

УДК 57.08+543.067:575

І.В. Домбровський, завідувач відділу

Державного науково-дослідного експертно-криміналістичного центру МВС України

А.С. Повх, заступник завідувача лабораторії —

завідувач відділу Державного науково-дослідного експертно-криміналістичного центру МВС України

С.В. Петричук, заступник завідувача лабораторії —

завідувач відділу Державного науково-дослідного експертно-криміналістичного центру МВС України

С.М. Романчук, судовий експерт Державного

науково-дослідного експертно-криміналістичного центру МВС України

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК З ВИКОРИСТАННЯМ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ QUANTIFILER HUMAN ДЛЯ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Наведено результати внутрішньолабораторної валідації методу кількісного та якісного визначення ДНК на приладі 7500 Real Time PCR Systems з використанням набору реагентів Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі, що є специфічним лише для ДНК людини, та принтерних чорнил як інгібітора ДНК. Запропоновано засоби контролю оброблення даних, які запобігають отриманню псевдопозитивних і псевдонегативних результатів та аналітичних помилок і забезпечують максимальний ступінь їх достовірності.

Ключові слова: валідація методу, дезоксирибонуклеїнова кислота, полімеразна ланцюгова реакція.

Приведены результаты внутрилабораторной валидации метода количественного и качественного определения ДНК на приборе 7500 Real Time PCR Systems с использованием набора реагентов Quantifiler Human для ПЦР в реальном времени, что специфично только для ДНК человека, и принтерных чернил в качестве ингибитора ДНК. Предложены средства контроля обработки данных, которые предотвращают получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов исследования и аналитических ошибок и обеспечивают максимальную степень их достоверности.

The results of the method validation in-house of quantitative and qualitative determination of DNA on the instrument 7500 Real Time PCR Systems by the Quantifiler Human reagent kit for the real time PCR, which is specific only for human DNA, and printer ink as a DNA inhibitor, are presented. Data processing control tools are proposed that make it prevent to obtain false

positive and false negative results of research and analytical errors, and provide the maximum degree of their reliability.

З початку 80-х років XX ст. молекулярні технології для аналізу дезоксирибонуклеїнової кислоти (далі — ДНК) призвели до революції в судовій біологічній та судово-медичній експертизах з огляду на те, що біологічні сліди людини, виявлені на місці події, містять у собі цінну для слідства інформацію про злочин. Виявлення полімеразної ланцюгової реакції (далі — ПЛР) дало змогу багаторазово збільшити початкову кількість біоматеріалу, що дозволило ідентифікувати особистість у разі використання лише кількох пікограм геномної ДНК людини.

Уперше склад інгредієнтів, які входять до реакційної суміші для проведення ПЛР, та основні принципи використання праймерів (коротких штучно синтезованих молекул ДНК) для одержання копій ДНК було описано Кліппом (Kleppe) у 1971 році. Однак тоді ще не йшлося про основну рису ПЛР — експонентне збільшення кількості копій фрагмента вихідної ДНК як результат реакції. Це було здійснено у 1985 році на фірмі Cetus.

Про ефективне використання для ПЛР у реальному часі набору реагентів Quantifiler Human ще у 2005 році повідомила група американських учених на чолі з Робертом Гріном з наукової лабораторії компанії Applied Biosystems [1]. Нині більшість судово-біологічних лабораторій світу, у тому числі й України, використовують цей набір у щоденній практиці.

Лабораторія, яка проводить такі дослідження, повинна мати експериментальний доказ придатності методики, яку використовують, для вирішення поставлених завдань, що може бути підтверджено результатами валідації методу дослідження. Валідація (validation) — це набір процедур або дій, спрямованих на підтвердження та наведення доказів (за допомогою об'єктивних свідчень, математичних методів, вимірювань) того, що метод, процес, обладнання, діяльність або система дійсно призводять до очікуваних результатів [2].

Валідацію проводять згідно з чинною нормативною базою, дотримуючи основних її етапів та методології власне самого процесу валідації [3, 4, 5]. Повнота та якість проведення валідації безпосередньо залежить від професійних знань і практичного досвіду аналітика, який її проводить. А отже, обмін досвідом у цій сфері є важливою передумовою забезпечення якості роботи вимірювальних і випробувальних лабораторій.

Метою статті саме і є висвітлення результатів проведеної валідації.

Матеріали та методи

Валідацію методу проводили на приладі 7500 Real Time PCR Systems фірми Applied Biosystems, США [6] згідно з вимогами, рекомендованими Науковою робочою групою методів ДНК-аналізу (SWGDM) [4]. Під час дослідження тестували набір реагентів для ПЛР у реальному часі Quantifiler Human, спеціально розроблений для кількісного та якісного визначення геномної ДНК людини [1, с. 1, 7]. Прилад 7500 PCR Real Time та набір реагентів Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі в комплексі створюють систему, яку далі у статті для зручності опису досліджень названо системою 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human.

Об'єктами для дослідження були:

– розчин стандартної ДНК, яка входить до складу набору;

- ДНК A9947;
- геномна ДНК людини;
- стандарти ДНК NIST 2391b.

Приготування реакційної суміші ПЛР, стандартів ДНК і ДНК NIST 2391b проводили згідно з відповідними протоколами [7; 8]. Геномну ДНК було виділено зі зразка крові людини загальноприйнятим методом з використанням іонообмінної смоли Chelex 100 [9, с. 47].

Для кожного досліджуваного кількість аналітичних (дублювання реакційних лунок) і біологічних (дослідження у різні дні) повторів була індивідуальною. Дослідження та аналіз результатів проводили з використанням програмного забезпечення HID Real-Time PCR Analysis Software v.1.1 [10]. Основним критерієм оцінки отриманих результатів було значення граничного циклу C_t , що характеризує певний цикл ПЛР, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції порівняно з базовим рівнем (загалом C_t — це параметр, від якого вираховують усі кількісні показники отриманих результатів досліджень). Одержані результати вважали статистично достовірними при похибці $P < 0,05$. Статистичний аналіз здійснювали з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel.

Усі реагенти та обладнання, використані у цьому методі, пройшли перевірку якості QA/QC [11].

Визначення точності та достовірності системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human

Для визначення точності та достовірності показника C_t стандартну ДНК, яка мала вихідну (початкову) концентрацію 200 нг/мкл, готували у восьми розведеннях — від максимальної (50 нг/мкл) до мінімальної (0,023 нг/мкл) концентрації, як зазначено у протоколі [7]. Для кожної отриманої концентрації ДНК проводили ПЛР у реальному часі. Було здійснено три аналітичних і чотири біологічних повтори. Показник C_t обчислювали за кількістю пробігів (реакцій). Стандартне відхилення системи розраховували від загальних отриманих значень усіх концентрацій.

Для визначення точності та достовірності показника концентрації ДНК у системі досліджували контрольну ДНК A9947 у двадцяти повторах: чотирьох аналітичних і п'яти біологічних. Середнє значення та похибку концентрації ДНК A9947 розраховували виходячи із загальної кількості результатів повторів реакцій. Відхилення у визначенні концентрації розраховували у відсотках (%).

Визначення чутливості системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human

Контрольну ДНК A9947 титрували з бідистильованою деіонізованою водою у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 та проводили ПЛР у реальному часі для кожного розведення — загалом у трьох аналітичних і п'яти біологічних повторах.

Моделювання процесу інгібування ПЛР у реальному часі

Як інгібітори використовували принтерні чорнила HP № 21/27/56/58/85/88 Black Color Way (Китай) з різними титрами розведення. Принтерні чорнила попередньо п'ятикратно розводили та титрували з бідистильованою деіонізованою водою у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128. Після цього до кожного титру додавали геномну ДНК так, щоб концентрація ДНК у кожному розведенні дорівнювала 0,1 нг/мкл. Як контрольний використовували розчин ДНК без інгібіторів. Для кожного зразка проводили ПЛР у реальному часі. До кожної проби

(реакційної суміші) вносили по 2 мкл суміші «принтерні чорнила + ДНК». Дослідження проводили у трьох аналітичних і трьох біологічних повторах.

Приготування зразків деградованої ДНК

Концентрація геномної ДНК, визначена шляхом проведення ПЛР у реальному часі, становила 0,9 нг/мкл.

Деградацію ДНК було змодельовано шляхом застосування впливу високої температури. Для досягнення деградації від помірного до найвищого ступеня змінювали час впливу температури: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 та 90 хв. Отриману геномну ДНК проаліквотили у 27 пробірок по 10 мкл. Серію таких проб інкубували на водяній бані при температурі $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кожні 10 хв виймали по три пробірки, відразу додавали 90 мкл охолодженої бідистильованої деіонізованої води та поміщали в холодильник ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) для припинення дії високої температури. Як контроль слугувала геномна ДНК, яку не піддавали дії високої температури; до неї також додавали 90 мкл води (для нормалізації концентрації ДНК до 0,1 нг/мкл). З отриманими зразками ДНК проводили ПЛР у реальному часі. Для оцінки ступеня деградації у кожній часовій точці аналізували отримані результати концентрацій. Дослідження проводили у трьох аналітичних і трьох біологічних повторах.

ПЛР у реальному часі зі стандартами ДНК NIST

Для аналізу використовували десять компонентів міжнародних ДНК-стандартів NIST 2391b (№ 1—10), для кожного з яких проводили ПЛР у реальному часі. Дослідження проводили у трьох аналітичних і трьох біологічних повторах. Достовірність системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human визначали, порівнюючи отримані дані зі значеннями, наведеними у свідоцтві проведення аналізу стандартів ДНК NIST 2391b [8, с. 3].

Результати досліджень та їх обговорення

Загалом на результати дослідження впливають такі чинники, як умови зберігання реактивів та експлуатації обладнання, знання суті таких понять і процесів, як біологічний матеріал, контамінація, вплив інгібіторів, пробопідготовка зразків для дослідження, методи виділення ДНК, якість реакційного середовища для проведення ПЛР тощо. Незнання цих чинників може призвести до неправильного визначення якісного та кількісного вмісту ДНК і вплинути на подальше проведення реакції ампліфікації (докладний опис валідації методу фрагментарного аналізу з використанням набору реагентів Identifiler Plus є темою подальших наукових напрацювань).

Під час проведення внутрішньолабораторної валідації було перевірено кілька параметрів.

Точність і достовірність системи

Одним зі способів аналізу точності та достовірності системи ПЛР у реальному часі є вивчення значень граничного циклу Ст стандартів ДНК. Було приготовано вісім розведень. Порівнюючи середні значення Ст, визначали відхилення між однотипними концентраціями ДНК-стандартів. Для цього було досліджено значення Ст для кожного з восьми розведень стандартів ДНК. При цьому результати значень Ст не переводили у відповідні концентрації ДНК, а обраховували отримані числові значення. З огляду на те, що метою дослідження була перевірка роботи приладу 7500 Real Time PCR та процесу протікання реакції, інші показники до уваги не брали (зокрема, залежність показника Ст від концентрації стандарту ДНК). Одержані результати наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Значення Ст системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human

Концентрація стандарту ДНК, нг/мкл	Середнє значення Ст	Стандартне відхилення значень Ст
50,00	23,20	0,17
16,70	24,89	0,10
5,56	26,51	0,17
1,85	28,07	0,11
0,62	29,53	0,05
0,21	30,84	0,12
0,068	32,51	0,20
0,023	34,11	0,31

Середні значення Ст мали нормальний зворотній зв'язок з концентрацією стандарту ДНК. Отримані результати збіглися з протоколом SWGDAM [4, с. 6]: при найвищій концентрації ДНК-стандарту (50 нг/мкл) числові значення Ст перебували у межах від 23 до 24, а при найнижчій концентрації ДНК-стандарту (0,023 нг/мкл) — від 33 до 35. Найбільшу похибку (стандартне відхилення) значень Ст спостерігали за найменшою концентрації ДНК-стандарту, що могло бути зумовлено стохастичним ефектом, коли за малих кількостей ДНК у розчині до лунки з ПЛР-реагентами вноситься різна кількість молекул ДНК, що призводить до утворення різної кількості ампліфікату. Тобто зі зменшенням копій ампліфікатів відповідно збільшується значення похибки. При цьому відсутність закономірності не залежить від характеристик набору реагентів Quantifiler Human, а є неминучим наслідком законів статистики та ймовірності [5].

Попри мінливість значень Ст при низьких концентраціях, проведені дослідження засвідчили позитивний результат стабільності системи під час вимірювання найкритичніших параметрів — точності та достовірності, — про що свідчить однаковість результатів, отриманих під час дублювання реакцій та проведення їх у різні дні.

Середнє значення та похибка концентрації ДНК A9947, яку використали як позитивний контроль для оцінки точності та достовірності системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human, наведено у таблиці 2.

Під час молекулярно-генетичних досліджень як позитивний контроль широко використовують ДНК A9947. Зокрема, для оцінки точності та достовірності системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human визначали середнє значення та похибку концентрації ДНК A9947 (табл. 2).

Отже, як свідчать дані таблиць 1 і 2, точність і достовірність системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі є правильною. Відхилення у визначенні концентрації ДНК становить 17 %.

Чутливість системи

Для визначення оптимального діапазону концентрацій геномної ДНК людини, у межах якого можливе позитивне виявлення і точне визначення кількості ДНК за допомогою аналізу ПЛР у реальному часі, було проведено експеримент, результати якого наведено у таблиці 3. Встановлено, що достовірним порогом чутливості сис-

теми є концентрація ДНК $0,003 \pm 0,0005$ нг/мкл, яку спостерігали у разі розведення ДНК А9947 з бідистильованою деіонізованою водою у співвідношенні 1:16. Стандартне відхилення значень Ст дорівнювало 0,46. У разі меншої концентрації ДНК виникав стохастичний ефект. Значення Ст збільшувалося залежно від зменшення концентрації ДНК в об'єкті.

Таблиця 2

Точність і достовірність системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human з використанням ДНК А9947

ДНК А9947	Мінімальна концентрація ДНК, нг/мкл	Максимальна концентрація ДНК, нг/мкл	Середня концентрація ДНК, нг/мкл	Відхилення концентрації ДНК, %
	0,10	0,19	0,15	17

Таблиця 3

Чутливість системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human

Співвідношення розведення ДНК А9947 з водою	Середня концентрація ДНК, нг/мкл	Стандартне відхилення концентрації ДНК, нг/мкл	Середнє значення Ст	Стандартне відхилення Ст
1:1	0,04	0,009	32,82	0,23
1:2	0,02	0,0026	34,03	0,27
1:4	0,007	0,0003	35,23	0,83
1:8	0,005	0,0002	35,88	0,62
1:16	0,003	0,0005	36,16	0,22
1:32	0,0011*	—	37,34*	—
1:64	0,0013	0,0004	37,60	0,61
1:128	—	—	—	—

*Примітка: отримано лише один результат з п'яти вибірок.

Отже, як свідчать результати експерименту, визначення чутливості системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі проведено ефективно. Мінімальна достовірна концентрація геномної ДНК людини, яку визначають із застосуванням цієї системи, становить 0,003 нг/мкл.

Стабільність системи. Вплив інгібіторів на реакцію ПЛР у реальному часі

Стійкість будь-якої системи під час проведення ПЛР до впливу інгібіторів, які можуть знаходитися практично на будь-якому предметі-носії, визначає її стабільність, що дає змогу точно визначити кількість ДНК, виділену зі слідів біологічного походження на цих предметах-носіях. Здебільшого предмет-носії містить інгібітори, які впливають на ДНК людини через термостабільну ДНК-полімераза, блокуючи активність цього ферменту, що, у свою чергу, зупиняє реплікацію ДНК. Крім того, деякі інгібітори перешкоджають зв'язуванню іонів магнію (Mg^{2+}), який є кофактором, з ДНК-полімеразаю, що також може пригнічувати процесинг ПЛР [12]. Ос-

новними інгібіторами є:

- гематин, гемоглобін, імуноглобулін G та лактоферин — у складі крові [13];
- колаген — у складі сполучної тканини [14];
- меланін та еумеланін — у складі волосся та шкіри [15; 16];
- міоглобін — основний білок м'язової тканини [17];
- протеїнази та іони кальцію — у складі кісток і молока [18];
- складні олігосахариди та полісахариди, джерелом яких є рослини [19].

Рідше трапляються компоненти сечовини та фекалій [20; 21].

Виявити інгібітори дозволяє використання певних наборів реагентів (зокрема, Quantifiler Human) під час проведення ПЛР у реальному часі для кількісного визначення ДНК за рахунок внутрішнього позитивного контролю (далі — IPC). У режимі реального часу результати ПЛР також можуть бути використані для виявлення інгібіторів за допомогою аналізу ефективності ампліфікації мішені [22].

У лабораторних умовах як інгібітори ДНК використовують різні речовини природного та штучного походження. Найпоширенішим є використання гематину, який можуть містити плями крові [13, с. 363]. Зокрема виробник згідно з методикою використовував гематин у концентраціях 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20 та 40 мкМ. До кожної реакції додавав однакову концентрацію зразка ДНК (1,0 нг / 2 мкл) та однакову кількість гематину кожної молярності (по 2 мкл до проби). Ступінь інгібуючого ефекту був пропорційний концентрації гематину. За найвищої концентрації ДНК у 40 мкМ відбувалося повне її інгібування. Детектори IPC проявили чутливість до гематину в концентраціях від 16 до 40 мкМ [1, с. 4, 7].

Загалом предметом-носієм біологічного матеріалу може бути тканина, шкіра або будь-який інший матеріал, який містить синтетичні чи натуральні барвники. Інгібіторами ДНК здебільшого є вивільнені барвники (зокрема, основним барвником джинсової тканини є відомий інгібітор «індиго» [23]). Під час перевірки стабільності будь-якої системи для проведення ПЛР бажано кожного разу використовувати той самий інгібітор. Для дослідження як інгібітор було обрано принтерні чорнила, які з часом не змінюють своїх хімічних і фізичних властивостей. Як засвідчив проведений експеримент, принтерні чорнила залежно від концентрації викликають повне або часткове інгібування ДНК.

У результаті дослідження у титрах інгібіторів від 1:1 до 1:16 концентрацію геномної ДНК і внутрішній IPC-контроль не встановлено (див. табл. 4).

Найбільшу концентрацію інгібіторів у реакції, під час якої утворювалася мінімальна кількість ампліфікату, необхідна для отримання результату, спостерігали у разі розведення принтерних чорнил у співвідношенні 1:32, за якого концентрація ДНК становила 0,012 нг/мкл, що на 0,088 нг/мкл менше від початкової концентрації ДНК у титрі.

За такого розведення значення Ст геномної ДНК було на 3,02 цикли більше ніж значення Ст у пробі без інгібіторів, а значення Ст внутрішнього IPC-контролю — на 7,37 цикли. Концентрація ДНК і значення Ст при подальшому зменшенні концентрації інгібіторів у пробах наближувалося до показників проби без інгібіторів.

Отже, було експериментально перевірено, що у разі дії інгібіторів система 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі є стабільною. Нижній поріг розведення принтерних чорнил, за якого можна виявити мінімальну кількість геномної ДНК, становить 1:32.

**Вплив інгібіторів на систему
7500 PCR Real Time/Quantifiler Human**

Титр принтерних чорнил	Концентрація ДНК, нг/мкл	Середнє значення Ст ДНК	Середнє значення Ст ІРС
контроль	0,101	32,16	27,60
1:1	—	—	—
1:2	—	—	—
1:4	—	—	—
1:8	—	—	—
1:16	—	—	—
1:32	0,012	35,18	34,97
1:64	0,038	33,52	31,65
1:128	0,064	32,79	28,95

Уперше доведено, що принтерні чорнила не лише придатні, а й ефективні для застосування їх як інгібіторів геномної ДНК людини, яку використовують під час калібрування чи тестування системи.

Якість ПЛР у реальному часі при дослідженні деградованої ДНК

Для дослідження ДНК експертові надають зразки та сліди біологічного походження, які зазнали різного впливу навколишнього середовища (хімічного, біологічного, фізичного). Результатом такого впливу є зміна структури молекул ДНК. Тому для деградації ДНК у лабораторних умовах використовують чинники, які повністю або частково відтворюють умови навколишнього середовища, зокрема сильно лужні розчини ($\text{pH} > 12,5$), концентровані розчини солей, УФ-випромінювання та витримання при високих температурах. Так, для досягнення повного плавлення геномної ДНК людини використовують температуру $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ [9, с. 11; 24] упродовж різного часу. Після дії температури $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ молекули ДНК легше піддаються ренатурації.

Аналіз ступеня деградації геномної ДНК людини під дією температури $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ у різні проміжки часу — від 10 до 90 хв проводили відповідно до значень концентрацій продуктів ПЛР у реальному часі (див. табл. 5). Концентрація геномної ДНК у пробі поступово зменшувалася зі збільшенням часу дії температури від 10 до 40 хв. Надалі при інкубації від 50 до 90 хв концентрація ДНК зростала та перевищувала початкове значення. Збільшення тривалості дії температури сприяло нелінійній зміні концентрації ДНК (рис.).

Значення Ст зростало протягом 40 хв та досягло максимального значення 34.7 цикли. Під час подальшої дії температури Ст спадало та було близьким до значення Ст об'єкта, який не піддавали впливу високої температури (табл. 5).

Як свідчить аналіз отриманих результатів, використання набору реагентів Quantifiler Human для визначення кількості та якості деградованої ДНК у криміналістичних дослідженнях є недоцільним (докладне уточнення стосовно якості визначення деградованої ДНК з цим набором реагентів буде надано у наступних наукових матеріалах у межах обговорення результатів фрагментарного аналізу капілярного електрофорезу з використанням набору реагентів Identifiler Plus).

Таблиця 5

**Ефективність системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human
під час аналізу деградованої ДНК**

Тривалість дії температури, хв	Концентрація ДНК, нг/мкл	Середнє значення Ст
0	0,090	32,4
10	0,120	32,1
20	0,110	32,2
30	0,055	33,2
40	0,019	34,7
50	0,060	33,1
60	0,050	33,3
70	0,054	33,2
80	0,083	32,6
90	0,120	32,1



Рис. Вплив температури 95 °С на концентрацію геномної ДНК людини

Отже, система 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі дає змогу визначати ДНК з різним рівнем деградації, але унеможливує визначення ступеня деградації ДНК, що ускладнює проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Достовірність системи. Перевірка відповідності стандартів ДНК NIST

Для перевірки достовірності та точності системи ПЛР у реальному часі широко застосовують стандарти ДНК NIST, які рекомендує Національний інститут стандартів і технологій (США) для судових біологічних досліджень [25]. Систему також перевіряють кожного разу після внесення змін до протоколу процедури.

Під час проведення ПЛР у реальному часі було використано десять стандартів ДНК NIST 2391b. Результати порівняння отриманих даних зі значеннями протоколу NIST 2391b, наведені у таблиці 6, засвідчили, що концентрація восьми стандартів ДНК з десяти досліджуваних перебувала в межах концентрації ДНК згідно зі свідоц-

твом проведення аналізу стандартів ДНК NIST 2391b. Концентрація стандартів ДНК № 6 та № 8 мала несуттєве відхилення від концентрації за зазначеним свідоцтвом (можливо, за рахунок похибки приладу 7500 PCR Real Time).

Таблиця 6

**Достовірність системи 7500 PCR Real Time/Quantifiler Human
з використанням NIST 2391b**

Стандарт ДНК	Концентрація досліджуваного стандарту, нг/мкл	Концентрація згідно зі свідоцтвом проведення аналізу стандартів ДНК 2391b NIST, нг/мкл
ДНК1	0,19	0,08–0,61
ДНК2	0,21	0,17–0,89
ДНК3	0,30	0,17–0,41
ДНК4	0,20	0,21–0,49
ДНК5	0,34	0,34–0,70
ДНК6	0,19	0,24–0,72
ДНК7	0,33	0,16–0,56
ДНК8	0,39	0,42–0,87
ДНК GM09947A	0,41	0,31–0,88
ДНК GM09948	0,81	0,33–0,87

Примітка: жирним шрифтом виокремлено компоненти, які мають відхилення від діапазону.

Слід зазначити, що стандарти NIST 2391b, які призначені для стандартизації в судово-медичній галузі, проведення молекулярно-генетичних експертиз та встановлення батьківства з використанням ПЛР [26], не придатні для використання під час лабораторно-клінічної діагностики людей і тварин.

Результати аналізу стандартів ДНК NIST 2391b з використанням системи 7500 PCR Real Time/ Quantifiler Human для ПЛР у реальному часі є відтворюваними та достовірними.

Аналізуючи отримані результати досліджень усіх параметрів, які вивчали під час валідації, можна дійти висновку, що використання методу ПЛР у реальному часі з набором реагентів Quantifiler Human на приладі 7500 Real Time PCR Systems є цілком придатним та ефективним для визначення кількості виділеної ДНК, у тому числі за наявності інгібіторів, з метою подальшого проведення молекулярно-генетичних досліджень. Винятком є дослідження деградованої ДНК. Такі дослідження можна використовувати для проведення внутрішньої валідації в біологічних лабораторіях.

Список використаної літератури

1. *Developmental validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples* / [Green R.L., Roinestad I.C., Boland C., Hennessy L.K.] // J. Forensic Sci. — 2005. — Vol. 50 (4). — P. 1—17.

2. *Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій : ДСТУ ISO/IEC 17025:2006*. — [Чинний від 2006-12-27]. — К. : Держспоживстандарт України, 2007. — (Національний стандарт України).

3. *Самойліченко О.В.* Валідація аналітичних методик як невід'ємна частина забезпечення якості результатів випробувань / О.В. Самойліченко, В.М. Мокійчук // Електротехнічні та комп'ютерні системи. — 2012. — № 6 (82). — С. 228—234.

4. *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods.* Validation Guidelines for DNA Analysis Methods [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <file:///C:/Users/pandainst/Downloads/quality-assurance-standards-for-forensic-dna-testing-laboratories.pdf>.

5. *The FBI quality assurance standards for forensic DNA testing laboratories* [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <file:///C:/Temp/forensic-qas-audit-9-1-11.pdf>.=.

6. *Абсолютный количественный анализ Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System* : руков. по подг. к выполнению абсолютного количественного анализа на приборе 7300/7500. — М., 2004. — 144 с.

7. *Quantifiler Kits User's Manual.* Applied Biosystems. — USA : Life Technologies Corporation., 2012. — 216 с.

8. *Certificate of Analysis Standard Reference Material® 2391b.* PCR-based DNA profiling standard [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archive/2391b.pdf>.

9. *Пименов М.Г.* Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа : учеб. пособ. / Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. — М. : ГУ ЭКЦ МВД России, 2001. — 144 с.

10. *HID Real-Time PCR Analysis Software v.1.1.* Product bulliten. Human identification. Applied Biosystems. — 2010.

11. *Laboratory QA/QC assessment to assist project Quality review and reporting* [Електронний ресурс] // Environmental. — 2015. — Режим доступу : <file:///C:/Temp/EnviroMail-93-Laboratory-QA-QC-Assessment-to-Assist-Project-Quality-Review-1.pdf>.

12. *Prakash S.* Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function / Prakash S., Johnson R.E., Prakash L. // Annual Review of Biochemistry. — 2005. — Vol. 74. — P. 317—353.

13. *Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification* / [Akane A., Matsubara K., Nakamura H. et al] // J. Forensic Sci. — 1994. — Vol. 39 (2). — P. 362—372.

14. *Optimization of the PCR for detection of Staphylococcus aureus nuc gene in bovine milk* / [Kim C.H., Khan M., Morin D.E. et al] // J. Dairy Sci. — 2001. — Vol. 84. — P. 74—83.

15. *Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity* / [Eckhart L., Bach J., Ban J., Tschachler E.] // Biochem. Biophys. Res. Comm. — 2000. — Vol. 271. — P. 726—730.

16. *Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal* / [Yoshii T., Tamura K., Taniguchi T., Akiyama K.]. // Nihon Hoigaku Zasshi. — 1993. — Vol. 47. — 323—329.

17. *Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: alimitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of Thermus thermophiles polymerase* / [Belec L., Authier J., Eliezer-Vanerot M.C. et al] // Muscle Nerve. — 1998. — Vol. 21. — P. 1064—1067.

18. *Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using the polymerase chain reaction* / [Powell H.A., Gooding C.M., Garrett S.D. et al] // Lett. Appl. Microbiol. — 1994. — Vol. 18. — P. 59—61.

19. *Demeke T.* The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR / T. Demeke, R.P. Adams // Biotechniques. — 1992. — Vol. 12. — P. 332—334.

20. *Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA* / [Khan G., Kangro H.O., Coates P.J., Heath R.B.] // J. Clin. Pathol. — 1991. — Vol. 44. — P. 360—365.

21. *Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR* / [Lantz P.G., Matsson M., Wadstrom T., Radstrom P.] // J. Microbiol. Meth. — 1997. — Vol. 28. — P. 159—167.

22. *Kontanis E.J.* Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors / E.J. Kontanis, F.A. Reed // J. Forensic Sci. — 2006. — Vol. 51. — P. 795—804.

23. *Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case* / [Shutler G.G., Gagnon P., Verret G. et al] // *J. Forensic Sci.* — 1999. — Vol. 44. — P. 623—626.

24. *Thermal degradation of DNA* / [Karni M., Zidon D., Polak P. et al] // *Original Research Article.* — Vol. 32 (6). — 2013. — P. 1—4.

25. *DNA Profiling Standard Reference Materials* [Електронний ресурс]. — Режим доступу : <https://www.nist.gov/programs-projects/dna-profiling-standard-reference-materials>.

26. *May W.* Definitions of terms and modes used at NIST for value-assignment of Reference Materials for chemical measurements. NIST special publication 260—136 [Електронний ресурс] / May W., Parris R., Beck C. // U.S. Government Printing Office. — Washington : DC., 2000. — Режим доступу : <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/srm/SP260-136.PDF>.