

Zaisťovanie dotykových stôp DNA metódou lepiacej pásky

Anotácia: Príspevok je zameraný na možnosti uplatnenia metódy zaisťovania dotykových stôp DNA lepiacou páskou v porovnaní s dvoma bežne používanými metódami zaisťovania, a to zaisťovanie sterom a strihom. Autorky poukazujú na pozitíva a negatíva metódy zaisťovania dotykových stôp DNA lepiacou páskou ako najnovšieho trendu zaisťovania tohto druhu stôp.

Kľúčové slová: zaisťovanie stôp, DNA.

1. Úvod

Pojmom dotyková stopa (resp. touch DNA) je pomenované malé množstvo biologického materiálu obsahujúceho jadrovú DNA, ktoré človek zanecháva na povrchu objektov pri dotyku, resp. inom kontakte nekrytých častí tela s objektom (na obeti, zbrani alebo inom predmete na mieste činu).

Dotyková stopa je v porovnaní s krvou alebo spermou vizuálne, resp. pomocou orientačných skúšok, nedetekovateľná, "neviditeľná". Ide o biologický materiál tvorený uvoľnenými kožnými bunkami z vrchnej vrstvy ľudskej pokožky a epitelialnymi bunkami slizníc.

Úspešnosť izolácie DNA z dotykovej stopy a získania výsledkov (DNA profilu) v nemalej miere závisí od použitia vhodných krokov pri odoberaní stopy, t. j. od využitia vhodnej metódy zaistenia dotykovej stopy. Pri výbere metódy zaisťovania je potrebné zvážiť všetky pozitíva a negatíva vzhľadom na charakter dotykovej stopy a povrchu objektu.

Vo forenzej praxi sú používané štyri typy metód zaisťovania dotykovej DNA:

1. sterom (swabbing method)
2. strihom (cutting method)
3. zoškrabaním (scraping method)
4. lepiacou páskou (tape lift method).

Zaisťovanie dotykových stôp sterom (swabbing method)

Sterom sa zaisťujú dotykové stopy z objektov s tvrdým povrchom (sklo, plast, zbrane, časti vozidiel a pod.). Trením odberovej tyčinky na povrchu objektu sa bunky uvoľňujú a zachytávajú na mikrovláknach tyčinky. Zväčšený aktívny povrch odberovej tyčinky umožňuje zaistenie maximálneho množstva biologického materiálu.

Nevýhody zaisťovania dotykových stôp sterom:

- vonkajšia štruktúra tyčinky neumožňuje uvoľniť všetky zachytené bunky, ktoré sú dôležité pri dotykových stopách,
- relatívne veľký objem odberovej tyčinky čiastočne znemožňuje izoláciu DNA v obmedzenom priestore skúmavky, pričom vznikajú relatívne veľké straty v celkovom množstve zaistenej DNA a znižuje sa pravdepodobnosť úspešnosti izolácie a získania konečných výsledkov.

Zaisťovanie dotykových stôp strihom (cutting method)

Táto metóda zaisťovania dotykových stôp patrí medzi tradičné, najčastejšie využívané metódy. Strihom sa zaisťuje biologický materiál z objektov s mäkkým povrchom (papier, textil, oblečenie a pod.) spolu s povrchovou časťou objektu.¹ Ide teda o čiastočne deštruktívnu metódu, pri ktorej dochádza k zmene pôvodného stavu (vonkajšej štruktúry) objektu.

¹ HOUCH, M., HOUCH, L. *What is touch DNA*. Scientific American. 2008. www.scientificamerican.com

Nevýhody zaisťovania dotkových stôp strihom:

- umožňuje odobrať dotkovú stopu len z relatívne malej plochy objektu (vzhľadom na obmedzenia súvisiace s objemom skúmavky pri izolácii DNA), čím sa znižuje úspešnosť konečného výsledku,
- podkladový materiál, ktorý často obsahuje látky pôsobiace ako inhibítory PCR reakcie, čím výrazne ovplyvňuje úspešnosť amplifikácie a následne získania DNA profilu.

Zaisťovanie dotkových stôp zoškrabaním (scraping method)

Táto metóda je pomerne novou, alternatívnou a menej preferovanou metódou zaisťovania dotkových stôp. Zoškrabaním sa zaisťuje dotková stopa z objektov pomocou skalpela alebo iného ostrého nástroja s čepelou. Pri jej použití sa z objektu získavajú malé častice povrchu spolu s bunkami, ktoré sú ľahko umiestniteľné v skúmavke a ich malý objem zvyšuje úspešnosť priebehu lyzačných a izolačných reakcií.

Zaisťovanie dotkových stôp lepiacou páskou (tape lift method)

Pri použití metódy zaisťovania dotkových stôp lepiacou páskou sa kožné bunky nachádzajúce sa na povrchu objektu zachytia na lepiacu časť pásky. Následne pri lyzácii buniek dochádza k uvoľneniu jadrovej DNA, je teda predpoklad, že maximálne množstvo DNA sa dostane do amplifikačnej reakcie.

Lepiacou páskou sa zaisťujú dotkové stopy z akéhokoľvek povrchu, a preto je možné túto metódu použiť viac-menej neobmedzene. Umožňuje odobrať vzorku z pomerne veľkej plochy povrchu objektu, čím sa výrazne zvyšuje počet odobratých kožných buniek a zároveň sa zvyšuje citlivosť odberu DNA.

Táto metóda patrí medzi nedeštruktívne metódy a v porovnaní s ostatnými metódami umožňuje efektívnejšie zaistenie epiteliálnych buniek z objektu, pričom nedochádza k zmene pôvodného kriminalistického dôkazu.

Napriek uvedeným výhodám sa metóda zaisťovania dotkových stôp lepiacou páskou vyznačuje aj nevýhodami, ako sú ťažkosti pri manipulácii s lepiacou páskou a prípadná inhibícia niektorými zložkami lepidla pri amplifikácii. Riešením problému s manipuláciou môže byť použitie transparentnej fólie (prípadne papiera) ako podkladovej vrstvy pre lepiacu pásku. Inhibícia pri PCR reakcii, ako to vyplýva z výsledkov viacerých výskumov, môže byť potlačená zvolením vhodného objemu vstupujúceho do reakcie.²

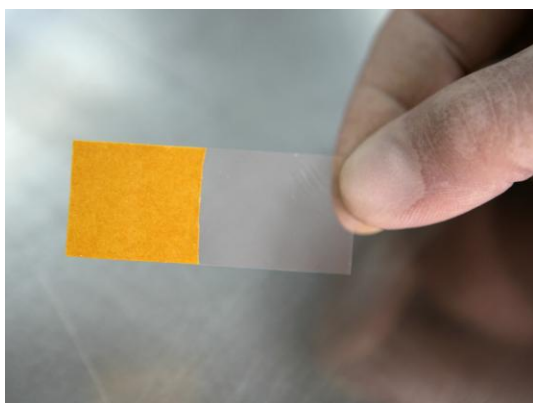
Vzhľadom na to, že metóda zaisťovania dotkovej stopy zoškrabaním sa v našej praxi používa len výnimočne, na porovnanie novej metódy zaisťovania dotkových stôp lepiacou páskou sme zvolili len u nás bežne využívané metódy – sterom a strihom.

2. Materiál a metódy

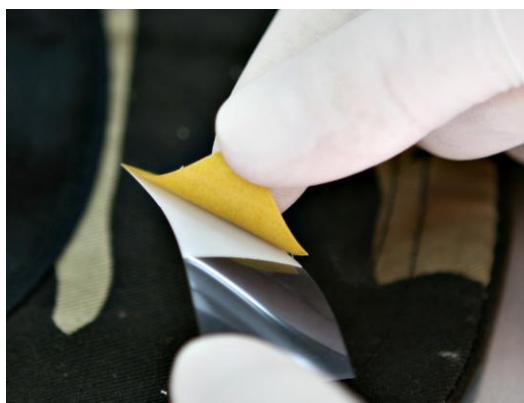
2.1 Príprava lepiacich prúžkov

V sterilnom PCR boxe s laminárnym prúdením vzduchu sme pomocou sterilného skalpela orezali okrajové časti obojstranne lepiacej pásky (Ulith 50 mm). Na strednú časť transparentnej fólie (Hewlett-Packard Copy & Laser Film plain A4 – 210 x 297 mm) sme nalepili cca 20 mm široké pásy lepiacej pásky vzdialené približne 30 mm od seba. Sterilnými nožnicami sme nastrihali lepiace prúžky s lepiacou plochou rozmerov približne 20 x 20 mm (obr. č. 1, 2).

² LI, R. C., HARRIS, H. A. *Using Hydrophilic Adhesive Tape for Collection of Evidence for Forensic DNA Analysis*. J. Forensic Sci., 2003, 48(6), s. 486



Obr. č.1: Lepiace prúžky



Obr. č.2: Lepiaca plocha

2.2 Odoberanie vzoriek dotykovej stopy DNA

Označili sme vhodný počet sterilných 1,5 ml skúmaviek (ependorf). Z pripravených vzoriek (40 ks) sme odobrali požadované množstvo biologického materiálu. Použili sme rôzne typy podkladového materiálu – plast, sklo, textil, kov a drevo. Pri každej vzorke sme podľa podkladového materiálu okrem metódy zaistenia lepiacou páskou použili aj druhú metódu – strihom, resp. sterom na odberovú tyčinku (tab. č.1).

Tab. č. 1: Typy vzoriek a metódy odoberania dotykovej stopy DNA

Typ vzorky		Celkový počet	Metóda lepiacou páskou	Druhá použitá metóda	
				strihom	sterom
Textil	Košeľa	4	4	4	-
	Šiltovka	4	4	4	-
	Rukavice	4	4	4	-
Plast	PC myš	4	4	-	4
	Stôl (drsny povrch)	2	2	-	2
	Pero	2	2	-	2
Drevo	Stôl	2	2	-	2
	Porisko	2	2	-	2
Sklo	Okno	2	2	-	2
	Fľaša	2	2	-	2
Kov	Antikorový stôl	2	2	-	2
	Pracovné kliešte	2	2	-	2
	Náboje	8	4	-	4
Nôž	Drsný povrch	2	2	-	2
	Hladký povrch	2	2	-	2

Pri použití metódy sterom a metódy lepiacou páskou (obr. č. 3, 4) sme odobrali dotykové stopy z plochy cca 20 x 20 mm. Strihom sme odobrali biologický materiál z troch miest s plochou 3 x 3 mm.

Z jednotlivých materiálov sme odobrali vzorky z plôch, pri ktorých bol najvyšší predpoklad výskytu biologického materiálu:

- košeľa – z vnútornej strany goliera,
- šiltovka – z vnútornej strany, z lemu,
- rukavice – z vnútornej strany, z oblasti dlane a ohybu palca,
- PC myš – 4 vzorky z ľavej hornej oblasti a 4 vzorky z dolnej polovice,

- písacie pero – z celého povrchu,
- porisko – z oblasti predpokladaného uchopenia,
- pracovné kliešte – z rukoväte,
- náboj – z celého povrchu,
- nôž – z povrchu rukoväte.



Obr. č.3: Odoberanie dotykovej stopy lepiacou páskou zo šiltovky



Obr. č.4: Odoberanie dotykovej stopy lepiacou páskou z náboja

Odobraté vzorky sme vložili do označených sterilných skúmaviek. Pri použití lepiacich prúžkov sme do skúmavky nastrihali lepiacu časť spolu s transparentnou fóliou (obr. č.5).



Obr. č.5: Spracovanie lepiaceho prúžku

2.3 Izolácia a analýza DNA

Ku každej vzorke v skúmavke sme pridali 180 μ l 5 % vodnej suspenzie Chelex[®] 100 (resin Biotechnology grade, 100 – 200 Mesh, Bio – Rad Laboratories) a 2 μ l proteinázy K (Promega). Vzorky sme inkubovali pri teplote + 56 °C, 60 minút. Po ukončení inkubácie sme vzorky vortexovali vysokou rýchlosťou, cca 10 sekúnd. Ďalej sme inkubovali pri teplote + 100°C, 8 minút. Znova sme vortexovali vysokou rýchlosťou, cca 10 sekúnd. Nakoniec sme vzorky centrifugovali 3 minúty pri 12 000 otáčkach (RPM). Ako negatívnu kontrolu sme izolovali 6 vzoriek nepoužitých lepiacich prúžkov. Polovičné množstvo prúžkov na negatívnu kontrolu (3 ks) sme vyčistili pôsobením UV žiarenia s vlnovou dĺžkou 254 nm, 20 minút v Cross linker.

Určenie množstva a kvality izolovanej DNA sme vykonali metódou real-time PCR použitím kitu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems).

Odoberanie vzoriek dotkových stôp sme vykonali pri laboratórnej teplote v priestoroch obhliadacej miestnosti, použitím čistých separačných pomôcok. Izoláciu DNA sme vykonali v laboratóriu na izoláciu stôp. Prípravu reakčnej platne na kvantifikáciu sme vykonali pri laboratórnej teplote v laboratóriu PCR, v boxe s laminárnym prúdením vzduchu. Všetky úkony sme vykonali za prísneho dodržiavania protikontaminačných opatrení.

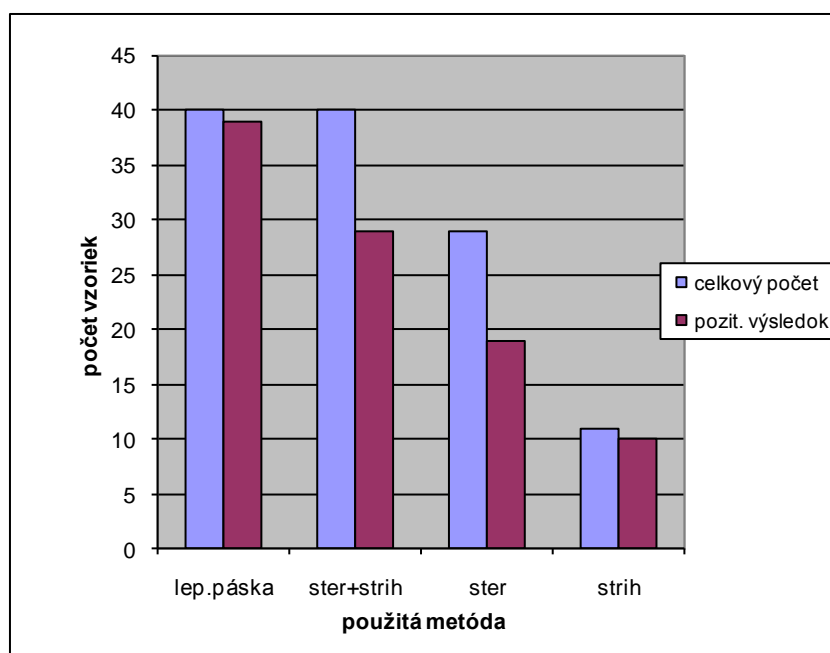
3. Vyhodnotenie

Celkovo sme spracovali 88 vzoriek, z čoho 6 vzoriek tvorilo negatívnu kontrolu a 2 vzorky pozitívnu kontrolu (štandard V s koncentráciou 0,620 ng/μl a štandard VII s koncentráciou 0,068 ng/μl). Za pozitívny výsledok sme pokladali akékoľvek množstvo vyššie ako nulová hodnota (vychádzali sme z predpokladu, že pri dotkových stopách sa na povrchu objektu nachádza minimálne množstvo buniek, a teda aj množstvo prítomnej DNA je v porovnaní s klasickými stopami výrazne nižšie). 68 vzoriek dotkových stôp bolo s pozitívnym výsledkom, čo tvorí 85 % z celkového množstva spracovaných vzoriek.

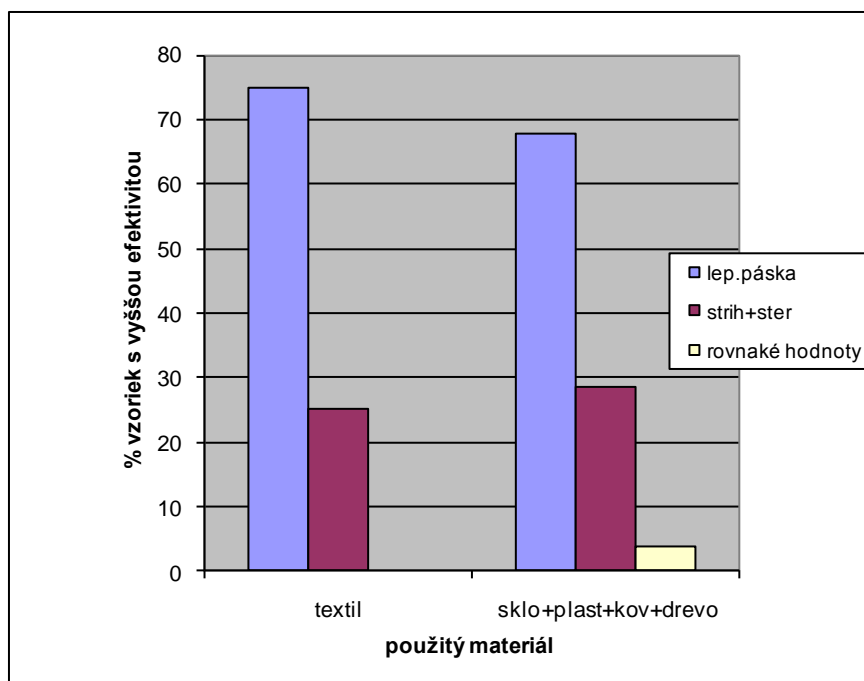
Pri použití metódy odoberania dotkových stôp lepiacou páskou tvorilo pozitívny výsledok 39 vzoriek, teda 97,5 % z celkového množstva takto odobratých vzoriek. Pri použití druhého typu odoberania vzoriek – metódou steru, resp. metódou strihu, tvorili vzorky s pozitívnym výsledkom 72,5 % (29 vzoriek) z celkového počtu takto odobratých vzoriek, pričom pri metóde steru – 64,29 % (18 vzoriek) z celkového počtu 28 vzoriek a pri metóde strihu – 91,67 % (11 vzoriek) z celkového počtu 12 vzoriek (graf č. 1).

V 71,79 % (28 vzoriek) analyzovaných vzoriek bola metóda odoberania dotkovej stopy DNA lepiacou páskou efektívnejšia, pričom priemerne bolo touto metódou zachytené 6,15-násobne väčšie množstvo DNA. V 28,21 % prípadov (11 vzoriek) bolo použitie druhej metódy (metódy steru, resp. strihu) efektívnejšie.

Porovnaním výsledkov kvantifikácie z jednotlivých materiálov sme zistili, že pri objektoch z mäkkých materiálov (textil) bola metóda odoberania dotkových stôp lepiacou páskou efektívnejšia v 9 prípadoch z 12 vzoriek, čo tvorí 75,0 %. Pri tvrdých materiáloch (kov, plast, sklo, drevo) bola táto metóda efektívnejšia v 19 prípadoch z 28 vzoriek, čo tvorí 67,86 % (graf č. 2).



Graf č. 1: Závislosť počtu vzoriek s pozitívnym výsledkom od použitej metódy



Graf č. 2: Efektívnosť použitej metódy v závislosti od použitého materiálu

4. Záver

Kritériom určujúcim efektívnosť jednotlivých metód bolo množstvo DNA získané izoláciou dotkových stôp – porovnaním výsledných hodnôt kvantifikácie DNA.

Celkovo sme spracovali 80 vzoriek dotkových stôp odobratých z rôznych objektov s poréznu a neporéznu povrchovou štruktúrou, z mäkkých a tvrdých materiálov, hladkých a drsných povrchov – textilu, plastu, dreva, kovu a skla. 40 vzoriek dotkových stôp sme odobrali metódou lepiacej pásky a 40 vzoriek použitím druhej metódy – sterom, resp. strihom. Dvojice vzoriek na porovnanie obidvoch metód sme odobrali z tých istých objektov, výnimku tvorili náboje, pri ktorých sme pre ich malý povrch použili jeden náboj pre každú vzorku a zvolenú metódu.

Porovnaním výsledkov sme zistili, že metóda zaistenia dotkových stôp lepiacou páskou bola v 71,79 % vzoriek efektívnejšia ako druhá zvolená metóda, pričom množstvo izolovanej DNA získané pri použití tejto metódy bolo pri daných vzorkách priemerne 6,15-násobne vyššie (min. 1,11-násobne a max. 29,76-násobne vyššie). V 28,21 % prípadov bolo použitie druhej metódy (metódy steru, resp. strihu) efektívnejšie.

Metóda zaistovania dotkových stôp z mäkkých tkanív (košeľa, šiltovka, rukavice, airbag, kukly ...) lepiacou páskou je z troch metód (lepiacou páskou, strihom a sterom) najefektívnejšia.

Metóda lepiacej pásky pri zaistovaní dotkových stôp je však spojená aj s určitými nevýhodami týkajúcimi sa hlavne praktickej manipulácie s lepiacim prúžkom – pri jeho spracovaní do skúmavky a pri izolácii DNA.

V súčasnosti v našej praxi využívame metódu zaistovania dotkových stôp lepiacou páskou z mäkkých tkanív zatiaľ len v laboratórnych podmienkach z dôvodu vzniku novej kontaminácie pri výrobe lepiacich pásov a pri samotnom zaistovaní stôp. A tiež nemáme odskúšané, za aký čas musí byť spracovaná dotková stopa od nanesenia na lepiacu plochu, čiže vznik pôsobenia lepiacej plochy na degradáciu DNA.

Literatúra

HOUCH, M., HOUCH, L. *What is touch DNA*. Scientific American. 2008. Dostupné na internete: <www.scientificamerican.com>

LI, R. C., HARRIS, H. A. Using Hydrophilic Adhesive Tape for Collection of Evidence for Forensic DNA Analysis. In *J. Forensic Sci.*, 2003, 48(6), s. 486.

Key words: touch DNA, tape-lift method

Summary

Touch DNA is usually deposited in smaller amounts than the DNA found in bloodstains or other body fluids; it is more difficult to obtain DNA profiles from touch DNA samples. The key to obtaining successful touch DNA results depend on recognizing items which may be suitable for touch DNA analysis and using the sampling technique that will recover the highest number of skin cells.

We have compared new method of collecting touch DNA (tape lift method) with methods, which we are using in our lab (swabbing and cutting methods). The mini-tapes were manufactured in-house using commercially double-sided adhesive tape (Ulith 50mm) and sheets of laser transparency film (Hewlett-Packard Copy & Laser Film plain A4 – 210 x 297mm).

Totally we have evaluated 80 samples of the touch DNA obtained from different porous and non-porous materials (textile, plastic, wood, glass, metal and knives) – 40 samples were collected by tape lift method and 40 samples were collected by other methods (swabbing or cutting methods), and isolated by chelex method.

The amount of DNA in 71,79 % samples by using tape lift method was at average 6,15 times more than by using other methods of collecting touch DNA (cutting and swabbing methods).

*Ing. Adela Kúdelová
RNDr. Jana Červeňáková
odvetvie kriminalistickej biológie a genetickej analýzy
oddelenie prírodovedného skúmania
odbor prírodovedného skúmania a kriminalistickej
identifikácie Košice
Kriminalistický a expertízny ústav PZ
e-mail: adela.kudelova@minv.sk
jana.cervenakova@minv.sk*

Recenzent: plk. prof. Ing. Václav Krajník, CSc.