

УДК 343.983.7

DOI: <https://doi.org/10.32631/v.2021.2.27>

Яна Олександрівна Сініцина,

*Харківський науково-дослідний
експертно-криміналістичний центр МВС України,
відділ біологічних досліджень та обліку;*

 <https://orcid.org/0000-0003-1755-1987>,
e-mail: yanasinicyna@ukr.net

АНАЛІЗ ДОДАТКОВИХ МЕТОДІВ ОЧИЩЕННЯ СУМІШЕЙ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОГО ЛІЗИСУ ЗА СТАТЕВИМИ ЗЛОЧИНАМИ

Зростання кількості й тяжкості статевих злочинів призводить до збільшення кількості звернень за молекулярно-генетичними експертизами в Експертну службу МВС України для встановлення ДНК-профілю нападника. Стандартна методика диференційного лізису за наявності малої кількості сперми та значної кількості крові й епітеліальних клітин жертви не є ефективною. Розглянуто порівняльний аналіз додаткових методів очищення суміші епітеліальних клітин і сперматозоїдів, які розділено на хімічні (додаткова промивка та інкубація, використання нуклеаз, лізуючого буфера та антитіл) і фізичні методи (лазерна мікродисекція, акустичний лізис, гідродинамічний ефект, мікрочіпи й технологія DEPAarray), зазначено переваги та недоліки їх застосування та можливість використання на об'єктах із застарілою спермою і подальшої апробації під час проведення експертних досліджень.

Ключові слова: молекулярно-генетична експертиза, диференційний лізис, статеві злочини, ДНК.

Оригінальна стаття

Постановка проблеми

Останніми десятиліттями спостерігається щорічне збільшення кількості злочинів, пов'язаних з неправомірними діями сексуального характеру, та підвищення їх тяжкості. Для визначення особи, причетної до кримінального правопорушення, зазвичай призначають імунологічні та молекулярно-генетичні експертизи. На молекулярно-генетичне дослідження можуть бути направлені вагінальні, ректальні й оральні мазки потерпілої особи, змиви із зовнішніх поверхонь геніталій та шкіри, зрізи нігтьових пластин, спідня білизна, одяг, постільна білизна та презервативи, вилучені на місці події.

Головною проблемою вищезазначених видів об'єктів дослідження є сильне забруднення їх слідами крові у суміші зі слідами сперми. У більшості випадків це відбувається через застосування надмірної фізичної сили під час статевого акту, опір жертви або невідповідність

розмірів інтимних частин правопорушника і жертви, що призводить до кровотечі [1, с. 34]. Наявність крові або великої кількості епітеліальних клітин жертви ускладнює проведення методики диференційного лізису для об'єктів і негативно впливає на ймовірність отримання якісного та повного ДНК-профілю нападника.

Стан дослідження проблеми

Основним доказовим методом виявлення сперматозоїдів в об'єкті дослідження під час проведення судових експертиз в Експертній службі МВС є мікроскопія, яка водночас дає змогу кількісно оцінити співвідношення епітеліальних клітин та сперматозоїдів. Проте ця оцінка є лише приблизною і впливає тільки на кількість промивань у разі використання стандартної методики диференційного лізису. Тому загалом усі науковці, такі як Хінг-Цзун Згао, Ле Ванг, Інг Сун, Бо-Бей Йанг, Ер-Лі Зганг і Ян Є, репрезентують у своїх роботах експериментальні дослідження нових приладів та застосування нових прийомів для більш якісного виділення фракції нападника, порівнюючи їх ефективність з іншими типами методів, наприклад порівнюють метод виділення за допомогою антитіл з додаванням нуклеази з лазерним захопленням сперматозоїдів [2]. Проте автори не виявили статей, які б містили комплексне дослідження та узагальнення найбільш перспективних експериментальних наукових методів для поліпшення стандартної методики виділення під час проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Мета і завдання дослідження

Метою роботи є аналіз літературних даних щодо можливих поліпшень методики диференційного лізису для складних випадків змішаних слідів біологічного походження.

Завданнями статті є такі:

- розглянути біологічну основу методики диференційного лізису;
- проаналізувати можливість отримання змішаного ДНК-профілю залежно від використовуваного набору для проведення ампліфікації;
- аналіз додаткових етапів фізичного та хімічного очищення змішаних об'єктів.

Наукова новизна дослідження

У статті розглядаються причини неефективного диференційного лізису й узагальнюються аналіз фізичних і хімічних методів очищення фракції сперми у змішаних слідах, їх переваг та недоліків і можливість їх застосування для апробації в експертних центрах МВС України.

Виклад основного матеріалу

Предмети дослідження, вилучені з місць з'валтувань, у багатьох випадках забруднено слідами крові й виділеннями, які містять значну кількість епітеліальних та інших типів клітин і невелику кількість

сперматозоїдів, тобто ці сліди є змішаними за своєю природою. Найбільш використовуваним методом дослідження такого типу об'єктів для отримання ДНК-профілів причетних осіб є диференційний лізис. Методика диференційного лізису ґрунтується на відмінностях у будові клітинних мембран епітеліальних клітин і сперматозоїдів. Диференційний лізис складається з етапу лізису «епітеліальних» клітин з використанням ТЕ-буфера, бідистильованої деіонізованої води, детергенту (SDS) або інших буферів для лізису клітин з додаванням розчину протеїнази К, декількох повторів відмивання супернатанту з виділеною ДНК та лізису фракції сперми з додаванням розчину протеїнази К, лізуючих буферів або іонообмінної смоли Chelex і дігітотрейтолу (ДТТ) [3, с 14].

Проте суттєвим недоліком диференційного лізису є те, що ця методика може бути неефективною для об'єктів, у яких сперматозоїди є другорядним компонентом суміші, що зумовлює надлишок епітеліальних клітин у фракції сперми та значно зменшує імовірність отримання «чистого» ДНК-профілю нападника. Оскільки ДНК епітеліальних клітин («жіноча» фракція) у змішаному зразку залишається основним компонентом навіть після етапу виділення, то на стадії ампліфікації це призводить до надлишку небажаного продукту ПАР, перешкоджаючи у такий спосіб нормальній ампліфікації алелей, які належать донору сперми («чоловічої» фракції), через що у результаті генетичного аналізу буде отримано змішаний ДНК-профіль.

Загалом усі набори для типування STR-локусів, розроблені для ідентифікації сумішей, гарантують виявлення обох компонентів суміші, проте в певному співвідношенні. Так, для набору AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) межею виявлення другорядного компонента в суміші є співвідношення 1:10¹, для набору GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) це співвідношення становить 1:8, однак навіть за співвідношення 1:15 можна було отримати частковий ДНК-профіль другорядного компонента суміші². Тому додатково доцільно досліджувати об'єкти наборами для типування STR-локусів на Y-хромосомі, оскільки це надає можливість отримати профіль фракції сперми у суміші з «жіночою» фракцією зі співвідношенням 1:2000 та розділити ДНК-профілі декількох чоловіків за співвідношення суміші 1:10 для набору AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)³.

¹ AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit : User guide / Applied Biosystems Life Technologies Corporation. 2012. P. 93.

² GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits : User guide / Applied Biosystems Life Technologies Corporation. 2019. P. 96.

³ AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit : User's Manual / Applied Biosystems Life Technologies Corporation. 2006.

Беручи до уваги таку особливість роботи наборів для ампліфікації STR-локусів, учені розробляють методи і додаткові процедури, які застосовуються на етапі виділення ДНК для зменшення кількості епітеліальних клітин у суміші. Указані методи поділяються на два типи: фізичні та хімічні.

Хімічні модифікації диференційного лізису – це етапи дослідження, які додатково застосовують під час проведення стандартної методики диференційного виділення.

1. Додатковий етап промивки суміші здійснюється перед етапом лізису епітеліальних клітин для усунення надлишку клітин та сторонніх забруднень. Для цього об'єкт промивають буфером та детергентом і видаляють супернатант.

2. ДНКаза – це фермент класу ендонуклеаз, який застосовують для додаткового руйнування епітеліальних клітин після етапу лізису «жіночої» фракції з використанням протеїнази К. Застосування ДНКази має певні особливості, а саме необхідність заміни буфера для лізису з іонного детергенту (зазвичай це SDS) на неіонний. Крім того, для якісної роботи ДНКази потрібні наявність у суміші для її активації двовалентних іонів, наприклад Mg^{2+} та Ca^{2+} , та відсутність іонів Na^+ , оскільки вони є інгібітором ферменту. Також перед подальшим проведенням лізису сперматозоїдів слід здійснити інактивацію ДНКази додаванням відновників, SDS і хелаторів металів, таких як EDTA, або нагріванням розчину вище $65^{\circ}C$ протягом 5–10 хв. Інактивація ферменту надасть можливість запобігти втраті ДНК сперматозоїдів. Незважаючи на вищеописані властивості ендонуклеази, метод дає змогу отримати високий вихід ДНК сперматозоїдів і високоякісний STR-профіль [4, с. 3–12].

3. Додатковий етап інкубації – після центрифугування та відділення «жіночої» фракції після першої інкубації осад переноситься до нової пробірки, туди додається свіжа порція буфера та протеїнази К, і проводиться додаткова інкубація протягом 15–30 хв. за початковою методикою. Ефективність та необхідний час інкубації можна визначити за допомогою виготовлення препаратів для вивчення наявності клітин і співвідношення клітинних елементів. Додатковий етап інкубації, за даними науковців, дає змогу зменшити кількість епітеліальних клітин у фракції сперми майже в 90 разів. Крім того, такий етап надає можливість зменшити кількість подальших промивок суміші, що знизить ризик забруднення (контамінації) та втрати клітин сперматозоїдів, особливо якщо промивки експерти проводять вручну [5, с. 174–176].

4. Заміна лізуючого буфера – під час першого етапу лізису зазвичай як буфер використовуються TE-буфер або бідистильована деіонізована вода. Їх можна замінити на аніонний детергент SDS,

приведений до pH 8,5, що руйнує клітинні мембрани, втручаючись у білок-білкові взаємодії, необхідні для забезпечення цілісності мембрани. У суміші з протеїназою K відбувається зменшення концентрації епітеліальних клітин на 85 %. Також такий буфер найбільш корисно використовувати для дослідження об'єктів з незначною кількістю сперми, які довго зберігалися перед направленням на дослідження (до одного року) [6, с. 86–89].

5. Магнітно-активоване сортування клітин з використанням антитіл – метод пасивного диференційного розділення клітин з використанням магнітних шарів, на які наносяться антитіла, специфічні для сперматозоїдів, та подальшим поміщенням їх у зовнішнє магнітне поле, в якому мічені магніти збираються в одну групу, а сперматозоїди на них екстрагуються елююванням, при цьому неполярзовані клітини вимиваються з розчину. Використовуються різні види антитіл, наприклад SP-10, tACE, ADAM2, JLP, проте розглянемо найбільш перспективні з них.

1. MOSPD3 – мембранний білок, специфічний для ссавців, що містить домен білка сперматозоїдів (MSP). Оскільки домен MSP зазвичай міститься в білках, що беруть участь у забезпеченні рухливості сперматозоїдів, вважається, що MOSPD3 бере участь у сперматогенезі. Білок розташовується рівномірно на поверхні сперматозоїдів (голівці, шийі, тілі, проте найбільше у хвості), але відсутній в епітеліальних клітинах піхви. Для отримання чистого якісного ДНК-профілю чоловіка-донора потрібна кількість клітин становить більш ніж 10^4 сперматозоїдів, але оскільки в середньому в одному мілілітрі сперми міститься $5 \cdot 10^7$ сперматозоїдів, то MOSPD3, нанесений на магнітні частки, можна використовувати в об'єктах із місць сексуального насильства [7, с. 909].

2. PH-20, відома як молекула адгезії сперматозоїдів 1 (SPAM1), розташовується на плазматичній мембрані по всій голівці людського сперматозоїда та надає можливість сперматозоїдам без акросоми досягати глікопротеїнової оболонки (Zona pellucida) яйцеклітини під час запліднення. Тому антитіло проти PH-20, нанесене на магніт, специфічно розпізнає та зв'язується з голівкою сперматозоїдів, яка є носієм ДНК, що надає можливість отримати чистий чоловічий STR-профіль з одного джерела у співвідношенні $10^3:10^5$ (сперма / епітелій) до сортування [2].

Перевагою використання антитіл є можливість поєднання їх з ДНКазою і перед проведенням лізису сперматозоїдів для повного видалення будь-якої жіночої ДНК у суміші. Проте значним недоліком цього методу є руйнування структури сперматозоїдів у разі тривалого зберігання об'єктів (більше 10 днів), під час якого може відбуватися втрата хвоста й тіла сперматозоїдів, що унеможливає сортування

сперматозоїдів за допомогою антигенів на їх поверхні. Отже, використання магнітно-активованого сортування клітин з використанням антитіл є неефективним для застарілих та сухих мазків.

Усі хімічні модифікації методики диференційного лізису збільшують якість отриманого ДНК-профілю, проте не є запорукою отримання чистого ДНК-профілю гвалтівника. Це означає, що додавання єдиного реагенту до суміші не призведе до її повного розділення. Тому в разі використання додаткових хімічних методів доцільно комбінувати хімічні компоненти для отримання їх синергічного ефекту. Проте водночас необхідно звернути увагу, що занадто сильний початковий лізис може порушити мембрани не лише епітеліальних клітин, але і сперматозоїдів (особливо в разі їх тривалого зберігання), що призведе до переміщення значної кількості чоловічої ДНК у фракцію виділених епітеліальних клітин.

До фізичних методів належать маніпуляції для виділення окремих сперматозоїдів.

1. Лазерна мікродисекція – це ручний метод, що використовується в судово-медичних лабораторіях для ізоляції окремих клітин певного вибраного типу зі зразка тканини або суміші на препараті. Предметами, необхідними для цієї методики, є мікроскоп для візуалізації клітин, лазер для селективного вилучення певного типу клітин та пробірка для збору вилучених клітин. Перевагами цього методу є значне зменшення імовірності отримання змішаних ДНК-профілів і зменшення рівня інгібіції об'єкта, оскільки клітини переносяться прямо до іншої ємності. Крім того, цей метод є повністю сумісним з наступними етапами ПЛР-аналізу та подальшого виділення, а робота в «одній» пробірці мінімізує втрату ДНК на етапах переносу та промивок, у такий спосіб зменшуються шанси контамінації об'єкта дослідження та підвищується чутливість методу [8, с. 91–92].

2. Акустичний диференційний лізис – автоматизований метод, який використовує безконтактні акустичні сили стоячих хвиль у безклапанних мікрофлюїдних пристроях для утримання сперматозоїдів із суміші, отриманої в результаті першого етапу лізису епітеліальних клітин. Метод ґрунтується на різниці в розмірах сперматозоїдів та вільної ДНК і силі, достатній для утримання клітин сперматозоїдів і проходження «жіночої» ДНК крізь акустичне поле. Перевагою цього методу є можливість роботи зі зразками кількістю від мікролітрів до мілілітрів [9, с. 6090].

3. Гідродинамічний ефект у разі малих чисел Рейнольдса – мікроприлад, який складається з ряду розгалужених каналів, які з потоку суміші сортують клітини за їх розміром. Перевагою приладу є простота його конструкції та можливість випуску як одноразової системи для проведення експертиз щодо статевих злочинів [10].

4. Метод сортування на основі мікрочіпів – у підґрунті методу лежать морфологічні відмінності епітеліальних клітин та сперматозоїдів, а саме розмір клітин і питома вага, які впливають на швидкість осідання клітин. Під час роботи приладу відбувається осідання епітеліальних клітин та їх абсорбування на дні вхідного резервуара, тоді як потік переносить сперматозоїди до іншого резервуара. Однак цей метод вимагає достатнього часу (близько 30 хвилин) для осідання «жіночої» фракції клітин [11, с. 746–749].

Додатково в мікрофлюїдні системи (мікрочіпи) можна інтегрувати олігосахаридну послідовність Сіаліл Льюїс (Sialyl-Lewis^x (SLeX)), яка зазвичай перебуває на яйцеклітині та відповідає за зв'язування сперматозоїда з яйцеклітиною для формування зиготи. SLeX має декілька сайтів з'ясування на поверхні сперматозоїда, тому є гарною мішенню для селективного виділення сперматозоїдів із суміші. Пристрій надає можливість за 80 хвилин розділити суміші та провести лізис ДНК спермальної фракції на чіпі. Такий чіп може захоплювати сперматозоїди будь-якої морфології, навіть безхвосту форму, що є перевагою, оскільки цю модифікацію можна використовувати для об'єктів, які вилучено давно та в яких з великою імовірністю відбулось руйнування структури сперматозоїдів [12].

5. Технологія DEPArrayTM фірми Menarini Silicon Biosystems, у підґрунті якої лежить явище діелектрофорезу (взаємодії клітин суміші, які містяться в рідині, з неоднорідним електричним полем), яке формується шляхом створення електричного поля над масивом електродів, що перебувають у протифазі з електричним полем сусідніх електродів. Завдяки змінним частотам електричних полів на кожному електроді клітини суміші розподіляються в різних ділянках мікрочіпу залежно від їх індивідуальних діелектричних характеристик, таким чином клітина «захоплюється» певним електричним полем та може переміщуватись по чіпу разом із ним, формуючи однорідні групи клітин.

Із використанням цієї методики можна точно розділити епітеліальні клітини та сперматозоїди й виявити навіть поодинокі голівки сперматозоїдів (мінімально системою показано виявлення 2 сперматозоїдів).

Отже, технологія DEPArrayTM має значно вищий рівень роздільної здатності виявлення сперматозоїдів у суміші порівняно з усіма вищезазначеними методиками, може використовуватись під час дослідження зразків з невеликою кількістю сперматозоїдів та є автоматизованою методикою, яка вимагає від оператора мінімальної участі й базових знань у галузі розпізнавання клітин. Крім того, важливими для судового ДНК-аналізу є використання одноразового змінного картриджу для проведення сортування клітин та витрати часу, що становлять 1–1,5 години на проведення аналізу однієї проби. Виявлення

таким методом сперматозоїдів надає можливість одночасно проводити морфологічну ідентифікацію сперматозоїдів та підрахунок вилучених клітин, що усуває необхідність проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі для кількісного аналізу ДНК як окремого етапу дослідження. Крім того, можна проводити екстракцію вилучених сперматозоїдів на чіпі без перенесення їх до інших ємностей, що зменшить імовірність контамінації та втрати об'єктів дослідження. Технологія DEPAgray™ покращує успішність проведення ампліфікації завдяки видаленню потенційних інгібіторів із суміші, що дає змогу отримати частковий профіль, придатний для інтерпретації, навіть із двох сперматозоїдів.

Однак недоліком цієї системи є її ціна та нездатність розрізняти суміші клітин одного типу, тобто в разі групового згвалтування після роботи приладу в мазках жертв буде отримано змішані профілі від кількох нападників, що ускладнює інтерпретацію отриманих ДНК-профілів. Утім, розробники стверджують, що наступна версія приладу усуває ці недоліки [13, с. 266–273].

Загалом усі фізичні методи мають високу чутливість, тому можуть правильно розділяти клітини за типами навіть у разі незначної кількості сперматозоїдів, і високу селективність, що гарантує відсутність епітеліальних клітин у «чоловічій» фракції, а деякі з них є рентабельними для рутинного використання у судовій практиці завдяки можливості одноразового використання. Фізичні методи можуть забезпечувати замкнуту систему аналізу об'єктів, що зменшує імовірність контамінації та втрати проби. Проте більшість з них наразі не є автоматизованими та потребують дорогого обладнання. Однак технічна еволюція розвиває можливість автоматизації цих систем для судового молекулярно-генетичного аналізу завдяки інтеграції етапів підготовки проб, обліку кількості клітин та виділення ДНК на одному пристрої, що у майбутньому зменшить час аналізу об'єктів дослідження.

Висновки

Порівнюючи розглянуті фізичні та хімічні методи, можна зробити висновок про значне підвищення ефективності диференційного лізису в разі використання фізичних методів, які цілеспрямовано виявляють і вилучають сперматозоїди із суміші. Проте необхідність наявності певного дорогого обладнання і відсутність комерційного випуску витратних матеріалів для одноразового використання та їх валідаційних досліджень в експертній практиці є значним недоліком фізичних методів розділення сумішей. Водночас можливість застосування хімічних реагентів та додаткових етапів диференційного лізису підвищує імовірність виділення чистої фракції сперматозоїдів, хоча й не повною мірою.

Беручи до уваги можливість комбінування фізичних та різних хімічних методів під час дослідження об'єктів, найбільш доцільним є варіант адаптування розглянутих методик для можливої апробації в ДНК-лабораторіях залежно від наявного обладнання та потужностей лабораторії.

Список бібліографічних посилань: 1. Puri P., Kumar N., Sharma D., Shukla S. Differential organic DNA extraction of semen sample contaminated with blood for the identification of a serial sexual offender: A case report. *Medico-Legal Journal*. 2019. No. 87 (1). Pp. 32–35. DOI: <https://doi.org/10.1177/0025817218789569>. 2. Isolating Sperm from Cell Mixtures Using Magnetic Beads Coupled with an Anti-PH-20 Antibody for Forensic DNA Analysis / X. C. Zhao, L. Wang, J. Sun et al. *PLOS ONE*. 2016. No. 11 (7). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159401>. 3. Дяченко Н. М., Ольховець С. О., Лагус В. І. Дослідження ДНК з об'єктів біологічного походження методом полімеразної ланцюгової реакції : метод. рек. Київ : ДНДЕКЦ МВС України, 2003. 39 с. 4. Wong H., Mihalovich J. Automation of the Differential Digestion Process of Sexual Assault Evidence. *Journal of Forensic Science*. 2018. Vol. 64, Iss. 2. Pp. 539–550. DOI: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13877>. 5. Timken M. D., Klein S. B., Buoncristiani M. R. Improving the efficacy of the standard DNA differential extraction method for sexual assault evidence. *Forensic Science International: Genetics*. 2018. Vol. 34. Pp. 170–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.02.014>. 6. Enhanced recovery of spermatozoa and comprehensive lysis of epithelial cells from sexual assault samples having a low cell counts or aged up to one year / J. A. Lounsbury, S. M. Nambiar, A. Karlsson et al. *Forensic Science International: Genetic*. 2018. Vol. 8, Iss. 1. Pp. 84–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.06.015>. 7. Magnetic bead-based separation of sperm from buccal epithelial cells using a monoclonal antibody against MOSPD3 / X.-B. Li, Q.-S. Wang, Y. Feng et al. *International Journal of Legal Medicine*. 2014. Vol. 128. Pp. 905–911. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-014-0983-3>. 8. Meredith M., Bright J.-A., Cockerton S., Vintiner S. Development of a one-tube extraction and amplification method for DNA analysis of sperm and epithelial cells recovered from forensic samples by laser microdissection. *Forensic Science International: Genetics*. 2012. Vol. 6, Iss. 1. Pp. 91–96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.02.007>. 9. Acoustic Differential Extraction for Forensic Analysis of Sexual Assault Evidence / J. V. Norris, M. Evander, K. M. Horsman-Hall et al. *Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 81, Iss. 15. Pp. 6089–6095. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac900439b>. 10. Separation of sperm and epithelial cells based on the hydrodynamic effect for forensic analysis / W. Liu, W. Chen, R. Liu et al. *Biomicrofluidic*. 2015. Vol. 9, Iss. 4. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4928453>. 11. Separation of Sperm and Epithelial Cells in a Microfabricated Device: Potential Application to Forensic Analysis of Sexual Assault Evidence / K. M. Horsman, S. L. R. Barker, J. P. Ferrance et al. *Analytical Chemistry*. 2005. Vol. 77, Iss. 3. Pp. 742–749. DOI: <https://doi.org/10.1021/>

ac0486239. **12.** A Novel On-Chip Method for Differential Extraction of Sperm in Forensic Cases / F. Inci, M. O. Ozen, Y. Saylan et al. *Advanced Science*. 2018. Vol. 5, Iss. 9. DOI: <https://doi.org/10.1002/adv.201800121>. **13.** Williamson V. R., Laris T. M., Romano R., Marciano M. A. Enhanced DNA mixture deconvolution of sexual offense samples using the DEPArray™ system. *Forensic Science International: Genetics*. 2018. Vol. 34. Pp. 265–276. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.001>.

Надійшла до редакції 03.06.2021



SinitSYna Ya. O. Analysis of Additional Methods of purification of Mixtures while Conducting Differential Lysis under Sexual Crimes

The article is focused on the problem of studying mixed biological traces during the research of the growing number and severity of sexual crimes. The presence of blood and epithelial cells with a small amount of sperm on things removed at the crime scene and smears from the victim's body, complicates the molecular and genetic examination and the likelihood of obtaining a quality DNA profile from the sperm of the rapist. Therefore, the author has defined chemical basis of the standard method of differential lysis and the correlation of the components of the mixture of epithelial cells and sperm, which can help to get mixed and pure DNA profiles while amplify using the sets AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit, GlobalFiler STR PCR Amp Afication™ PCR Amplification Kit. The author has analyzed literature data on the developed and perspective methods and additional stages of the differential lysis technique for purification of the mixture and aimed at sorting and reducing the number of epithelial cells. Chemical methods of mixture purification have been studied, including additional washing and incubation of the mortar, use of DNases, SDS lysis buffer and magnetic sorting with the use of antibodies (MOSPD3 and RH-20), and physical methods such as laser microdissection, acoustic lysis, hydrodynamic effect in small Reynolds numbers, microchips with additional integration of Cialyl Lewis oligosaccharide sequence and DEPArray technology. The main advantages and disadvantages of the procedures, the possibility of combining with other types, the impact on subsequent stages of molecular and genetic examination and the possibility of automating the research process have been provided for the methods. For the methods, the author has studied the probability of contamination during the procedure and the possibility of using for obsolete traces of sperm, where the destruction of sperm structure occurred. The author has indicated the possibility of automation of physical systems for forensic examination of molecular and genetic analysis by integrating the stages of sample preparation, cell counting and DNA isolation on a single device, which will reduce the time of the analysis of research objects in the future. The analysis of the literature data showed an improvement in the quality of DNA profiles while using the above methods, so it has been offered to use the presented methods for testing in expert practice.

Key words: molecular and genetic examination, differential lysis, sexual crimes, DNA.

