генетический след этого донора, скорее всего, не будет обнаружен из-за ограничений чувствительности или насыщения реакции основным компонентом; обычно второстепенный источник в смеси ДНК не выявляется, если отношения компонентов превышают 1:20 [3]. Таким образом, задачей анализа смеси биологических образцов является правильное разделение комплексного профиля ДНК на компоненты, независимо от относительного количества ДНК и его клеточного источника.

Стандартным подходом для анализа комплексного профиля ДНК в настоящее время является статистическая деконволюция, а предпочтительно используемым методом – оценка отношения правдоподобия (LR). LR определяется как соотношение двух вероятностей одного и того же события, определенного двумя альтернативными гипотезами: гипотезой обвинения (числитель) или гипотезой защитника (знаменатель) [4]. Подробные статистические расчеты LR для комплексного профиля ДНК проводят в основном с помощью специально разработанного и сертифицированного программного обеспечения, основанного на вероятностном определении соответствия профиля. Несмотря на усилия научного сообщества, направленные на оптимизацию статистического анализа, не всегда можно достичь полной деконволюции генетических профилей [5].

Необходимость надежных решений проблемы биологических образцов для судебно-медицинской экспертизы привела к множеству попыток разработки альтернативных подходов. В случаях изнасилований при анализе пятен и вагинальных мазков в основном используют дифференциальную экстракцию ДНК [6]. Этот метод, однако, можно применять только для разделения ДНК, высвобожденной из смеси спермы и эпителиальных клеток, и он имеет несколько других ограничений: чувствительность при работе с несколькими спермами относительно низкая, он не всегда гарантирует полное разделение ДНК из разных типов клеток и не дает прямого подтверждения источника клеток.

Недавно технология секвенирования следующего поколения (NGS) с ее возможностями высокопроизводительного массового параллельного секвенирования (MPS) также была использована в судебно-медицинской генетике для повышения информативности получаемых результатов путем добавления к STR-анализу базы данных по SNP [7]. С помощью NGS предпринимаются попытки выявления ДНК всех доноров, присутствующей в смеси, благодаря более высокой чувствительности и более широкому спектру получаемой информации. Хотя NGS представляет собой новый аналитический метод для работы со смешанными следами биологического происхождения, он не смог обеспечить четкого и однозначного решения проблемы, поскольку идентификация профилей все еще производилась с помощью статистического анализа [7].

В обоих подходах ДНК выделяют непосредственно из биологического образца: клетки разрушаются, ДНК выделяется в раствор и оставшиеся компоненты клеток уничтожаются путем очистки; при таком подходе информация о фенотипе клеток утрачивается [7].

Наиболее оптимальным решением проблемы смешанных следов биологического происхождения может быть физическое разделение разных типов клеток *a priori* и последующее проведение стандартного генетического анализа на очищенном образце клеток с предоставлением соответствующего генетического профиля вместе с морфологическим и фенотипическим описанием.

С этой целью было опробовано много разных подходов, таких как лазерная захватывающая микродиссекция (LCM) и флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS). Несмотря на совершенствование на протяжении длительного времени, обе технологии так и не получили полного одобрения сообщества судебно-медицинских экспертов, поскольку не смогли достичь нужной производительности, чувствительности и чистоты [8–10].

В последние годы технологию DEPAarray™ (Menarini Silicon Biosystems, Италия, MSB), имеющую высокую степень автоматизации, основанную на анализе изображения и позволяющую выделять чистые клетки с точностью до одиночной клетки, успешно применили для решения разных биологических задач, связанных с выделением чистых клеток из смешанных образцов, получая 100% гомогенный образец для последующего генетического анализа [11–16].

Тринадцать микролитров суспензии флуоресцентно-меченых клеток наносят на одноразовый картридж DEPAarray™, который затем помещают в систему DEPAarray™. В микроэлектронный чип, представляющий собой дно манипуляционной камеры в картридже, погружены программируемые электроды. При активации электродов диэлектрфоретическая сила (DEP) заключает клетки в ловушки и удерживает их в состоянии стабильной левитации, пока система автоматически сканирует клетки и измеряет интенсивность флуоресценции и морфологические параметры по различным каналам флуоресценции. Собранные данные отображаются и обрабатываются с помощью ПО CellBrowser™, которое предоставляет множество аналитических инструментов для идентификации и отбора клеток. Высокий уровень технологии и автоматизации минимизирует взаимодействие оператора с системой DEPAarray™ при отборе нужных клеток. Выделенные клетки собирают в порции чистого буфера как гомогенные популяции или как одиночные клетки помещают в 0.2 мл пробирки, и после этого клеточный материал готов для генетического анализа.

Способность технологии DEPAarray™ извлекать чистые клетки из смешанных популяций широко обсуждалась в онкологических исследованиях [11,15,17–21], но она явно обладает огромным потенциалом и для решения проблемы биологических образцов для судебно-медицинской экспертизы.

Настоящая работа направлена в первую очередь на разработку рабочего процесса для судебно-медицинской экспертизы на основе технологии DEPAarray™ и охарактеризование его результативности для решения проблемы смешанных биологических образцов для судебно-медицинской экспертизы. Рабочий процесс начинается с извлечения неповрежденных клеток из следов биологического происхождения; он включает этап подготовки клеток для эксперимента DEPAarray™ и позволяет проводить стандартный генетический анализ на выделенных чистых клетках. Первой задачей была идентификация разных типов клеток, присутствующих в модельных смесях, и извлечение чистых клеток для генетического анализа. Вторая задача состояла в оценке применимости стандартных методов генотипирования и количественного анализа ДНК, разработанных в судебно-медицинской экспертизе для ДНК, экстрагированной непосредственно из следов биологического происхождения, для клеток, извлеченных с помощью DEPAarray™, в отношении соответствия критериям чувствительности и надежности для идентификации человека.

В заключение указанный рабочий процесс был использован для разделения следов биологического происхождения, относящихся к случаю изнасилования, для оценки возможности надежного решения проблемы биологических образцов для судебно-медицинской экспертизы.

2. Материалы и методы

2.1. Анализ модельных биологических образцов смешанного происхождения

Набор модельных биологических образцов смешанного происхождения готовили из крови, слюны и спермы, которые являются наиболее распространенными телесными жидкостями, выявляемыми при расследовании на месте преступления. Образцы обрабатывали для подготовки иммунофлуоресцентно меченых клеточных суспензий, подходящих для системы DEPAarray™; чистые клетки, выделенные с помощью технологии DEPAarray™, анализировали стандартными методами судебно-медицинской экспертизы. Использованный рабочий процесс показан Рис. S1 Приложения.

2.1.1. Подготовка модельных биологических образцов смешанного происхождения

Образцы крови, спермы и слюны собирали в Отделе научных исследований полиции Рима, Италия (на итальянском: Reparto Investigazioni Scientifiche di Roma, Italy — R.I.S.) с письменного согласия доноров. Кровь (доноры $n = 5$) собирали в пробирку с ЭДТА из латеральной подкожной вены руки. Слюну (доноры $n = 3$) и сперму (доноры $n = 2$) собирали в стерильные пробирки.

Для моделирования биологических образцов биологическую жидкость сначала помещали в пластиковые стрипы, затем добавляли вторую, отличающуюся жидкость, создавая каплю смешанной крови и слюны ($n = 5$) или смешанной спермы и слюны ($n = 5$). Жидкости смешивали в уменьшающейся пропорции (1:1, 1:10 и 1:50) путем комбинирования объемов соответствующих исходных. Полученные смеси жидкостей адсорбировали на стерильные криминалистические зонды-тампоны, далее «тампоны» ($n = 7$ ForensiX SafeDry Evidence Collection Tube, Thermo Fisher Scientific; $n = 3$ 4N6 FLOQSwabs™ Genetics, Копан, Италия). Высушенные на воздухе тампоны направляли в лабораторию компании Menarini Silicon Biosystems (Болонья, Италия), где образцы хранили или при 4°С (первый набор, $n = 3$) или при комнатной температуре (второй набор, $n = 7$). В среднем промежуток от момента приготовления образцов до их анализа DEPAarray™ составлял 21.3 дней как для первого набора (от 14 до 29 дней), так и для второго (от 4 до 36 дней), как уточняется в Таблице 1.

Референсные генетические профили получали из 0.2 мкл аликвот каждой жидкости.

2.1.2. Подготовка образцов спермы/слюны для DEPAarray™-анализа

Головки тампонов погружали в 15 мл центрифужные пробирки, содержащие 8 мл буфера (autoMACS¹ Running Buffer, Miltenyi Biotec), и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре при слабом перемешивании (300 rpm) для сбора неповрежденных клеток из модельных образцов. После инкубации каждую головку тампона переносили во вставную фильтрующую колонку с сеткой, помещенную сверху 1.5 мл пробирки; добавляли еще 0.2 мл буфера и тампоны центрифужировали 20 минут при 300g для дальнейшего отделения оставшихся клеток. Параллельно проводили центрифужирование пробирок, в которых ночью инкубировали тампоны. Головки тампонов затем выбрасывали, и оба клеточных осадка, полученные из одного тампона, объединяли в 1.5 мл пробирке. Полученные клеточные суспензии инкубировали в пермеабилizационном растворе в течение 15 мин, затем 15 мин в ядерном красителе Hoechst для детекции ядер. Добавляли специфичные к головке сперматозоида антитела, конъюгированные с аллофикоцианином (SHA-APC), и инкубировали 5 мин. После этого добавляли антитела к цитокератину, конъюгированному с фикоцитринном (СК-PE), для идентификации эпителиальных клеток, и смесь с обоими антителами инкубировали в течение еще 10 минут. Затем клеточные суспензии промывали буфером для удаления излишка антител и фиксировали в 1% растворе параформальдегида (PFA) 10 минут при комнатной температуре.

2.1.3. Подготовка образцов слюны/крови для DEPAarray™-анализа

Процедура, адаптированная для приготовления смесей крови/слюны, была такой же, как и для образцов спермы/слюны, с некоторыми специфическими поправками. Во-первых, для сбора клеток требуется более короткая инкубация (30 мин), чтобы избежать разрушения клеток крови. Далее, поскольку красные кровяные клетки (RBCs) и тромбоциты не содержат ядер и, следовательно, информации о ядерной ДНК, их избирательно удаляли.

Тромбоциты удаляли путем добавления 8 мл буфера (autoMACS¹ Running Buffer, Miltenyi Biotec), 30 мин центрифужирования при 200g и удаления супернатанта. Лизис RBCs являлся результатом проведения мягкой фиксации. Иммуофлуоресцентное окрашивание приводили с помощью CD45 APC-конъюгированных антител для детекции лимфоцитов, затем с антителами СК-PE для идентификации эпителиальных клеток, присутствующих в слюне, как описано ниже.

Для обоих образцов (смеси спермы/слюны и слюны/крови) антитела индивидуально оптимизировали для конкретной задачи путем подбора целевых человеческих антигенов, специфичных для каждой исследуемой биологической жидкости. При этом необходимо учесть, что мишенью антител к цитокератину (СК) являются кератин-содержащие промежуточные филаменты цитоскелета клеток эпителиальных тканей, следовательно, они могут выявлять клетки, отслоившиеся от эпителия как вагинального тракта (обнаруживаются в вагинальной жидкости), так и эпителия ротовой полости (обнаруживаются в слюне). Полная процедура подготовки образцов, описанная в данной работе, в настоящее время доступна как коммерческий продукт MSB (DEPAarray™ Forensic Sample Prep Kit).

2.1.4. Идентификация и выделение клеток с использованием системы DEPAarray™

Суспензии меченых клеток дважды промывали в 1 мл буфера SB115 (MSB, Италия), и осадки клеток ресуспендировали в конечном объеме 13 мл, как рекомендовано технологией; каждую суспензию клеток загружали в картридж DEPAarray™. Все эксперименты DEPAarray™ проводили в соответствии инструкцией пользователя прибора.

Используя программу CellBrowser™, обнаруженные клетки фильтровали с помощью инструмента «гистограмма», чтобы выбрать из них те, которые были правильно пойманы «в ловушку». Результаты этого первого отбора клеток затем выводили на диаграмму рассеяния, на которой нанесены средние интенсивности флуоресценции APC или PE.

Группы клеток, соответствующие определенным критериям идентификации: SHA-APC+/СК-PE-/Hoechst+ для клеток спермы и CD45-APC+/СК-PE-/Hoechst+ для лимфоцитов и SHA-APC-/СК-PE+/Hoechst+ или CD45-APC-/СК-PE+/Hoechst+ для клеток эпителия, затем гейтировали и сохраняли как, предположительно, клетки спермы, предположительно, эпителиальные клетки или, предположительно, лимфоциты.

Клетки, присутствующие в каждой группе, проверяли одну за другой с использованием программы CellBrowser™, которая представляет собой графический пользовательский интерфейс для отбора клеток системой DEPAarray™. Важно, что эта программа позволяет выводить изображения событий в «полнодинамичном режиме»: это режим визуализации, подходящий как для ярких, так и тусклых сигналов, в котором выявленные уровни флуоресценции адаптивно нормализуются до уровня серого, доступных для показа по типу «изображение за изображением». Это разрешает парадокс установки фиксированных уровней отображения, подходящих для одновременного выявления слабых сигналов без усиления ярких, которые могут негативно влиять на определение морфологии.

Таблица 1

Список модельных биологических образцов. Сводная информация по образцам слюны/крови и спермы/крови. RT = комнатная температура.

ID образца	Пропорция жидкостей	Сперма [мл]	Слюна [мл]	Кровь [мл]	Температура хранения	Срок хранения [дни]
Образцы слюны/крови						
M1	1:1	–	25	25	4 °C	14
M2	1:1	–	25	25	RT	4
M3	1:1	–	25	25	RT	18
M4	1:10	–	5	50	RT	15
M5	1:10	–	5	50	RT	21
Образцы спермы/слюны						
M6	1:10	5	50	–	4 °C	21
M7	1:10	5	50	–	4 °C	29
M8	1:1	25	25	–	RT	32
M9	1:10	5	50	–	RT	23
M10	1:50	1.5	75	–	RT	36

С другой стороны, полная динамичность усиливает даже очень слабые сигналы в связи, например, с выбросом от очень ярких сигналов в разных каналах флуоресценции, что может выражаться в появлении определяемой формы у нормализованного изображения.

Соответственно, анализ и отбор клеток проводили с учетом объединенных данных по морфологии клетки и сигнала иммунофлуоресценции, наряду с его локализацией в клетке: этот итоговый просмотр позволял удалять неклоточные объекты. Время, необходимое для этой операции, зависит от численности всех событий (напр. для индивидуальной проверки 50 клеток, как правило, достаточно 15 мин). Для каждой группы и клеточного типа все клетки, имеющие четкую и достоверную морфологию, специфичный сигнал иммунофлуоресценции и целостное ядро, были отнесены к определенным селективным группам (клетки спермы, эпителиальные клетки или лимфоциты) и выделены как малые популяции гомогенных клеток (напр. только клетки спермы) или чистые одиночные клетки. Из каждой пробирки, содержащей извлеченные клетки, удаляли избыток SB115 буфера в соответствии с протоколом производителя.

2.1.5. ДНК-профилеирование

Для генотипирования чистых выделенных клеток были случайным образом отобраны два модельных образца спермы/слюны и два слюны/крови, чтобы установить их соответствие генетическим профилям соответствующих доноров.

Во избежание потери матрицы выделенные клетки лизировали методом одной пробирки, добавляя лизирующую смесь DEPAggy™ LysePrep Kit (MSB, Италия) непосредственно в пробирку для извлечения клеток в соответствии с инструкциями производителя; по этому методу в пробирку, содержащую клетки спермы, необходимо дополнительно добавить 1 мл 100 мМ дитиотриэтила (DTT). Лизированные клетки затем хранили при -20 °C в течение ночи и отправляли обратно в R.I.S. для последующего генетического анализа. Параллельно из каждого исходного образца выделяли геномную ДНК с помощью автоматической системы очистки ДНК Qiagen EZ1 Advanced xL Nucleic Acid Automated Purification System (Qiagen) [22] и определяли ее количество методом ПЦП в режиме реального времени с использованием набора для количественного анализа ДНК Quantifiler1 Trio DNA Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) [23].

Генотипирующую ПЦП проводили с использованием набора AmpFLSTR¹ NGM SElect™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific), добавляя реакционную смесь непосредственно в каждую пробирку, содержащую лизированные клетки, или используя 250 пг геномной ДНК для получения референсных профилей [24].

Все параметры реакции ПЦП (такие как объем реакционной смеси, параметры температурных циклов, число ПЦП циклов и т.д.) выбирали, следуя инструкции производителя, и в соответствии с методами ISO/IEC 17025, аккредитованными в R.I.S. [25]. Полученные ампликоны разделяли методом капиллярного электрофореза с помощью генетического

анализатора ABI 3500/3500 xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) [26], следуя стандартным процедурам. Регистрацию и выравнивание аллелей проводили с помощью пакета программ, поставляемых с прибором (GeneMapper¹ ID-X v1.4).

В анализ включали все полученные генетические профили, содержащие хотя бы один аллель; аналитический порог, установленный программой GeneMapper¹ для регистрации аллелей, составлял 150 RFU (относительных единиц флуоресценции); все пики, находящиеся ниже, оценивали критически согласно внутренней процедуре проверки лаборатории R.I.S. Для каждой референсной геномной ДНК подсчитывали общее число аллелей выше 150 RFU (Ожидаемое Количество Аллелей), как и для каждого профиля, полученного из выделенных клеток (Общее Количество Аллелей). Затем каждый клеточный профиль сравнивали с профилем соответствующей референсной геномной ДНК для определения числа совпадающих аллелей (Количество Совпадающих Аллелей).

Соответствие клеточного профиля рассчитывали как отношение Количества Совпадающих Аллелей к Общему Количеству Аллелей. В заключение рассчитывали завершенность каждого профиля как отношение Количества Совпадающих Аллелей к Ожидаемому Количеству Аллелей: Соответствие Клеточного Профиля = Количество Совпадающих Аллелей (профиль клетки 1) / Общее Количество Аллелей (профиль клетки 1); Завершенность Клеточного Профиля = Количество Совпадающих Аллелей (профиль клетки 1) / Ожидаемое Количество Аллелей (профиль соответствующей референсной геномной ДНК).

2.2. Методические характеристики генетического анализа DEPAggy™-извлеченных клеток

Дополнительно у шести других доноров были взяты образцы слюны (n = 3), спермы (n = 2) или крови (n = 3); аликваты каждой отдельной жидкости были адсорбированы на тампоны, как описано выше, высушены на воздухе и хранились при +4 °C (среднее время хранения = 29.1 дней). Высушенные образцы восстанавливали в клеточные суспензии и готовили, как описано выше. Иммуноокрашивание проводили с помощью только CD45 для тампонов с кровью, SHА - со спермой и СК со слюной, параллельно окрашивания Hoechst. Многочисленные популяции клеток одного типа (WBC, EC или SC) выделяли из каждой жидкости с помощью цифровой системы DEPAggy™; подробнее: популяции, содержащие точно по 10 клеток, составляли n = 3 для белых клеток крови (WBCs), n = 3 для эпителиальных клеток (ECs) и n = 2 для клеток спермы (SCs), в то время как популяции по 20 клеток составляли n = 4 для WBCs, n = 4 для ECs и n = 3 для SCs. Для создания генетического профиля были использованы все популяции по 10 клеток; 20-клеточные популяции использовали или в технических повторах реакции генотипирования (n = 3 для доноров крови и слюны, n = для доноров спермы), или для проведения генотипирования и количественного анализа той же популяции клеток (n = 3, один для каждого

Таблица 2

Схема извлечения клеток системой DEPAggy™ для генотипирования. Для каждой биологической жидкости (сперма, слюна, кровь), адсорбированной на тампон, в таблице указаны код донора и его пол, точное количество клеток, выделенных системой DEPAggy™, и последующие направления генетического анализа для каждого образца извлеченных клеток.

Жидкость	ID донора	Пол	Число клеток	Генетический анализ
Сперма	D1	XY	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
	D2	XY	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты лизата клеток 1 и 2) количественный анализ (сплит А лизата клеток) + генотипирование (сплит В лизата клеток)
Слюна	D1	XY	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
	D2	XY	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
	D3	XX	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток) количественный анализ (часть А лизата клеток) + генотипирование (часть В лизата клеток)
Кровь	D4	XX	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
	D5	XX	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
	D6	XY	10	генотипирование
			20	генотипирование, 2 повторности (сплиты 1 и 2 лизата клеток)
			20	количественный анализ (сплит А лизата клеток) + генотипирование (сплит В лизата клеток)

донора). Дополнительно были выделены популяции, состоящие точно из 5, 10, 20, 41 и 83 клеток, для количественной оценки ДНК. Схема извлечения для генотипирования и количественной оценки приведена в Табл. 2 и 3.

После DEPAarray™-сортировки излишек SB115 буфера удаляли и клетки лизировали с использованием набора реагентов DEPAarray™ LysePrep kit, как описано выше. Лизированные клетки отправляли в лабораторию R.I.S. для последующего генетического анализа, который проводился с применением набора AmpliFISTR¹ NGM SELE kit, за которым следовал капиллярный электрофорез, как описано ранее.

ПЦР для 10-клеточных популяций проводили, добавляя реактивы для генотипирующего ПЦР непосредственно к лизированным клеткам. Лизаты 20-клеточных популяций (rv 5 мкл) делили на две равные аликвоты в новых ПЦР-пробирках; эти двойные аликвоты, которые по количеству ДНК фактически соответствовали 10-клеточным популяциям, использовали или для генотипирования в двух повторениях, или для генотипирования и количественной оценки ДНК в соответствии со стандартами судебно-медицинской экспертизы.

Параллельно проводили выделение и количественную оценку ДНК каждого образца биологической жидкости. Из геномной ДНК, выделенной из каждого образца крови и слюны, готовили серию разбавленных растворов: 547.8 пг/мкл (соответствует ожидаемому количеству ДНК в 83 диплоидных клетках: 6.6 пг/клетка * 83 клетки), 270.6 пг/мкл (41 диплоидная клетка), 66.0 пг/мкл (10 диплоидных клеток), и 33.0 пг/мкл (5 диплоидных клеток). гДНК, выделенную из каждого образца спермы, разбавляли до 273.9 пг/мкл (соответствует ожидаемому количеству ДНК в 83 гаплоидных клетках: 3.3 пг/клетка * 83 клетки), 135.3 пг/мкл (41 гаплоидная клетка), 33.0 пг/мкл (10 гаплоидных клеток) и 16.5 пг/мкл (5 гаплоидных клеток). Для разбавления всех образцов геномной ДНК использовали или воду, или лизирующую смесь, приготовленную, как описано в инструкции к набору DEPAarray™ LysePrep kit, включая термическую инкубацию и добавление ДТТ к образцам геномной ДНК, полученным из спермы, для исключения эффекта ингибирования, обусловленного лизирующей смесью.

Реакции генотипирующей ПЦР на разбавленных геномных ДНК проводили так же, как описано для клеток. По 1 мл каждой 66 пг/мл ($n = 6$) или 33 пг/мкл ($n = 2$) геномной ДНК амплифицировали сразу, тогда как каждую из 132 пг ($n = 6$) или 66 пг ($n = 2$) геномной ДНК сначала делили на две аликвоты равного объема, как описано ранее для сплитов 20-клеточных лизатов.

Затем для создания стандартных референсных профилей, необходимых для оценки завершенности и соответствия профилей, полученных из клеток и разбавленных образцов геномной ДНК, брали по 250 пг каждого образца геномной ДНК.

Данные генотипирования анализировали статистическими методами. Первой целью этого анализа было выявление возможного ингибирующего эффекта лизирующего буфера при сравнении разведений геномной ДНК в воде и лизирующей смеси.

После этого рассчитывали завершенность и соответствие для профилей, сгенерированных из DEPAarray™-извлеченных популяций клеток и из

эквивалентного количества соответствующей геномной ДНК, как описано выше. Рассчитанные величины сравнивали статистически для определения надежности метода генетического анализа в отношении DEPAarray™-извлеченных клеток.

В заключение оценивали значимость различий между профилями двойных аликвот для определения повторяемости стандартного судебно-медицинского анализа на одних и тех же популяциях клеток, выделенных системой DEPAarray™, и воспроизводимости этих результатов.

Реакции количественного определения ДНК методом ПЦР в реальном времени проводили с использованием системы Plexor¹ HY System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) и ставили на системе 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Как и прежде, все параметры реакции ПЦР устанавливали в соответствии с методом, аккредитованным в R.I.S. [ISO/IEC 17025]. Для каждого клеточного лизата ставили по три технических параллельных эксперимента; параллельно проводили количественную оценку для разбавлений геномной ДНК. Для каждого клеточного лизата количество ДНК рассчитывали путем умножения средней концентрации образца в параллельных опытах на объем клеточного лизата; ожидаемое количество ДНК определяли путем умножения количества выделенных клеток на типичное содержание ДНК в клетке человека (6.6 пг на диплоидную и 3.3 пг на гаплоидную клетку). Полученные данные подвергали тройной статистической обработке. Первая оценивала отсутствие ингибирующего эффекта лизирующей смеси на количественную реакцию. Затем измеренное в клетках количество ДНК сопоставляли сначала с ожидаемым, а потом с количеством геномной ДНК, измеренным для соответствующих разбавлений, чтобы определить надежность количественной оценки ДНК на клетках, отсортированных по методу DEPAarray™.

Значимость различий между наборами данных оценивали по двустороннему парному двухвыборочному t -тесту; корреляцию количественных данных определяли с использованием корреляционного теста Пирсона (2-стороннего). В обоих тестах значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

2.3. Анализ образцов из материалов судебного дела

Четыре образца, относящихся к случаям изнасилований (ID судебного дела: СТ), были отобраны R.I.S. для тестирования системой DEPAarray™ в соответствии с рассмотренным рабочим процессом. Улики представляли собой небольшие порции трех разных вагинальных мазков (ID улики: 7A, 7B, 7C) и лоскут ткани, срезанный с женских брюк (ID улики: 3.1). Демонстрационные фотографии приведены в Приложении, рис. S2.

Полные образцы вагинальных мазков и брюки хранили, соответственно, при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и комнатной температуре до стандартной судебно-медицинской экспертизы; оставшиеся части хранили при комнатной температуре.

Таблица 3

Схемы извлечения клеток системой DEPAarray™ для количественной оценки. В таблице приведены общее количество чистых клеток, извлеченных с помощью технологии DEPAarray™ для каждой биологической жидкости, адсорбированной на тампонах, и тип генетического анализа (количественная оценка или количественная оценка из тех же продуктов лизиса). Также указаны код и пол донора.

Жидкость	ID донора	Пол	Количество	Генетический анализ
Сперма	D2	XY	20	определение количества (сплит А клеточного лизата) + генотипирование (сплит В клеточного лизата)
			5	определение количества
			10	определение количества
			41	определение количества
			83	определение количества
Слюна	D3	XX	20	определение количества (сплит А клеточного лизата) + генотипирование (сплит В клеточного лизата)
			5	определение количества
			10	определение количества
			41	определение количества
			83	определение количества
Кровь	D6	XX	20	определение количества (сплит А клеточного лизата) + генотипирование (сплит В клеточного лизата)
			5	определение количества
			10	определение количества
			41	определение количества
			83	определение количества

В целом до анализа DEPArray™ улики хранились в среднем 160 дней (min = 125, max = 256).

Большинство головок тампонов ранее уже были использованы R.I.S. для проведения стандартных судебно-медицинских процедур с целью идентификации преступника: Hexagon OBTI (Bluestar¹ Forensic, Монте-Карло, Монако) [27] для подтверждения наличия человеческой крови; RSID™- спермы (Independent Forensics, Lombard, IL, С.Ш.А.) [28] и PSA тест (PSA-check-1, VEDA lab, Cerisè, Франция) [29] для идентификации спермы. Вагинальные мазки подвергали процедуре дифференциальной экстракции ДНК (Differex System, Promega, Мэдисон, Висконсин, С.Ш.А.), которые сгенерировали единый мужской профиль и профиль жертвы женского пола [30]. Поскольку улика 3.1 предположительно содержала только мужскую сперму, дифференциальную экстракцию не применяли; в результате генетического анализа был получен мужской профиль хорошего качества (Table 4).

Мелкие порции каждой улики подготавливали для экспериментов с DEPArray™, как описано выше для образца спермы/слюны, поскольку, как отмечалось ранее, СК экспрессируются также в клетках, происходящих из эпителия влагалища. Лоскут ткани брюк был измельчен до начала обработки. Каждую клеточную суспензию анализировали, как описано выше; референсные профили, полученные с помощью стандартного анализа, были использованы для определения завершенности и соответствия профилей, полученных из выделенных клеток.

3. Результаты

3.1. Анализ модельных образцов биологического происхождения для судебно-медицинской экспертизы

Для всех десяти образцов смешанного типа DEPArray™ – анализ позволил корректно идентифицировать каждый ожидаемый тип клеток. Такие факторы, как соотношение объемов жидкостей, общее число детектируемых клеток и условия хранения образца, не препятствовали идентификации и изоляции клеток. Эпителиальные клетки и лимфоциты были идентифицированы во всех смесях слюны/крови, также как сперматозоиды и эпителиальные клетки во всех смесях спермы/слюны (Рис. 1.). После идентификации программой CellBrowser™, изо всех смесей было выделено точное количество чистых клеток каждого типа; количество извлеченных клеток варьировалось в зависимости от общего числа детектированных клеток и их целостности.

В целом было выделено 708 чистых клеток, из них 58 единичных клеток, 5 популяций по 5 клеток, 10 популяций по 10 клеток, 7 популяций по 25 и 50 клеток; для простоты мы излагаем данные, относящиеся к популяциям по 5, 10 и 25 клеток из одного промежутка (5-25 клеток). На рис. 2 показаны образцы извлеченных чистых клеток каждого типа, выраженные как процентное отношение к общему числу клеток, выделенному из каждого образца; полные данные приведены в табл. S1 Приложения.

Более подробно, из пяти тампонов с образцами слюны/крови были выделены популяции чистых WBCs (n = 27) и эпителиальных клеток (n = 23). Общее число клеток, выделенных из одного тампона, варьировалось от 10 до 86 для WBCs и от 5 до 90 для эпителиальных клеток. Аналогично из пяти тампонов спермы/слюны были выделены популяции чистых сперматозоидов (n = 17) и эпителиальных клеток (n = 20). В этом случае число извле-

Таблица 4

Список улик биологического происхождения. Обзор улик по случаю изнасилования, включенных в настоящее исследование. Указаны время хранения, результаты подтверждающих тестов и информация о референсных профилях. Для улики 3.1 не проводили анализ PSA-check-1 (na = не применяли).

Код дела	ID улики	Материал	Срок хранения [дни]	Hexagon OBTI	RSID™_сперма	PSA-check-1	Референсный профиль
СТ	7А	Порция вагинального мазка	125	–	+	+	Профиль жертвы/мужчины, полученный путем дифференциальной экстракции
	7В	Порция вагинального мазка	130	–	+	+	Профиль жертвы/мужчины, полученный путем дифференциальной экстракции
	7С	Порция вагинального мазка	256	–	+	+	Профиль жертвы/мужчины, полученный путем дифференциальной экстракции
	3.1	Лоскут ткани женских брюк	129	–	+	na	Получен мужской профиль

ченных клеток на тампон варьировалось в пределах от 15 до 64 сперматозоидов и от 3 до 65 эпителиальных клеток.

Популяции клеток (n = 16) и единичные клетки (n = 23), выделенные из четырех тампонов, двух образцов спермы/слюны и двух - слюны/крови, были генотипированы. Независимо от типа исходного образца, условий хранения (4 °C vs RT) и типа клеток (WBC, эпителиальные клетки или сперма), 77.8% (n = 9) из 5 - 25-клеточных популяций и 100% (n = 7) из 50-клеточных популяций показали, по меньшей мере, один аллель.

Из образцов, хранившихся при 4 °C, рассчитанная завершенность профиля варьировалась от 85.1% для 5-25 популяций (n = 4) до 95.8% для 50-клеточных популяций (n = 4); все популяции (n = 8) показали 100% соответствие выявленных аллелей.

Средняя завершенность профиля, рассчитанная для образцов, хранившихся при комнатной температуре, составляла 82.1% для малых клеточных популяций (5 - 25, n = 3) и 97.7% для 50-клеточных популяций (n = 3). Совпадение аллелей для этих же образцов составляло 95.0% и 91.8%, соответственно.

Приведенные выше результаты суммированы на Рис. 3, на котором показаны популяции выделенных клеток в интервалах 5 - 25 и 50 с условиями их хранения, но безотносительно типа клеток. Полные данные по генотипированию приведены в Таблице S2 Приложения.

В целом, данные генотипирования показывают полное совпадение генетических профилей, полученных из популяций чистых клеток, выделенных системой DEPArray™, с соответствующими референсными профилями, полученными из ДНК доноров, что еще раз подтверждает корректность идентификации, отбора и изоляции различных типов клеток, присутствующих в образцах смешанного типа (Рис. 4 и 5).

87% выделенных единичных клеток (n = 23) показали, по меньшей мере, один аллель и среднее число зарегистрированных аллелей, равное 13.0 (SD = 5.7). Профиль, полученный из единичных клеток, показал в среднем 46.6% завершенность и 93.9% среднее соответствие. Полные данные приведены в Таблице S3. Пример профиля генотипирования, полученного из единичного сперматозоида, показан на Рис. S3 Приложения.

3.2. Методическое охарактеризование генетического анализа клеток, извлеченных с помощью DEPArray™

Популяции с точным числом клеток и соответствующими разведениями геномной ДНК в воде или лизирующей смеси были амплифицированы и проанализированы, как описано выше; оценивалась их завершенность и соответствие vs референсных профилей.

Популяции из 10-клеток показали в целом среднюю завершенность 93.8% и в 97.9% среднее соответствие. Для разбавлений геномной ДНК 66 пг и 33 пг такой же анализ дал значения 89.9% и 100.0%, для геномной ДНК, разбавленной водой и лизирующей смесью, соответственно. Двойные алиquotы 20-клеточных лизатов, отправленные на генотипирование, показали в среднем 94.6% завершенность и 99.4% соответствие. Завершенность и соответствие профилей, полученных из двойных алиquot с 132 пг и 66 пг разбавлениями геномной ДНК, составили в среднем 77.8% и 100.0% для геномной ДНК, разведенной в воде, 85.1% и 99.5% для геномной ДНК, разведенной в лизирующей смеси.

При сравнении условий тестов между ними не было выявлено значимых различий (Табл. S4 Приложения). Подробные данные приведены в

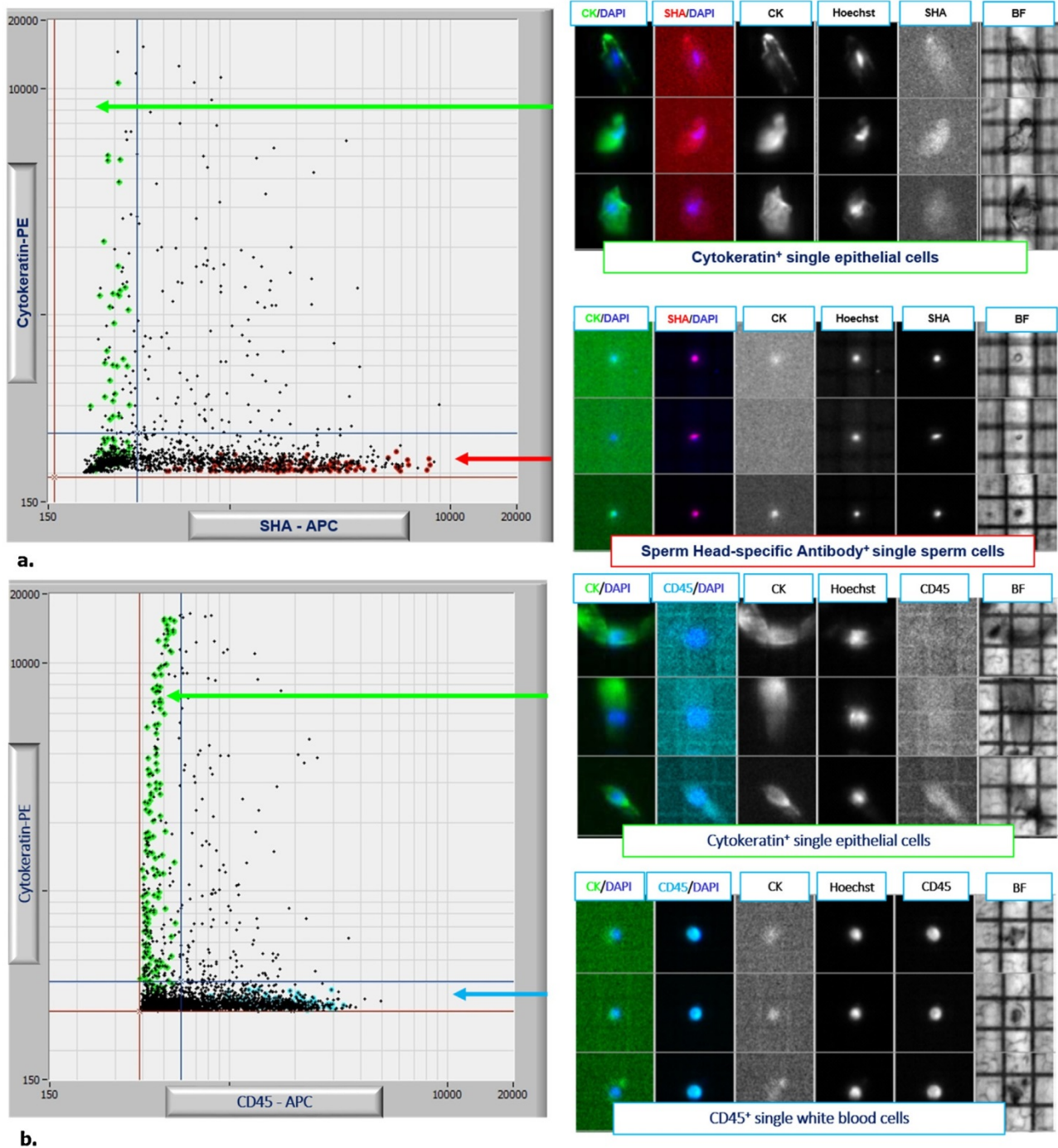


Рис. 1. DEPArray™ анализ, основанный на графиках рассеяния и изображениях. Идентификация двух четких клеточных популяций, присутствующих в модельной смеси, основана на специфической экспрессии антигена и морфологии клетки. Для образцов сперма/слюна (а) цитокератин-позитивные (СК) и позитивные в отношении специфического для головки сперматозоида антигена (SHA) клеточные популяции гейтируются на графике рассеяния по средней интенсивности СК-PE относительно средней интенсивности SHA-APC. После гейтирования можно объединить изображения индивидуальных событий с целью отбора чистых клеток-мишеней для извлечения; для образцов слюна/кровь (б) цитокератин-позитивные (СК) и CD45 позитивные популяции клеток гейтируются на графике рассеяния по средней интенсивности СК-PE относительно средней интенсивности CD45-APC. На обоих графиках рассеяния черные точки обозначают невыбираемые события, тогда как зеленые (ЕС), красные (SC) или голубые (WBC) точки соответствуют идентифицированным клеткам-мишеням. Приведены изображения чистых единичных клеток для каждого типа образцов (фотографии справа, увеличение 20х). На первых двух изображениях показано наложение псевдоцветов соответствующих изображений, их черно-белые изображения в разных каналах приведены справа (PE, Hoechst, APC) наряду с фотографией в проходящем свете (BF) для дальнейшего изучения морфологии клетки. В проходящем свете видны электроды с шагом 20 мкм; они могут выступать удобными стандартами при определении линейных параметров клетки. Очень слабый сигнал, выведенный для ЕСs при SHA окрашивании (а, верхняя правая панель), связан с полнодинамическим просмотром изображения.

Таблицах 5 и 6. Для просмотра примеров полученных генетических профилей см. Рис. 6, а также Рис. S4 и S5 Приложения.

Количественная оценка разбавлений геномной ДНК методом ПЦР в реальном времени на образцах, разведенных водой или лизирующей смесью, не выявила значительных различий между ними (Таблица 7). Не было обнаружено значительных различий и между количеством ДНК, измеренном в клеточных популяциях, и количеством ДНК, ожидаемым или измеренным

в соответствующих им образцах разбавленных геномных ДНК. Более того, все наборы данных показали значительную линейную корреляцию (тест Пирсона $R^2 > 0.90$, значение $p\text{-value} < 0.05$ – Табл. 7).

Достоверность генотипирования и количественного анализа одних и тех же лизатов 20-клеточных популяций показана в Таблице 8. Результаты, полученные на двойных аликвотах спермы и белых клеток крови, были близки или превысили ожидаемое количество ДНК. Для эпителиальных

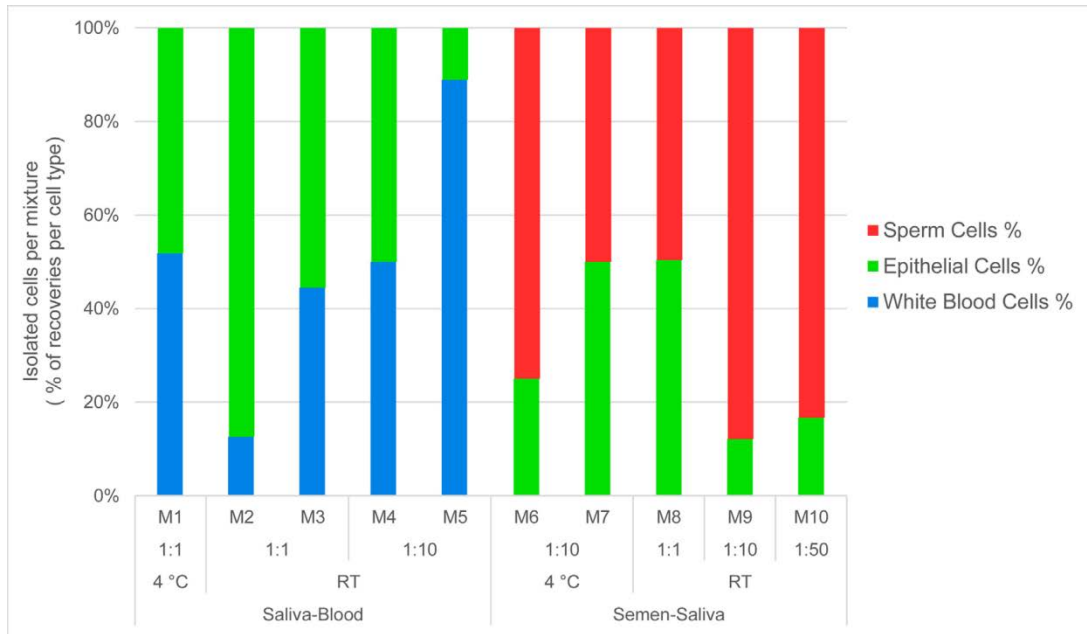


Рис. 2. Обзор чистых клеток, выделенных из модельных образцов с помощью DEPAarray™. На гистограмме показано процентное содержание чистых сперматозоидов, эпителиальных или белых клеток крови, извлеченных методом DEPAarray™ анализа каждого модельного образца слюна/кровь и сперма/слюна. Указаны также соотношение жидкостей и температура хранения. RT = комнатная температура; M1–M10 = ID образцов.

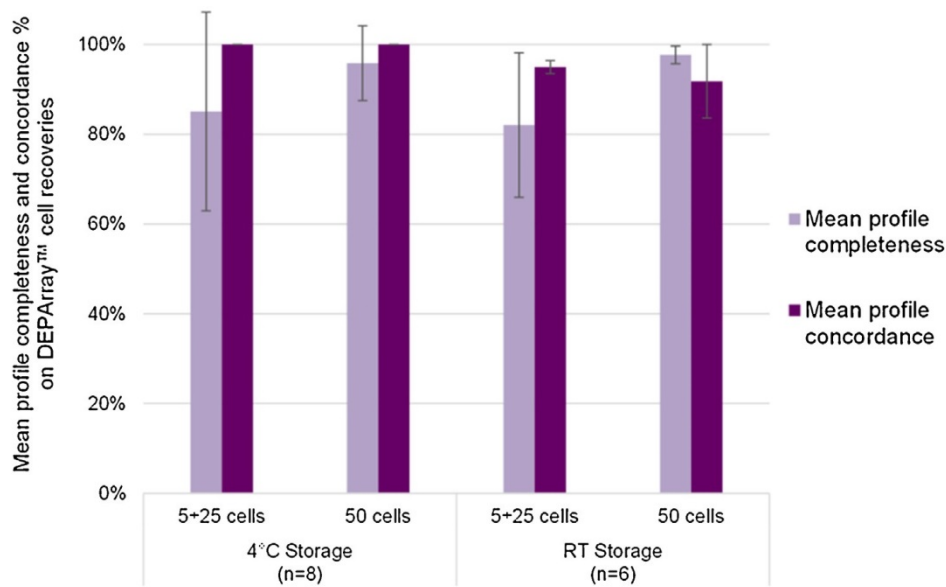


Рис. 3. Результаты генотипирования DEPAarray™ выделенных чистых клеток. Средняя завершенность и соответствие профилей (в %), полученных с помощью набора для амплификации AmpFLSTR¹ NGM SElect™ PCR Amplification Kit из популяций гомогенных клеток, извлеченных из модельных образцов смешанного типа, адсорбированных на тампоны. RT = комнатная температура. Планка погрешностей показывает стандартное отклонение.

альных клеток, наоборот, содержание ДНК, измеренное в одной из парных аликвот, было выше ожидаемого; с другой стороны, завершенность профиля в соответствующей парной аликвоте было ниже ожидаемого и приведенного выше. Отклонения от ожидаемого, по-видимому, компенсируется между парными аликвотами, на подготовку которых могла повлиять ошибка пипетирования.

3.3. Анализ образцов из судебных дел

С помощью технологии DEPAarray™ из небольших порций улики, собранных для судебного дела об изнасиловании, были

идентифицированы и выделены клетки спермы и эпителия (Рис. 7; Рис. S6 Приложения). Описанный рабочий процесс позволил идентифицировать типы клеток, присутствовавших в образцах трех вагинальных мазков, и выделить их как чистые клетки.

Из образца 7А выделена популяция из 11 клеток спермы, популяция из 6 клеток спермы из образца 7В, и популяция из 5 клеток спермы из 7С. В качестве контроля были извлечены также популяции эпителиальных клеток: всего 50, 30 и 75 клеток для каждого образца.

Лоскут ткани брюк (ID улики: 3.1) оказался более сложным для анализа по сравнению с вагинальными мазками из-за большого количества неспецифических частиц, которые могут быть принесены нитями, высвобождаемыми из ткани при приготовлении образцов (Рис. S7 Приложения).

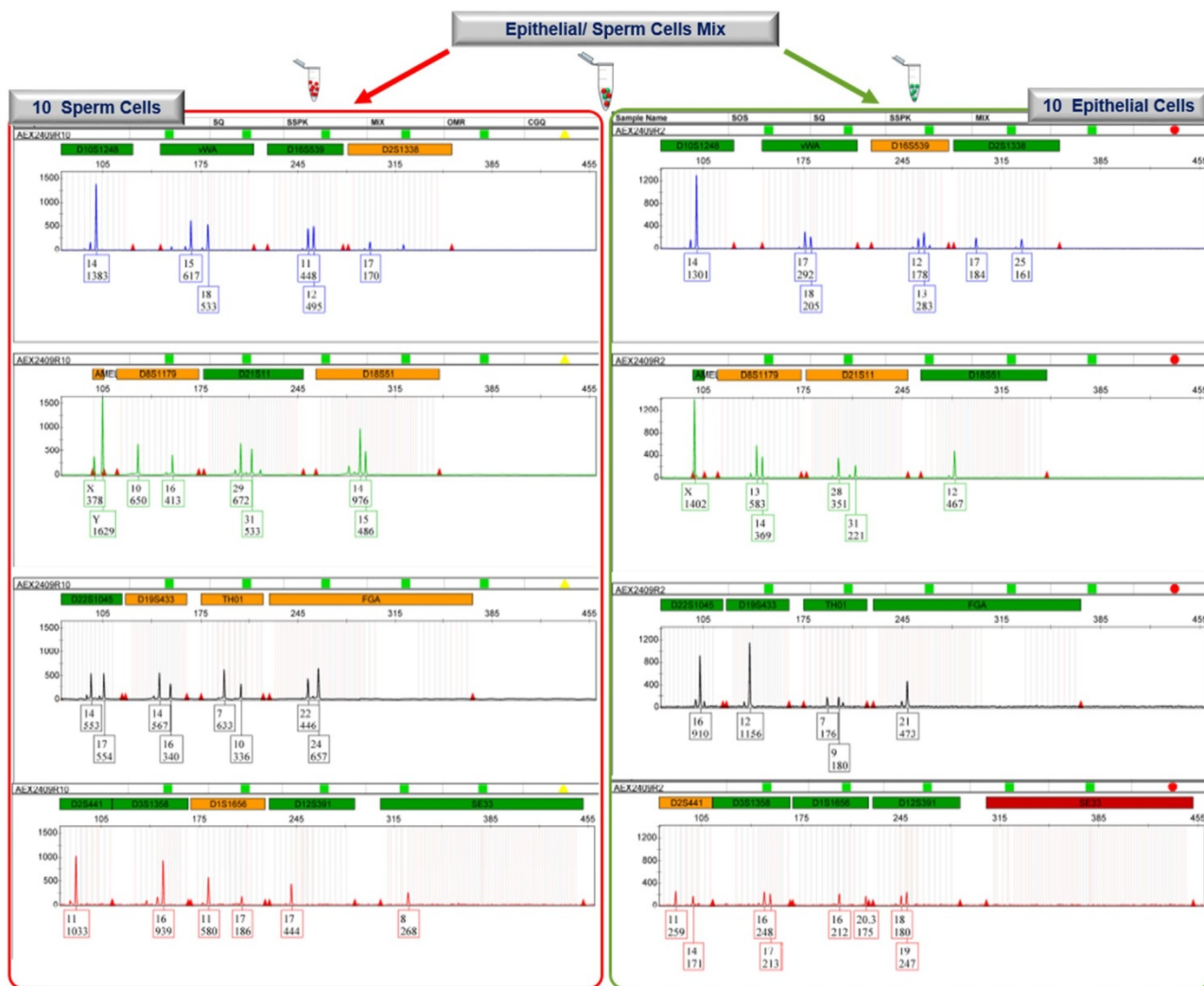


Рис. 4. Амплификация чистых клеток спермы и эпителиальных клеток, выделенных системой DEPAray™ из образца сперма/слина с помощью AmpFLSTR¹ NGM Select™. На рисунке показаны примеры профилей генотипирования, полученных из популяций 10 чистых клеток спермы (слева) и 10 чистых эпителиальных клеток (справа), извлеченных из модельного образца сперма/слина с помощью технологии DEPAray™. Рассчитанные завершенность и соответствие профилей равны 93.3% и 93.3% для популяции клеток спермы и 96.2% и 89.3% для эпителиальных клеток.

Однако график рассеяния, сгенерированный программой CellBrowser™, а также индивидуальная проверка каждого объекта позволили идентифицировать и выделить чистые искомые клетки среди всех неспецифических частиц. Более подробно, кластеры, составленные одной эпителиальной клеткой и одним сперматозоидом, распознавались благодаря иммунофлуоресцентному окрашиванию и морфологии, тогда как нити не были четко идентифицируемыми, поскольку проявлялись в виде беспорядочной автофлуоресценции на всех каналах, и у них не наблюдалось определенной морфологии, как показано на Рис. S7. Дополнительные сложности, связанные с этим образцом, не потребовали использования добавочных инструментов или вмешательств, поскольку визуальная проверка каждого индивидуального объекта легко выявляла все эти признаки. Подробнее, 20 клеток спермы были извлечены в виде одной популяции, тогда как 45 эпителиальных клеток были выделены в виде отдельных популяций (n = 1 популяция из 25; n = 2 популяция по 10 клеток).

Общее число клеток, выделенных системой DEPAray™ из каждой из 4-х улик, приведено на Рис. 8 (расширенный список извлеченных клеток дан в Таблице S5). Завершенность генетических профилей 11 клеток спермы, выделенных из тампона 7A, составляла 51.5% от ожидаемого числа аллелей и 78.8% для 5 сперматозоидов, выделенных из образца 7C; соответствие для них определялось как 70.8% и 100% (Среднее= 85.4%; SD=20.6%). Амплификация не удалось на 6 сперматозоидах, полученных с тампона 7B. Выделенные эпителиальные

клетки показали в среднем 87.1% завершенность (SD = 6.0%) и 100% соответствие.

20 сперматозоидов, выделенных из лоскута ткани брюк 3.1, показали 45.5% завершенность профиля и 100% соответствие; в популяциях эпителиальных клеток, выделенных из той же улики, или не выявили ни одного аллеля, или один, соответственно, они были забракованы для последующего изучения. Полные данные изложены в Таблице 9. Примеры электрофореграмм спермы и популяций эпителиальных клеток, выделенных из биологических вещественных доказательств, показаны на Рис. 9. и Рис. S8 Приложения.

4. Обсуждение

Результаты настоящего исследования убедительно показывают, что технология DEPAray™ обладает значительным потенциалом для судебно-медицинской экспертизы, особенно при решении проблемы биологических образцов смешанного типа.

В предыдущих работах для этой же цели оценивали разные подходы, такие как FACS или LCM [10,8]. Результаты, полученные с помощью FACS, отягощены невозможностью достичь полной чистоты большинства выделенных клеточных популяций. Помимо этого, у технологии FACS существует внутреннее ограничение, связанное с относительно высоким порогом минимального количества клеток [10], необходимых для проведения разделения. LCM иногда используют в судебно-медицинских лабораториях для выявления клеток спермы в

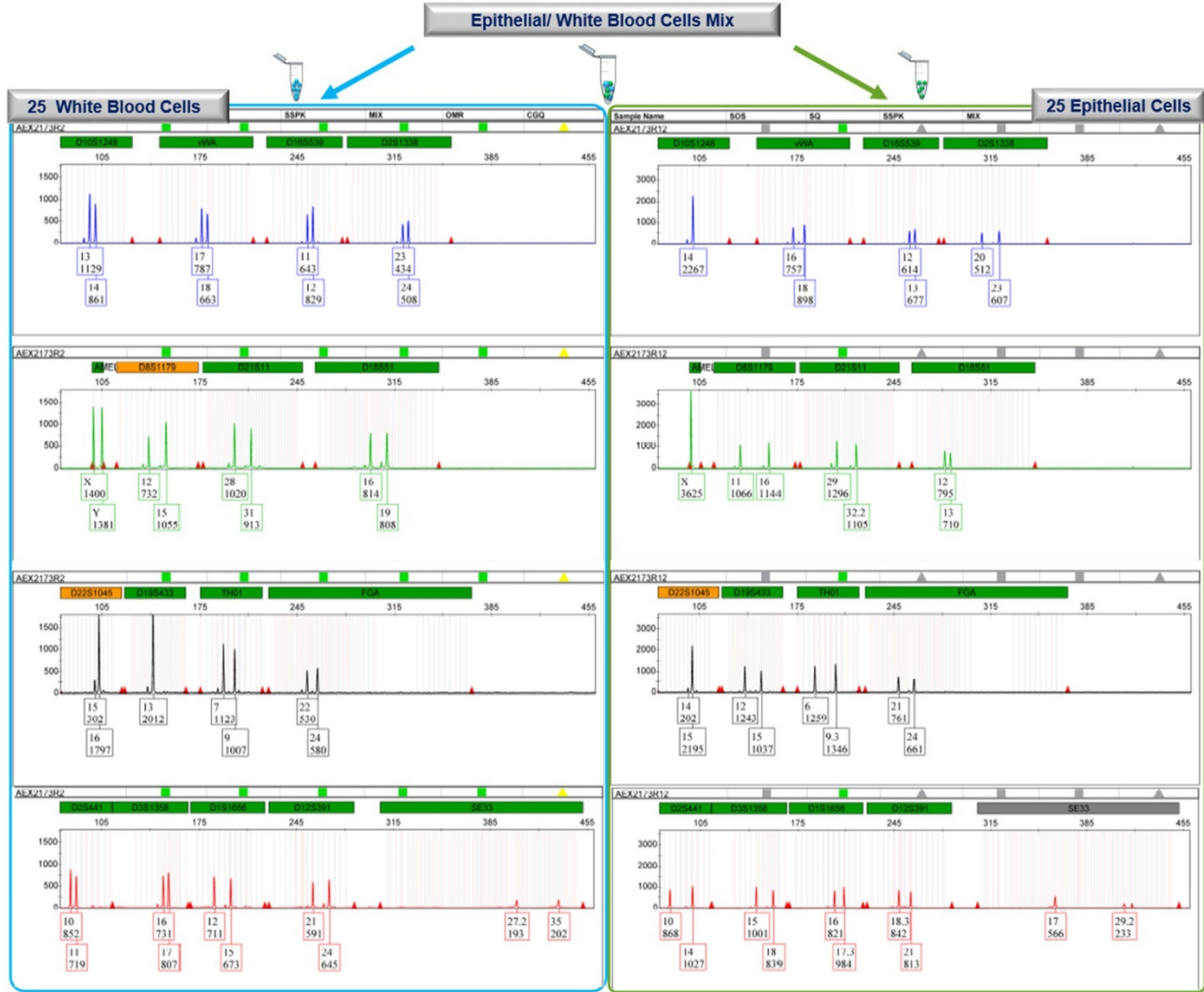


Рис. 5. AmpFLSTR1 NGM SElect™-амплификация чистых белых клеток крови и эпителиальных клеток, выделенных с помощью технологии DEPAggy™ из образца кровь/слина. На рисунке показаны электрофореграммы, полученные при генотипировании популяций из 25 белых клеток крови (слева) и 25 эпителиальных клеток (справа). На обоих клеточных популяциях получена 100.0% завершенность и соответствие профилей.

случаях изнасилований, их наличие является решающим для подтверждении полового акта. Технология LCM, однако, обладает неотъемлемой вариабельностью, обусловленной отсутствием надежной автоматизированной процедуры, что делает ее жестко зависимой от оператора как на этапе отбора, так и извлечения клеток [8]. Оценивали также и другие подходы для идентификации и выделения чистых клеток для генетического анализа, однако ни один из них не продемонстрировал удовлетворительных результатов [31].

Преимущество системы DEPAggy™ состоит в автоматизации процессов сканирования изображений, детекции и выделения нужных клеток, которые требуют лишь малого участия пользователя, оставляя окончательное решение по отбору клеток квалификации и опыту оператора. В этом отношении базовая биологическая подготовка, такая, как и для других клеточных исследований, использующихся в судебно-медицинской экспертизе (например, Christmas Tree Staining) служит достаточной основой; после минимального обучения на системе DEPAggy™ оператор-судмедэксперт может быстро стать экспертом по этой технологии. К тому же использование рабочего процесса DEPAggy™ дает возможность одновременно идентифицировать клетки и проводить генетический анализ, начиная с одного и того же очищенного образца, преодолевая, таким образом, рассмотренные выше ограничения.

В первом наборе тестов, проведенных в настоящем исследовании, было установлено, что рабочий процесс DEPAggy™ позволяет одновременно достоверно идентифицировать разные типы клеток, присутствующие

в образцах, и выделить их в гомогенные группы чистых клеток. Система DEPAggy™ также продемонстрировала возможность корректной работы независимо от разнообразия биологических жидкостей, типов и количества клеток, условия хранения образцов.

Надежность системы DEPAggy™ уже была подробно описана [11,15,18]: она объединяет возможности выявления и выделения чистых клеток среди тысяч примесей с точностью до единичной клетки и доказанной чистотой.

Для изучения возможности применения этой технологии в новой области было прослежено и получено на четырех модельных образцах совпадение между генетическими профилями отобранных и выделенных клеток и профилями соответствующих доноров. Это также подтвердило точность отбора клеток, проводимого на основе сигналов иммунофлуоресценции, и, следовательно, специфичности и чувствительности антител, использованных для меченя специфичных для типа клеток антигенов.

Завершенность и соответствие профилей, полученных из 50-клеточных популяций, всегда приближались к 100%. Средняя завершенность профилей сохраняла высокую степень и для меньших популяций клеток (5–25), и она уменьшалась до 82%, только если исходные образцы хранили при комнатной температуре: эти результаты ожидаемы, поскольку менее берегающее хранение (комнатная температура), влияющее в основном на целостность клеток, было направлено на имитацию условий сбора улики на месте преступления. Интересно, что среднее соответствие на более мелких популяциях было все еще близко к 100%. Эти данные могут указывать, что информативный профиль можно полу-

Таблица 5

Результаты AmpFLSTR¹ NGM SElectTM-амплификации на DEPAgгауTM-клеточных популяциях и разведениях геномной ДНК. В таблице показаны средние проценты совпадения и завершенности профилей, рассчитанные для 10 выделенных клеток и эквивалентных количеств соответствующей геномной ДНК, полученной путем разбавления водой или лизирующей смесью. n = число повторений.

Тип клетки/разбавление геномной ДНК	ID донора	n	Ожидаемое число аллелей	Выявленное число аллелей	Усредненная завершенность профиля	S.D.	Усредненное соответствие профиля	S.D.
10 клеток		8	31	29	93.8%	5.2%	97.9%	4.7%
Клетки спермы		2	31	27	87.0%	5.2%	100.0%	0.0%
	D1	1	30	25	83.3%		100.0%	
Эпителиальные клетки	D2	1	32	29	90.6%		100.0%	
		3	30	30	94.4%	2.2%	95.6%	7.7%
	D1	1	30	28	93.3%		100.0%	
	D2	1	32	31	96.9%		100.0%	
Белые клетки крови	D3	1	28	30	92.9%		86.7%	
		3	31	31	97.8%	1.9%	98.9%	1.9%
	D4	1	30	29	96.7%		100.0%	
	D5	1	32	32	100.0%		100.0%	
ДНК-эквивалент 10 клеток (вода)	D6	1	31	31	96.8%		96.8%	
		8	31	28	89.9%	11.7%	100.0%	0.0%
33 пг геномной ДНК		2	31	23	72.8%	10.2%	100.0%	0.0%
	D1	1	30	24	80.0%		100.0%	
	D2	1	32	21	65.6%		100.0%	
66 пг геномной ДНК		6	31	29	95.7%	3.9%	100.0%	0.0%
	D1	1	30	27	90.0%		100.0%	
	D2	1	32	30	93.8%		100.0%	
	D3	1	28	27	96.4%		100.0%	
	D4	1	30	30	100.0%		100.0%	
	D5	1	32	30	93.8%		100.0%	
ДНК-эквивалент 10 клеток (лизирующая смесь)	D6	1	31	31	100.0%		100.0%	
		8	31	27	88.8%	11.8%	100.0%	0.0%
33 пг геномной ДНК, лизирующая смесь/DTT		2	31	23	72.7%	5.6%	100.0%	0.0%
	D1	1	30	23	76.7%		100.0%	
	D2	1	32	22	68.8%		100.0%	
66 пг геномной ДНК, лизирующая смесь		6	31	29	94.1%	7.1%	100.0%	0.0%
	D1	1	30	28	93.3%		100.0%	
	D2	1	32	28	87.5%		100.0%	
	D3	1	28	28	100.0%		100.0%	
	D4	1	30	30	100.0%		100.0%	
	D5	1	32	32	100.0%		100.0%	
ДНК-эквивалент 10 клеток (лизирующая смесь)	D6	1	31	26	83.9%		100.0%	
		8	31	27	88.8%	11.8%	100.0%	0.0%

чить из меньшего числа аллелей, если они происходят из единственного источника ДНК.

Следует отметить, что генетические данные из DEPAgгауTM-выделенных клеток были получены нестандартно: вместо того, чтобы извлечь ДНК из тампонов, неповрежденные клетки сначала собирают, сортируют с помощью технологии DEPAgгауTM и лизируют методом одной пробирки, который высвобождает ДНК и делает ее доступной для ПЦР реагентов. В связи с этим была проведена специальная серия экспериментов с целью демонстрации достоверности и надежности генетических данных, полученных из DEPAgгауTM-выделенных клеток.

Набор DEPAgгауTM LysePrep, использованный для высвобождения ДНК из чистых клеток, не имел никакого ингибирующего влияния ни на реакцию генотипирования, ни на количественное определение ДНК; данный метод одной пробирки, позволяющий избежать потерь образца, представляет собой удобную альтернативу стандартным методам.

Надежность профилирования ДНК, полученной из точного количества клеток, верифицировали, сравнив с эквивалентным количеством экстрагированной геномной ДНК (стандартный процесс); профили, полученные всего из 10 клеток, продемонстрировали удивительную завершенность и соответствие даже на гаплоидных клетках. Сходным образом, не было обнаружено значительных различий в количественной оценке ДНК лизированных клеток и эквивалентного количества геномной ДНК, показавших линейную корреляцию.

Помимо этого стандартная методика повторного генотипирования одного образца и количественной оценки ДНК для определения точного количества, которое будет использовано для генотипирования, успешно воспроизводилась и на DEPAgгауTM-выделенных клетках. Полученные

результаты предполагают, что если для генотипирования брать известное количество клеток, то можно пропускать этап количественного определения ДНК, рассчитав его по точному числу клеток, выделенных в каждой популяции.

Таким образом, клетки, отобранные и выделенные с помощью технологии DEPAgгауTM, являются удобным исходником для наборов для идентификации и количественной оценки ДНК человека, обычно применяющихся в судебно-медицинской экспертизе, и обеспечивают достоверные результаты без существенных отличий от тех, что можно ожидать при использовании соответствующих количеств экстрагированной ДНК.

Все рассмотренные выше данные предполагают, что рабочий процесс DEPAgгауTM можно успешно применять для реальных биологических образцов смешанного типа для выделения чистых клеток и получения чистого профиля каждого донора. Чтобы изучить эту возможность, с применением описанного рабочего процесса были проанализированы фрагменты четырех уликов, относящихся к случаю изнасилования. С помощью стандартных экспертиз уже был получен мужской профиль, на который указывало наличие клеток спермы; исходя из этого, образцы, представляющие положительный контроль, тестировали для проверки способности рабочего процесса DEPAgгауTM успешно справляться с реальными судебно-медицинскими случаями.

Во всех образцах, независимо от существенных различий между ними, были обнаружены и выделены отдельно клетки спермы и эпителиальные клетки, и их профили совпадали (среднее соответствие 95.8% для клеток, извлеченных из мазков, и 100% для клеток, извлеченных из лоскута ткани брюка) с референсными профилями, подтверждая, что идентификация и разделение клеток произведены точно.

Таблица 6

Результаты генотипирования на равных двойных аликвотах из выделенных лизатов DEPAtraу™-выделенных клеток и разведений геномной ДНК. В таблице показаны средние проценты завершенности и соответствия профилей, рассчитанных для двойных аликвот, полученных из сплитов 20-клеточного лизата и из эквивалентных количеств геномной ДНК, разведенных водой или лизирующей смесью; n = число повторений.

Тип клетки/ разведение геномной ДНК донора	ID	Сплит лизата	n	Число ожидае- мых аллелей	Число обнаруженных аллелей	Средняя завершенность профиля	St. Dev.	Среднее соответствие профиля	St. Dev.
Двойные аликвоты 20-клеточных лизатов (10-клеточный эквивалент)			16	31	29	94.6%	10.0%	99.4%	1.3%
Клетки спермы			4	31	26	82.2%	13.3%	99.2%	1.6%
	D1	1	1	30	21	70.0%		100.0%	
		2	1	30	27	90.0%		100.0%	
	D2	1	1	32	23	71.9%		100.0%	
		2	1	32	32	96.9%		96.9%	
Эпителиальные клетки			6	30	30	97.4%	5.0%	98.9%	1.8%
	D1	1	1	30	30	100.0%		100.0%	
		2	1	30	30	96.7%		96.7%	
	D2	1	1	32	32	100.0%		100.0%	
		2	1	32	28	87.5%		100.0%	
	D3	2	1	28	29	100.0%		96.6%	
		1	1	28	28	100.0%		100.0%	
Белые клетки крови			6	31	31	100.0%	0.0%	100.0%	0.0%
	D4	1	1	30	30	100.0%		100.0%	
		2	1	30	30	100.0%		100.0%	
	D5	1	1	32	32	100.0%		100.0%	
		2	1	32	32	100.0%		100.0%	
	D6	1	1	31	31	100.0%		100.0%	
		2	1	31	31	100.0%		100.0%	
Двойные аликвоты геномной ДНК, эквивалентные 20-клеткам (вода)			16	31	24	77.8%	26.9%	100.0%	0.0%
66 пг геномной ДНК				31	21	67.9%	17.7%	100.0%	0.0%
	D1	1	1	30	16	53.3%		100.0%	
		2	1	30	28	93.3%		100.0%	
	D2	1	1	32	21	65.6%		100.0%	
		2	1	32	19	59.4%		100.0%	
132 пг геномной ДНК				30	25	81.1%	29.2%	100.0%	0.0%
	D1	1	1	30	27	90.0%		100.0%	
		2	1	30	27	90.0%		100.0%	
	D2	1	1	32	14	43.8%		100.0%	
		2	1	32	4	12.5%		100.0%	
	D3	1	1	28	28	100.0%		100.0%	
		2	1	28	28	100.0%		100.0%	
	D4	1	1	30	30	100.0%		100.0%	
		2	1	30	30	100.0%		100.0%	
	D5	1	1	32	16	50.0%		100.0%	
		2	1	32	28	87.5%		100.0%	
	D6	1	1	31	31	100.0%		100.0%	
		2	1	32	31	100.0%		100.0%	
Двойные аликвоты геномной ДНК, эквивалентные 20-клеткам (лизирующая смесь)			16	31	26	85.1%	21.0%	99.5%	1.9%
66 пг геномной ДНК, лиз. DTT				31	19	58.5%	28.1%	98.1%	3.8%
	D1	1	1	30	26	80.0%		92.3%	
		2	1	30	22	71.0%		100.0%	
	D2	1	1	32	21	65.6%		100.0%	
		2	1	32	5	17.2%		100.0%	
132 пг геномной ДНК, лиз. смесь				30	29	93.9%	6.5%	100.0%	0.0%
	D1	1	1	30	25	83.3%		100.0%	
		2	1	30	29	96.7%		100.0%	
	D2	1	1	32	30	93.8%		100.0%	
		2	1	32	32	100.0%		100.0%	
	D3	1	1	28	26	92.9%		100.0%	
		2	1	28	28	100.0%		100.0%	
	D4	1	1	30	24	80.0%		100.0%	
		2	1	30	27	90.0%		100.0%	
	D5	1	1	32	32	100.0%		100.0%	
		2	1	32	31	96.9%		100.0%	
	D6	1	1	31	30	96.8%		100.0%	
		2	1	32	30	96.8%		100.0%	



Рис. 6. AmpFLSTR¹ NGM SElectTM амплификация DEPAggyTM- выделенных клеток и разведенной геномной ДНК. Профили генотипирования получены для популяции из 10 клеток спермы и эквивалентного количества соответствующей геномной ДНК (33 пг, разведение водой), показано 100% соответствие и 83.3% и 80.0% завершенность. Пунктирными квадратами отмечены отброшенные аллели, выявленные при сравнении с референсным профилем (данные не приведены).

Таблица 7

Статистическая обработка результатов Plexog HY¹ количественного анализа методом ПЦР в реальном времени популяций клеток и соответствующих разведенной геномной ДНК. Количество ДНК рассчитывали для точного числа (5; 10; 41; 83) DEPAggyTM выделенных и лизированных сперматозоидов, эпителиальных клеток и белых клеток крови, и эквивалентных количеств соответствующей геномной ДНК, разбавленной водой или лизирующей смесью, методами двустороннего парного двухвыборочного *t*-теста и корреляционного теста.

	Парный <i>t</i> -тест	Корреляционный тест Пирсона	
2			
Сравнение набора данных	значение <i>p</i>	R	значение <i>p</i>
Разбавления геномной ДНК водой vs разбавления геномной ДНК лизирующей смесью			
вода – лизирующая смесь/DTT	0.546	0.963	0.019
вода - лизирующая смесь	0.489	0.998	0.001
Ожидаемое vs наблюдаемое количество клеточной ДНК			
Клетки спермы	0.608	0.946	0.005
Эпителиальные клетки	0.376	0.881	0.018
Белые кровяные клетки	0.648	0.947	0.005
Извлечения клеток vs разведенной геномной ДНК лизирующей смесью			
SCs-гДНК в лиз. смеси/DTT	0.290	0.940	0.031
EPs-гДНК в лиз. смеси	0.225	0.907	0.048
WBCs – гДНК в лиз. смеси	0.455	0.930	0.035

Таблица 8

Параллельный количественный анализ методом ПЦР в реальном времени на Parallel Plexog HY¹ и AmpFLSTR¹ NGM SElectTM -амплификация из одной популяции DEPAggyTM -выделенных клеток. Н = Гаплоидные; D = Диплоидные. Ожидаемое количество ДНК оценивалось как количество клеток (20 клеток/2 двойные аликоты = 10 клеток) * типичное количество ДНК в клетке человека (6.6 пг и 3.3 пг на гаплоидную клетку).

Сплит А: количественная оценка			Сплит В: генотипирование		
Клеточный лизат	Плоидность клетки	Ожидаемое к-во ДНК [пг]	Наблюдаемое к-во ДНК [пг]	Завершенность профиля	Совпадение профиля
Двойные аликоты 20 клеточных лизатов (эквивалент 10 клеточных)					
SCs	H	33.0	39.6	90.9%	90.9%
EPs	D	66.0	101.7	63.0%	100.0%
WBCs	D	66.0	58.4	96.8%	96.8%

Технология DEPAggyTM впервые позволила полностью разделить клетки двух доноров, присутствующих в биологическом образце, со 100% точностью и чистотой.

Оказалось, что описанный рабочий процесс работает независимо от различий между модельными образцами и реальными, подтверждая свою надежность. В качестве примера: только остаточное количество уликов, являющихся частью вещественных доказательств по реальному делу, было доступно для анализа, который последовательно выявлял небольшие количества клеток-мишеней при каждом прогоне DEPAggyTM. Более того, срок хранения образца (в среднем 160 дней) и условия хранения (-20°C без криоконсервации) были менее сохраняющими, чем использованные в первом наборе экспериментов.

Для некоторых популяций извлеченных клеток завершенность профилей была ниже, чем наблюдалась в модельных образцах, и для двух клеточных популяций не удалось получить профили. Сниженная завершенность профилей или невозможность проведения ПЦР, выявленная для нескольких популяций эпителиальных клеток, может быть обусловлена большей склонностью эпителиальных клеток к деградации по сравнению с клетками спермы. Однако все популяции эпителиальных клеток, которые не удалось амплифицировать, были получены с лоскута ткани брюк.

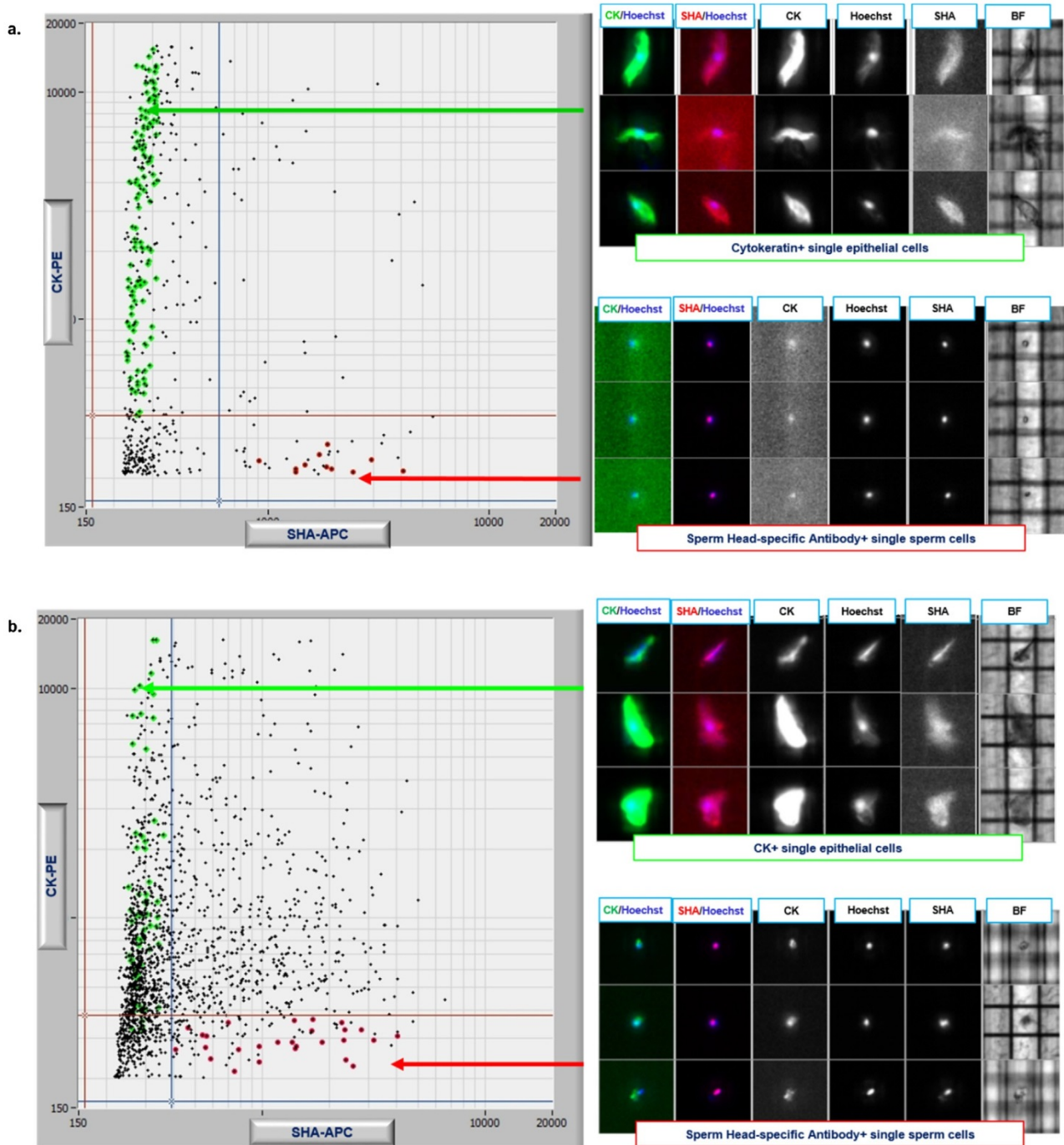


Рис. 7. Анализ биологических вещественных доказательств DEPArray™ –системой на основании графиков рассеяния и изображений. Идентификация цитокератин (CK)-положительных эпителиальных клеток и позитивных по специфичному для головки сперматозоида антигену (SHA) клеток спермы из небольшой части вагинального мазка (а.) и мелко резаных кусочков ткани женских брюк (б.), соответственно, остаточные фрагменты улики 7С и 3.1. Черные точки на обоих графиках рассеяния соответствуют невыбранным событиям, тогда как зеленые (EC) или красные точки (SC) – это идентифицированные клетки-мишени. Показаны типичные изображения чистых единичных клеток: для каждой улики (фотографии справа, увеличение 20х). Первые два изображения слева – наложения псевдоцветов соответствующих изображений, приложены черно-белые изображения тех же клеток на разных каналах флуоресценции (PE, Hoechst and APC), наряду с изображением в проходящем свете (BF), для последующей оценки морфологии клетки. В проходящем свете видны электроды с шагом 20 мкм; они могут выступать удобными стандартами при определении линейных параметров клетки. Очень слабые сигналы, выведенные для ECs при SHA окрашивании (а и б, верхняя правая панель) и для SCs при CK окрашивании (б. нижняя правая панель), связаны с полнодинамичным просмотром изображения.

Считалось, что это загрязнение состоит только из спермы и, следовательно, оно не подвергалось дифференциальной экстракции. В результате анализа был получен чистый мужской профиль без примеси женского. Эти два наблюдения вместе могут свидетельствовать о том, что ДНК эпителиальных клеток, выделенная из лоскута ткани, намного более сомнительна и, скорее всего, имеет другое происхождение, чем клетки, выделенные из вагинальных мазков, которые к тому же пока-

ли более высокую завершенность профилей даже из сходного числа объединенных в популяцию клеток. Неудача проведения ПЦР на шести популяциях сперматозоидов может быть отнесена к стохастическим эффектам, которые могут возникать в случае очень небольших количеств деградированной ДНК. С другой стороны, еще одним преимуществом предлагаемого рабочего процесса является то, что клетки эффективно промывают в чистом буфере в DEPArray™ в ходе сортировки, таким образом удаляются потенциальные

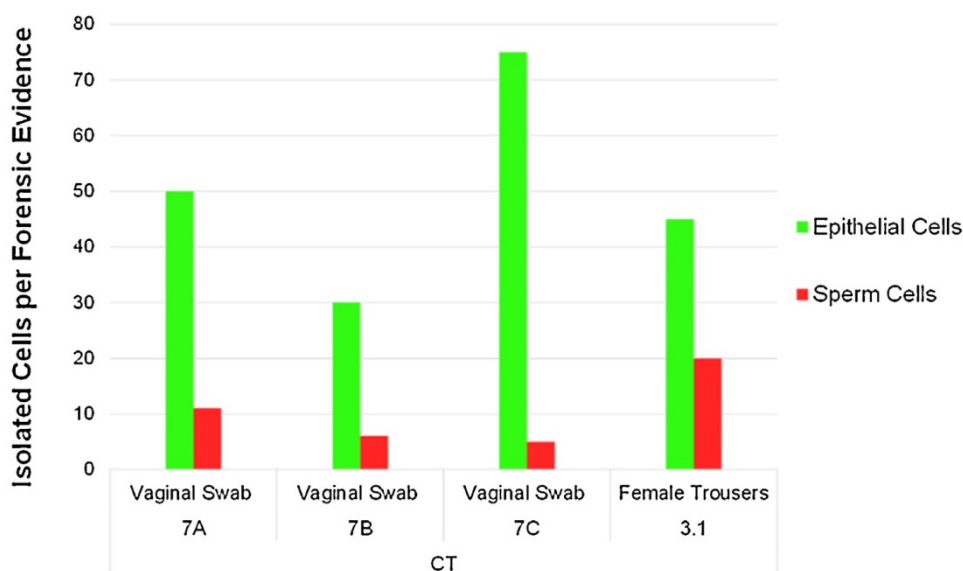


Рис. 8. Клетки, извлеченные DEPAgra™ системой из биологических вещественных доказательств судебных расследований. Общее количество чистых спермиев и эпителиальных клеток, выделенных с помощью технологии DEPAgra™ из трех вагинальных мазков и лоскута брюк, относящихся к судебному расследованию по случаю изнасилования.

Таблица 9

Анализ улики по судебному расследованию случая изнасилования (СТ). Результаты генотипирования, DEPAgra™-выделенных чистых клеток. Для каждой небольшой доли образца в таблице приведены средние значения (в процентах) соответствия и завершенности профилей, рассчитанные относительно чистых клеток спермы и эпителиальных клеток, выделенных системой DEPAgra™ из биологических вещественных доказательств и затем проанализированных с помощью набора для амплификации AmpFLSTR¹ NGM SElect™ PCR Amplification Kit. Для популяции из 25 эпителиальных клеток, извлеченных из улики 3.1 и показавших только один аллель, совпадение профиля не рассчитывали (na = не применяли).

Улики	Тип клетки	Кол-во клеток	Кол-во извлеченный	Извлечения клеток с регистрацией аллелей Φ 1	% извлеченных клеток с регистрацией аллелей Φ 1	Среднее число аллелей	St. Dev.	Средняя завершенность профиля	St. Dev.	Среднее совпадение профиля	St. Dev.
Вагинальные мазки 7A		8	3	7	87.5%	26.4	1.9	80.8%	14.2%	95.8%	11.0%
	SCs	11	1	1	100.0%	24.0		51.5%		70.8%	
	ECs	25	2	2	100.0%	25.5	0.7	82.3%	2.3%	100.0%	0.0%
7B		6	2	1	0.0%	0.0					
	SCs	6	1	0	0.0%	0.0					
	EPs	30	1	1	100.0%	26.0		83.9%		100.0%	
7C		5	3	3	100.0%	26.0		78.8%		100.0%	
	SCs	5	1	1	100.0%	26.0		78.8%		100.0%	
	EPs	25	1	1	100.0%	29.0		93.5%		100.0%	
Женские брюки 3.1		50	1	1	100.0%	29.0		93.5%		100.0%	
	SCs	4	4	2	50.0%	15.0	19.8	45.6%	59.9%	100.0%	0.0%
	EPs	20	1	1	100.0%	15.0		45.5%		100.0%	
3.1		10	2	0	0.0%	0.0					
	EPs	10	2	0	0.0%	0.0					
		25	1	1	100.0%	1.0		3.2%		na	

загрязнения или ингибиторы ПЦР, как показано по сопоставимости с чистыми разведениями геномной ДНК.

Как предполагается в статье, разделение биологического образца на отсортированные популяции гомогенных клеток требует, чтобы каждый иммунофенотип соответствовал только одному индивиду. Поскольку это часто доказывается в судебных делах, здесь продемонстрировано, что описанный подход является базовым и может быть распространен на выделения и генотипирования единичных клеток, поскольку значимые профили могут быть получены из единичных диплоидных или даже гаплоидных клеток с ДНК адекватного качества. Дальнейшие исследования позволят полностью описать эту возможность.

Однако уже ясно, что рабочий процесс на основе технологии DEPAgra™ может достичь высочайшей точности в цифровом разделении единичных клеток от разных индивидов из биологических образцов смешанного происхождения, таким образом удовлетворив требование по гомогенности генотипов для клеток с данным иммунофенотипом.

Настоящая работа впервые представляет применение DEPAgra™ технологии в области судебно-медицинской экспертизы, что достигнуто в основном на модельных образцах и на нескольких примерах из судебных дел. Очевидно, что необходимо валидационное исследование на значительно большем наборе улики биологического происхождения: такая работа начата в отделе научных исследований итальянской полиции (R.I.S Laboratory, Рим,

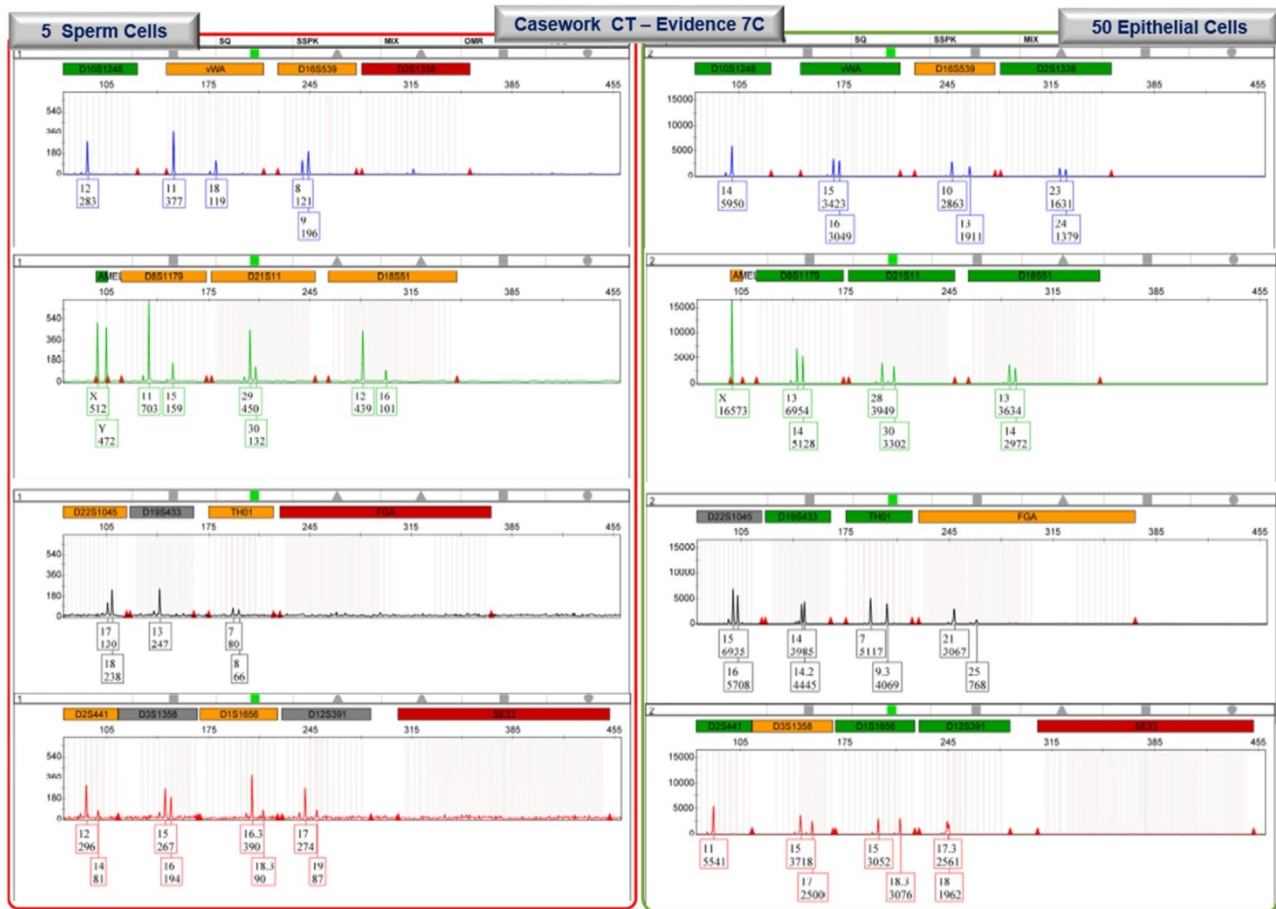


Рис. 9. AmpFLSTR¹ NGM SelectTM амплификация чистых клеток из образцов по судебному делу об изнасиловании СТ. Выше показаны электрофореграммы популяций сперматозоидов и эпителиальных клеток, выделенных с помощью технологии DEPAarrayTM из улики 7С (вагинальным мазок).

Италия), а также в других ведущих судебно-медицинских лабораториях для того, чтобы понять преимущества и применимость предложенного подхода.

5. Выводы

Настоящее исследование показало, что рабочий процесс цифровой сортировки по технологии DEPAarrayTM является удобным решением проблемы биологических образцов смешанного происхождения в судебно-медицинской экспертизе. Технология DEPAarrayTM впервые позволила полностью разделить клетки от двух доноров, присутствующих в биологических образцах из судебного дела, со 100% точностью и чистотой.

Это исследование является пробной разработкой, не претендующей на полную проверку предлагаемого рабочего процесса, поскольку метод еще недостаточно проверен на примерах из судебных дел. Целью этой работы было предварительное изучение возможного применения технологии DEPAarrayTM для нужд судебно-медицинской экспертизы, и она не преследовало цели квалифицировать этот метод как замену всех существующих стандартов. Задача, скорее, состояла в том, чтобы стимулировать более обширную валидацию этого метода и его применимости для возможного разбора случаев, которые невозможно решить с помощью существующих технологий и подходов.

Декларация интересов авторов

FF, GB, RA, GS, MS, AF, RL, GM, GG, NM являются сотрудниками на полной занятости в компании Menarini Silicon Biosystems S.p.A.

Благодарности

Авторы выражают благодарность начальнику итальянской полиции Comando Generale dell'Arma dei Carabinieri за поддержку данного проекта. Также мы выражаем благодарность Елене Бельвакиа за ре-

цензирование статьи и Карле Бенчи за помощь с подготовкой библиографии.

Дополнение А. Приложения

Приложения, связанные с этой статьей, можно найти в онлайн версии по адресу <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.04.023>

Список литературы

- [1] M.A. Jobling, P. Gill, Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nat. Rev. Genet.* 5 (10) (2004) 739–751, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrg1455>.
- [2] P. Gill, H. Haned, O. Bleka, O. Hansson, G. Dørum, T. Egeland, Genotyping and interpretation of STR-DNA: Low-template, mixtures and database matches—Twenty years of research and development, *Forensic Sci. Int. Genet.* 18 (2015) 100–117, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.014>.
- [3] S. Vuichard, U. Borer, M. Bottinelli, C. Cossu, N. Malik, V. Meier, C. Gehrig, A. Sulzer, M.-L. Morerod, V. Castella, Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study, *Invest. Genet.* 2 (2011) 11, doi:<http://dx.doi.org/10.1186/2041-2223-2-11>.
- [4] P. Gill, C.H. Brenner, J.S. Buckleton, A. Carracedo, M. Krawczak, W.R. Mayr, N. Morling, M. Prinz, P.M. Schneider, B.S. Weir, DNA commission of the International society of forensic genetics: recommendations on the interpretation of mixtures, *Forensic Sci. Int.* 160 (2006) 90–101, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.04.009>.
- [5] J. Sutton, The dangers of not assuming contributors. Why the goal of conservative in forensic DNA statistics should be dropped in favor of being informative, 26th International Symposium on Human Identification, Grapevine (TX) 14 October, 2015.
- [6] P. Gill, A.J. Jeffreys, D.J. Werrett, Forensic application of DNA 'fingerprints', *Nature* 12–18 (6046) (1985) 577–599 318.
- [7] P. Gill, D.J. Werrett, B. Budowle, R. Guerrieri, An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases—joint considerations of the DNA

- working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), *Sci. Justice* 44 (2004) 51–53.
- [8] M. Vandewoestyne, D. Deforce, Laser capture microdissection in forensic research: a review, *Int. J. Leg. Med.* 124 (2010) 513–521, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00414-010-0499-4.
- [9] L. Dean, Y.J. Kwona, M.K. Philpott, C.E. Stanciu, S.J. Seashols-Williams, T. Dawson Cruz, J. Sturgill, C.J. Ehrhardt, Separation of uncompromised whole blood mixtures for single source STR profiling using fluorescently-labeled human leukocyte antigen (HLA) probes and fluorescence activated cell sorting (FACS), *Forensic Sci. Int.: Genet.* 17 (2015) 8–16, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.003.
- [10] T.J. Verdon, R.J. Mitchell, W. Chen, K. Xiao, R. van Oorschot, FACS separation of non-compromised forensically relevant biological mixtures, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 14 (2015) 194–200, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.019.
- [11] B. Polzer, G. Medoro, S. Pasch, F. Fontana, L. Zorzino, A. Pestka, U. Andergassen, F. Meier-Stiegen, Z.T. Czyz, B. Alberter, S. Treitschke, T. Schamberger, M. Sergio, G. Bregola, A. Doffini, S. Gianni, A. Calanca, G. Signorini, C. Bolognesi, A. Hartmann, P.A. Fasching, M.T. Sandri, B. Rack, T. Fehm, G. Giorgini, N. Manaresi, C.A. Klein, Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention, *EMBO Mol. Med.* 30 (11) (2014) 1371–1386, doi:http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201404033.
- [12] M.G. Krebs, R.L. Metcalf, L. Carter, G.F.H. Brady Blackhall, C. Dive, Molecular analysis of circulating tumor cells- biology and biomarkers, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11 (3) (2014) 129–144, doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrcli-nonc.2013.253.
- [13] D.J. Peeters, B. De Laere, G.G. Van den Eynden, S.J. Van Laere, F. Rothé, M. Ignatiadis, A.M. Sieuwerts, D. Lambrechts, A. Rutten, P.A. van Dam, P. Pauwels, M. Peeters, P.B. Vermeulen, L.Y. Dirix, Semiautomated isolation and molecular characterization of single or highly purified tumour cells from cellsearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting, *Br. J. Cancer* 108 (6) (2013) 1358–1367, doi:http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.92.
- [14] C.L. Hodgkinson, C.J. Morrow, Y. Li, R.L. Metcalf, D.G. Rothwell, F. Trapani, R. Polanski, D.J. Burt, K.L. Simpson, K. Morris, S.D. Pepper, D. Nonaka, A. Greystoke, P. Kelly, B. Bola, M.G. Krebs, J. Antonello, M. Ayub, S. Faulkner, L. Priest, L. Carter, C. Tate, C.J. Miller, F. Blackhall, G. Brady, C. Dive, Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer, *Nat. Med.* 20 (8) (2014) 897–903, doi:http://dx.doi.org/10.1038/nm.3600.
- [15] D.E. Campton, A.B. Ramirez, J.J. Nordberg, N. Drovetto, A.C. Klein, P. Varshavskaya, B.H. Friemel, S. Quarre, A. Breman, M. Dorschner, S. Blau, C.A. Blau, D.E. Sabath, J.L. Stilwell, E.P. Kaldjian, High-recovery visual identification and single-cell retrieval of circulating tumor cells for genomic analysis using a dual technology platform integrated with automated immunofluorescence staining, *BMC Cancer* 6 (15) (2015) 360, doi:http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1383-x.
- [16] E. Normand, S. Qdaisat, W. Bi, C. Shaw, I. Van den Veyver, A. Beaudet, A. Breman, Comparison of three whole genome amplification methods for detection of genomic aberrations in single cells, *Prenat. Diagn.* 36 (9) (2016) 823–830, doi:http://dx.doi.org/10.1002/pd.4866.
- [17] C. Bolognesi, C. Forcato, G. Buson, F. Fontana, C. Mangano, A. Doffini, V. Sero, R. Lanzellotto, G. Signorini, A. Calanca, M. Sergio, R. Romano, S. Gianni, G. Medoro, G. Giorgini, H. Morreau, M. Barberis, W.E. Corver, N. Manaresi, Digital sorting of pure cell populations enables unambiguous genetic analysis of heterogeneous formalin-fixed paraffin-embedded tumors by next generation sequencing, *Sci. Rep.* 11 (6) (2016) 20944, doi:http://dx.doi.org/10.1038/srep20944.
- [18] E. Carpenter, J. Rader, J. Ruden, E.F. Rappaport, K.N. Hunter, P.L. Hallberg, K. Krytska, P.J. O'Dwyer, Y.P. Mosse, Dielectrophoretic capture and genetic analysis of single neuroblastoma tumor cells, *Front. Oncol.* 31 (4) (2014) 201, doi:http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00201.
- [19] L. Carter, D.G. Rothwell, B. Mesquita, C. Smowton, H.S. Leong, F. Fernandez-Gutierrez, Y. Li, D.J. Burt, J. Antonello, C.J. Morrow, C.L. Hodgkinson, K. Morris, L. Priest, M. Carter, C. Miller, A. Hughes, F. Blackhall, C. Dive, G. Brady, Molecular analysis of circulating tumor cells identifies distinct copy-number profiles in patients with chemo sensitive and chemo refractory small-cell lung cancer, *Nat. Med.* 23 (1) (2017) 114–119, doi:http://dx.doi.org/10.1038/nm.4239.
- [20] K. Anslinger, B.B. Bayer, B. Rolf, W. Keil, W. Eisenmenger, Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory, *Leg. Med. (Tokyo)* 7 (3) (2005) 164–168, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2005.01.002.
- [21] R. Kishore, W. Reef Hardy, V.J. Anderson, N.A. Sanchez, M.R. Buoncristiani, Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the BioRobot EZ1 and BioRobot M48, *J. Forensic Sci.* 5 (2006) 1055–1061, doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00204.x.
- [22] M. de la Puente, C. Phillips, C. Santos, M. Fondevila, A. Carracedo, M.V. Lareu, Evaluation of the Qiagen 140-SNP forensic identification multiplex for massively parallel sequencing, *Forensic Sci. Int. Genet.* 27 (28) (2017) 35–43, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.01.012.
- [23] A. Holt, S.C. Wootton, J.J. Mulero, P.M. Brzoska, E. Langit, R.L. Green, Developmental validation of the Quantifiler[®] HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 21 (2016) 145–157, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.007.
- [24] P.J. Collins, L.K. Hennessy, C.S. Leibelt, R.K. Roby, D.J. Reeder, P.A. Foxall, Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR identifier PCR amplification kit, *J. Forensic Sci.* 49 (6) (2004) 1265–1277.
- [25] ISO/IEC 17025:2005—Laboratory Accreditation Program—PJLA—http://www.isoiec17025.com/. (Accessed 08/Feb/2017)
- [26] J.G. Shewale, L. Qi, L.M. Calandro, Principles, practice, and evolution of capillary electrophoresis as a tool for forensic DNA analysis, *Forensic Sci. Rev.* 24 (2) (2012) 79–100.
- [27] M.N. Hochmeister, B. Budowle, R. Sparkes, O. Rudin, C. Gehrig, M. Thali, L. Schmidt, A. Cordier, R. Dirnhofer, Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood R, *J. Forensic Sci.* 44 (3) (1999) 597–602.
- [28] B.C. Pang, B.K. Cheung, Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen, *Forensic Sci. Int.* 169 (1) (2007) 27–31 (14).
- [29] M.N. Hochmeister, B. Budowle, O. Rudin, C. Gehrig, U. Borer, M. Thali, R. Dirnhofer, Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid, *J. Forensic Sci.* 44 (5) (1999) 1057–1060.
- [30] K. Yoshida, K. Sekiguchi, N. Mizuno, K. Kasai, I. Sakai, H. Sato, S. Seta, The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen, *Forensic Sci. Int.* 72 (1995) 25–33.
- [31] T. Geng, R. Mathies, Forensic typing of single cells using droplet microfluidics, in: Lu Chang, Scott S. Verbridge (Eds.), *Microfluidic Methods for Molecular Biology*, Springer International Publishing, Cham (Switzerland), 2016, pp. 71–94, doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-30019-1.