

**IMPROVING DNA PRESERVATION TECHNIQUES FOR FORENSIC
AND SCIENTIFIC APPLICATIONS**¹National Scientific Center «Hon. Prof. M.S. Bokarius Forensic Science Institute» (Kharkiv, Ukraine)²The Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)nadiiachernobai@gmail.com

The resolution of pressing issues in forensic science, medicine, and other scientific research requires the development of methods for long-term storage of DNA samples. This issue is becoming increasingly important against the backdrop of advancements in cutting-edge technologies that enable the efficient preservation of genetic information and its application in various fields.

The aim of this study was to explore new, more effective methods for obtaining and storing DNA samples from human touch DNA traces.

Control human DNA from the "GlobalFiler™" test kit (USA) at a final concentration of 0.5 ng/μl was used as the DNA matrix. Genetic material was collected from sweat and grease secretions on fingertip ridges. DNA swabs from human fingerprint residues were stored at various temperatures ranging from 20°C to -196°C for 30 days.

The results demonstrated that storage at room temperature (20°C) caused significant DNA degradation. Lowering the storage temperature increased DNA integrity preservation after thawing. The use of a modified buffer (10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.5% v/v Tween 20, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 5% glycerol, 0.1% NaN₃ (sodium azide), sterile deionized water) during DNA extraction proved more effective compared to deionized water, reducing DNA loss even at room temperature.

The conducted research underscores the need to improve DNA preservation methods in forensic and research practices and highlights the effectiveness of cryopreservation in extending the shelf life of DNA samples

Key words: DNA, long-term storage, cryopreservation, forensic analysis.

Connection of the publication with planned research works.

The work was carried out as part of the research project with the project code II.8.5-2022/3 "Development of Methodological Recommendations for Conducting Forensic Molecular-Genetic Examination Using Cryopreservation of Human Biological Material".

Introduction.

Long-term storage of DNA samples has significant scientific, medical, and legal relevance. This issue is becoming increasingly important in the context of the development of new technologies that enable the effective preservation of genetic information and its application across various fields.

In forensics, DNA samples obtained from crime scenes are crucial for identifying individuals and establishing facts related to criminal activities. Preserving such samples not only allows for confirming or disproving the guilt of suspects but also enables the review of previously made court decisions in cases where new technologies provide more accurate and detailed analysis results. The ability to reanalyze DNA samples is especially important as new genetic research methods emerge or when verifying the potential for errors in criminal investigations.

In a medical context, the storage of DNA is critically important for studying genetic diseases, particularly those where heredity or specific genetic variants may manifest only after a certain period. Genetic research can help identify predispositions to various diseases, enabling timely prevention or the development of new treatment methods [1, 2].

The role of DNA preservation is also essential in scientific research on evolution and biodiversity. Genetic samples from different species allow for comparative genome analysis, which facilitates the reconstruction of

evolutionary processes and the understanding of genetic relationships between species.

With the advancement of modern preservation methods, such as cryopreservation, the long-term storage of DNA has become technically feasible, opening new horizons for future scientific research [3]. Moreover, the continuous improvement of preservation techniques allows not only for the storage of DNA itself but also of other biological materials, which is valuable for a wide range of scientific disciplines, from genomics to ecology [4, 5].

Thus, the long-term storage of DNA samples is a vital component in the progress of modern science and medicine, creating new opportunities for research, diagnosis, treatment, and justice.

The aim of the study.

To develop an optimal method for obtaining and storing DNA samples with a high concentration over time.

Object and research methods.

As the DNA matrix, control human DNA from the «GlobalFiler™» test kit (USA) was used at a final concentration of 0.5 ng/μL. DNA preparations (20 μL each) were applied to an intact plastic surface and dried for two days at 22°C in a closed PCR box without UV illumination. Washes were performed using sterile cotton fabric moistened with 20 μL of deionized water, and the washes were stored under the same conditions. After the storage period, 20 μL of deionized water was applied to the fabric.

For genetic material, sweat and sebaceous secretions from the fingertips of 10 individuals (5 men and 5 women) aged 18 to 48 years were used. The study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration on the Protection of Human Rights, the Council of Europe Convention on Human Rights and

Biomedicine, and the provisions of the relevant laws of Ukraine. Written informed consent was obtained from all individuals who participated in the study. Prior to the study, the participants' hands were not exposed to water or cleaning agents for 1-2 hours. The fingerprint material from both hands was applied to a pre-sterilized and DNA-free smooth surface by pressing and rolling the fingertips with moderate force for 5 seconds. The contact area for each finger was 6 cm². Biological material was collected 20-30 minutes after the fingerprints were applied by washing with sterile cotton fabric (0.5×0.5 cm), soaked in buffer solution or deionized water. Each fingerprint wash collected on the cotton fabric was placed in a separate 1.5 mL Eppendorf tube. The tubes were centrifuged at 14,000-15,000 rpm for 5 minutes. The filtrate from the washes in the 1.5 mL Eppendorf tubes was incubated in a thermoshaker at 70°C for 15 minutes. After incubation, the samples were mixed at low speed and briefly centrifuged. Filtrate incubation was performed under three conditions: at room temperature for 30 minutes (control samples), at 70°C for 30 minutes, and at 99°C for 8 minutes. After incubation, the samples were vortexed at low speed for 5 seconds and briefly centrifuged.

DNA washes were performed using either deionized water or a modified buffer solution with the following composition: 10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.5% (v/v) Tween 20, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA (ethylene-diamine-N,N,N',N'-tetraacetate), 5% glycerol, 0.1% NaN₃ (sodium azide), and sterile deionized water.

To obtain storage data, groups were formed as follows: washes labeled as «0 days» (not subjected to storage) and washes stored for 5, 7, and 30 days at an ultra-low temperature of -196°C. Cryopreservation was performed in 1.5 mL Eppendorf tubes by directly immersing 25 µL samples in liquid nitrogen. Negative storage controls were samples stored at room temperature (20°C) for the same periods. Five replicates were prepared for each storage condition.

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA).

Research results and their discussion.

Fingerprints are among the most informative and commonly encountered evidence at crime scenes. Today, alongside dactyloscopic visualization methods, molecular genetic analysis is one of the most reliable approaches for examining biological traces, including human sweat and sebaceous traces (SSTs). The choice of detection and collection methods for SSTs, as well as their transportation and storage duration prior to molecular genetic studies, plays a crucial role. In forensic practice, when working with SST washes collected at the crime scene using deionized water, obtaining a complete genetic profile of the individual who left the traces poses significant challenges [6]. At this stage of the study, the objective was to investigate the potential degradation of DNA in washes performed with deionized water during storage over time.

It was found that the mean values for the groups «0 days», «5 days», «7 days», and «30 days» indicate that after

5-7 days, the DNA concentration in washes performed with deionized water and stored at room temperature decreases on average by 18-23 times. For washes stored for 30 days, the DNA concentration decreases by approximately 170 times (**figure 1**).

There is a statistically significant difference in DNA concentrations between the washes stored for 5, 7, and 30 days at room temperature and those stored under ultra-low temperatures (-196°C). Notably, after thawing cryopreserved samples, the mean values for the groups «0 days», «5 days», «7 days», and «30 days» indicate that DNA concentration in washes stored under ultra-low temperatures remains unchanged over 5-30 days.

The conducted study confirms the hypothesis of significantly reduced DNA degradation in washes stored at low temperatures, even in the absence of DNA-stabilizing agents.

The search for optimal DNA extraction methods is a critical aspect of genetic research, as it determines the accuracy, efficiency, and reliability of subsequent analyses. A comparison was made between the number of identified alleles at the studied loci obtained using washes with deionized water and those using the proposed buffer with 5% glycerol.

The results show that the use of the buffer allows the identification of 52.8% of alleles, representing the presence of all allele states at the studied loci (**figure 2**). In contrast, washes with deionized water demonstrated the absence of a high-quality amplification product (allele dropout) at the studied loci, with only 14.1% of alleles identified.

During the genotyping of sweat and sebaceous washes, which is the most challenging identification task due to the extremely low amount of genetic material contained in it, washes performed using the proposed buffer allowed the identification of alleles at the studied loci an average of 4 times more frequently compared to washes performed with deionized water.

Given that the proposed buffer allows for higher-quality DNA material extraction, comparative studies on sample preservation were conducted depending on the method of wash collection. It was shown that when samples obtained using deionized water were stored at 20°C, DNA concentration decreased by 7.5 times after 7 days, and by more than 18.5 times after 30 days (**figure 3**). In washes performed with the proposed buffer

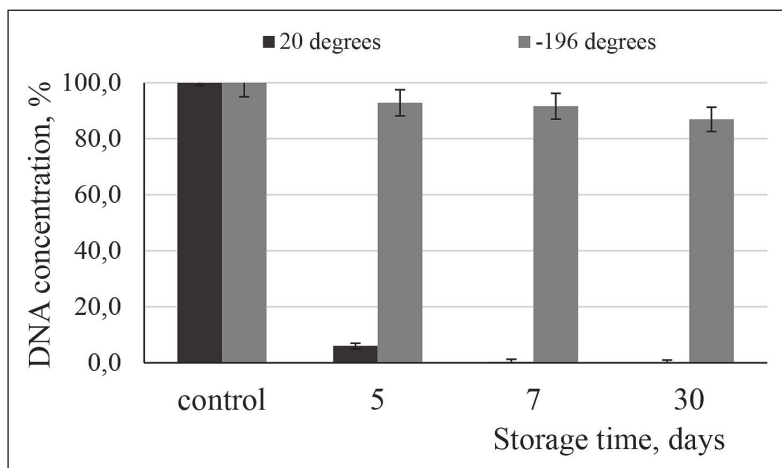


Figure 1 – DNA concentration in samples obtained using deionized water after storage for 5, 7, and 30 days at temperatures of 20°C and -196°C.

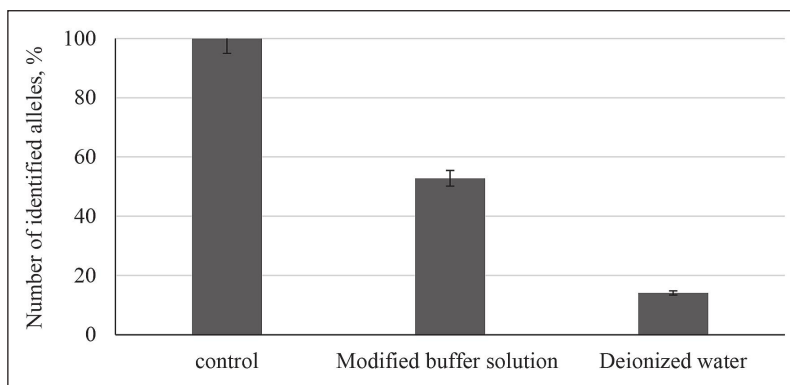


Figure 2 – DNA profile values calculated from the results of typing human sweat and sebaceous samples collected using washes with deionized water or a buffer with 5% glycerol, compared to the control – complete (100%) typing of the samples.

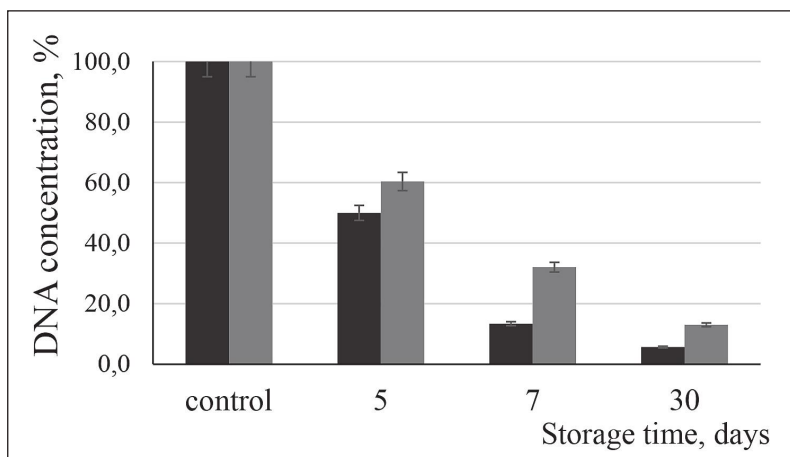


Figure 3 – DNA concentration in samples obtained using deionized water and modified buffer, after storage for 5, 7, and 30 days at 20°C.

Notes: ■ – deionized water, ■ – buffer with 5% glycerol.

mixture, the concentration of active DNA template decreased by 3.2 times after 7 days, and by 7.9 times after one month compared to the control group (0 days of storage). It should be noted that after 30 days, the buffer containing 5% glycerol continued to exert a stabilizing effect on the DNA, unlike deionized water.

Thus, the storage of swabs made using the proposed buffer solution – 5% glycerol buffer – for 30 days at room temperature (20°C) is equivalent to the storage of swabs made with deionized water for one week.

The obtained results can be explained by the presence of the chaotropic agent Tween 20 in the proposed buffer, which, during the swabbing process, causes disruption of cellular structures in the sample and filtrate, facilitating the access of DNA polymerase (Taq) and primers to the DNA matrix. Thanks to the stabilizers for PCR (Tween 20, KCl, glycerol) included in the buffer, the half-life of Taq DNA polymerase at 95°C during the DNA denaturation step is extended.

Table – DNA concentration in samples obtained using the modified liquid medium, depending on the storage time and temperature

T, °C	DNA concentration, %				
	control	0 days	5 days	7 days	30 days
20	100±0,028	96,25±0,08	59,17±0,12	31,08±0,12	12,54±0,14
4	-	93,82±0,10	75,09±0,14	39,70±0,11	23,97±0,08
-20	-	98,87±0,02	96,07±0,10	93,26±0,07	57,11±0,11
-196	-	99,98±0,01	99,62±0,02	97,94±0,06	94,19±0,02

The most important component for preserving the biomaterial in its native state at low temperatures during storage is the 5% glycerol, which has a proven protective function on cell structures during freezing. One of the constant components of buffer compositions is 0.01-0.4% NaN₃, which provides a strong antimicrobial and antifungal effect without inhibiting PCR.

The proposed buffer also includes 0.01-0.5 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetate). In animal tissues, iron ions (Fe²⁺ and Fe³⁺) are present in large quantities as part of hemoglobin and are released during its denaturation. The binding constant of EDTA to iron ions is $\approx 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ (Fe²⁺) and $\approx 10^{-24} \text{ M}^{-1}$ (Fe³⁺) [7]. Therefore, the presence of EDTA in the buffer eliminates the inhibitory effect of iron ions on PCR. At the same time, low concentrations of EDTA in the buffer do not inhibit PCR, thus not hindering «direct» PCR.

A slightly alkaline environment is optimal for DNA sample storage. Therefore, to create the buffer capacity, maintain a slightly alkaline pH, and stabilize DNA molecules, a Tris solution (1-40 mM Tris) is used.

The use of the modified buffer for DNA sample storage for 5, 7, and 30 days at different temperatures showed (table) that at 20°C, the DNA concentration in the swabs decreased by 1.7 times on day 5, 3.2 times on day 7, and

7.9 times on day 30. When the storage temperature was reduced to 4°C, the DNA concentration also significantly decreased starting from day 5, with a 4.2-fold decrease by day 30.

Storing samples with the modified buffer at negative temperatures significantly improved DNA preservation over the entire storage period compared to swabs collected using deionized water. At -20°C, the DNA concentration significantly decreased after 7 days of storage, and by day 30, the measured concentration had decreased only 1.75 times. At liquid nitrogen temperatures, the DNA concentration in the samples did not show any significant decrease throughout the entire storage period.

The results obtained showed that the use of the modified liquid medium for DNA matrix storage, instead of regular deionized water, provides better preservation over 30 days.

The conducted study confirms the assumption of significantly reduced potential DNA degradation in samples treated with the modified medium and stored at low temperatures, even in the absence of DNA stabilizing factors. This is particularly important for samples of fingerprint residues, which contain small amounts of genetic material.

Conclusions.

It was shown that when storing human fingerprint residue samples (PJR) at room temperature, a sharp decrease in DNA concentration is observed,

especially after 30 days (by 170 times). In contrast, when stored under ultra-low temperatures (-196°C), the DNA concentration remains practically unchanged.

It was found that, compared to deionized water, the modified buffer with glycerol (5%) and other stabilizing additives contributes to higher DNA concentration in samples after storage. Specifically, the use of the buffer reduces DNA degradation even at room temperature, which is particularly important when working with low-concentration biological traces.

The studies conducted showed that storage of samples at ultra-low temperatures significantly increases DNA stability. At the temperature of liquid nitrogen

(-196°C), no DNA degradation was observed, even after long-term storage for 30 days.

Prospects for further research.

Future research should focus on optimizing DNA preservation buffers and exploring alternative storage methods, such as portable cryopreservation, to improve DNA integrity in diverse conditions. Additionally, studies on the long-term effects of ultra-low temperature storage and the impact of environmental factors on DNA degradation could further enhance preservation techniques for forensic, medical, and scientific applications.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-4-175-510-517

УДК 577.15:343.9

^{1,2}Чернобай Н. А., Булавина В. С., Руднева К. Є.

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ЗБЕРЕЖЕННЯ ДНК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В СУДОВІЙ ЕКСПЕРТИЗІ І НАУКОВІЙ ПРАКТИЦІ

¹Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокариуса» (м. Харків, Україна)

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

nadiiachernobai@gmail.com

Вирішення загальних питань криміналістики, медицини та інших наукових досліджень потребує розробки методів довгострокового зберігання ДНК зразків. Це питання стає все більш важливим на тлі розвитку новітніх технологій, що дозволяють ефективно зберігати генетичну інформацію та використовувати її в різних сферах.

Метою даної роботи був пошук нових, більш ефективних способів отримання та зберігання ДНК зразків потожирових слідів людини.

Як ДНК-матрицю використовували контрольну ДНК людини з тест-набору «GlobalFiler™» (США) у кінцевій концентрації 0,5 нг/мкл. В якості генетичного матеріалу досліджували потожирові виділення подушечок пальців. Тампони ДНК із залишків відбитків пальців людини зберігалися при різних температурах в діапазоні від 20°C до -196°C протягом 30 днів.

Результати дослідження показали, що зберігання при кімнатній температурі (20°C) викликала значну деградацію ДНК. Зниження температури зберігання сприяло збільшенню збереженості цілісності ДНК після відігрівання. Використання модифікованого буфера (10 мМ Тріс (гідроксиметил) амінометан, 0,5% об. Твін 20, 50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA (етилендіамін-N,N,N',N'-тетраацетат), 5% гліцерин, 0,1% NaN₃ (азид натрію), стерильна деіонізована вода) при виділенні ДНК було більш ефективним, порівняно з деіонізованою водою, та зменшувало втрату ДНК навіть за кімнатної температури.

Проведені дослідження підкреслюють необхідність удосконалення методів збереження ДНК у судово-медичній та дослідницькій практиці та ефективність використання кріоконсервування для збільшення термінів збереженості ДНК зразків.

Ключові слова: ДНК, довготривале зберігання, кріоконсервування, судова експертиза.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана в рамках науково-дослідної роботи з шифром проекту ІІ.8.5-2022/3 «Розробка методичних рекомендацій щодо проведення судово-медичної молекулярно-генетичної експертизи з використанням кріоконсервування біологічного матеріалу людини».

Вступ.

Зберігання ДНК зразків протягом тривалого часу має значну наукову, медичну та правову актуальність. Це питання стає все більш важливим на тлі розвитку новітніх технологій, що дозволяють ефективно зберігати генетичну інформацію та використовувати її в різних сферах.

У криміналістиці зразки ДНК, отримані на місці злочину, мають вирішальне значення для ідентифікації осіб і встановлення фактів, пов'язаних зі злочином.

Збереження таких зразків дозволяє не лише підтвердити або спростувати вину підозрюваних, а й переглядати раніше ухвалені судові рішення у випадках, коли нові технології дозволяють отримати більш точні та детальні результати аналізів. Важливою є можливість використання зразків ДНК для повторного аналізу за умови розвитку нових методів генетичного дослідження, або перевірки наявності помилок у кримінальних справах.

У медичному контексті зберігання ДНК є критично важливим для вивчення генетичних захворювань, де спадковість або певні генетичні варіанти можуть проявлятися лише через певний проміжок часу. Генетичні дослідження можуть допомогти ідентифікувати схильність до різних захворювань, що дозволяє проводити своєчасну профілактику або розробляти нові методи лікування [1, 2].

Також важливою є роль збереження ДНК в контексті наукових досліджень у галузі еволюції та біорізноманіття. Генетичні зразки з різних видів організмів дозволяють здійснювати порівняльний аналіз геномів, що дає змогу відтворювати еволюційні процеси та з'ясувати генетичні зв'язки між видами.

З розвитком сучасних методів зберігання, таких як криозберігання, зберігання ДНК на тривалий період стало технічно можливим, що відкриває нові горизонти для майбутніх наукових досліджень [3]. Крім того, постійне вдосконалення методів збереження дозволяє зберігати не лише саму ДНК, а й інші біологічні матеріали, що має значення для широкого спектра наукових напрямків, від геноміки до екології [4, 5].

Таким чином, зберігання ДНК зразків на довгий термін є важливим компонентом розвитку сучасної науки та медицини, відкриваючи нові можливості для досліджень, діагностики, лікування та правосуддя.

Мета дослідження.

Розробка оптимального способу отримання та збереження ДНК зразків з високим рівнем концентрації протягом часу.

Об'єкт і методи дослідження.

Як ДНК-матрицю використовували контрольну ДНК людини з тест-набору «GlobalFiler™» (США) у кінцевій концентрації 0,5 нг/мкл. Наносили по 20 мкл препаратів ДНК на інтактну пластикову поверхню і сушили протягом двох діб за 22°C у закритому ПЛР-боксі без включення УФІ. Проводили змиви за допомогою стерильної бавовняної тканини, змоченої в 20 мкл деіонізованої води, і зберігали виконані змиви в зазначених вище умовах. Після закінчення терміну зберігання на тканину наносили по 20 мкл деіонізованої води.

Як генетичний матеріал використовували потожиріві виділення подушечок пальців 10 осіб (5 чоловіків і 5 жінок) віком від 18 до 48 років. Дослідження проводилося відповідно до принципів Гельсінської декларації про захист прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину та положень відповідних законів України. Від усіх осіб, які брали участь у дослідженні, було отримано письмову інформовану згоду. Перед проведенням дослідження руки випробовуваних не піддавалися контакту з водою та очищенню за 1-2 години. Нанесення потожирової речовини подушечок пальців обох рук на заздалегідь стерильну та очищену від можливої наявності сторонньої ДНК гладеньку поверхню здійснювали шляхом їхнього одноразового контакту з помірною силою натискання та прокочуванням протягом 5 секунд. Поле контакту для кожного пальця становило 6 см². Вилучення біологічного матеріалу проводили через 20-30 хвилин після нанесення відбитків шляхом змивів на стерильну бавовняну тканину, розміром 0,5×0,5 см, просочену буфером або деіонізованою водою. Кожен змив на бавовняній тканині, отриманий від одного відбитка пальця, поміщали в окрему 1,5 мл пробірку типу Еппендорф. Центрифугували пробірки за 14000-15000 об/хв протягом 5 хвилин. Фільтрат виконаних змивів, що знаходиться в 1,5 мл пробірках типу Еппендорф, інкубували в термощейкері за температури 70°C протягом 15 хвилин. Після проведеної інкубації зразки перемішували на низьких обертах і коротко центрифугували. Проводили інкубацію фільтратів у трьох режимах: за кімнатної температури впродовж 30 хвилин (контрольні зразки), за 70°C впродовж 30 хвилин і за

99°C впродовж 8 хвилин. Після проведення інкубації зразки перемішували на вортексі за низьких обертів 5 секунд, потім коротко центрифугували.

Змиви ДНК матеріалу робилися за допомогою деіонізованої води або з використанням модифікованого буферного середовища з наступним складом: 10 mM Tris (гідроксиметил) амінометан, 0,5% об. Твін 20, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA (етилендіамін-N,N,N',N'-тетраацетат), 5% гліцерин, 0,1% NaN₃ (азид натрію), стерильна деіонізована вода.

З метою отримання даних по зберіганню, були сформовані групи: змиви «0 діб» (тобто змиви не піддавалися зберіганню) і змиви, які зберігали протягом 5, 7 і 30 діб за ультранизької температури -196°C. Криоконсервування здійснювали в 1,5 мл пробірках типу Еппендорф шляхом прямого занурення зразків об'ємом 25 мкл у рідкий азот. Негативним контролем зберігання були зразки, які зберігали за кімнатної температури (20°C) такий самий за тривалістю час. Кожному терміну відповідали по 5 паралелей.

Статистичний аналіз проводився з використанням одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA).

Результати дослідження та їх обговорення.

Відбитки пальців належать до найбільш інформативного і поширеного об'єкта, залишеного на місці злочину. Сьогодні, поряд із методом дактилоскопічної візуалізації, молекулярно-генетичний аналіз є одним із найбільш доказових методів аналізу біологічних слідів, зокрема потожирових слідів (ПЖС) людини. Велике значення має вибір методу виявлення та збору ПЖС, їх транспортування, тривалість зберігання перед здійсненням молекулярно-генетичних досліджень. В експертній практиці під час роботи зі змивами ПЖС, здійсненими на місці події за допомогою деіонізованої води, отримання повного генетичного профілю особи, яка залишила свої сліди, пов'язане зі значними труднощами [6]. На цьому етапі роботи метою було дослідження можливої деградації ДНК у змивах, виконаних за допомогою деіонізованої води під час зберігання із плином часу.

Встановлено, що середні вибірок «0 діб», «5 діб», «7 діб» і «30 діб» вказують на те, що вже за 5-7 діб концентрація ДНК у змивах, виконаних за допомогою деіонізованої води, які зберігалися при кімнатній температурі, зменшується в середньому у 18-23 рази, а в змивах, що зберігалися протягом 30 діб, – у 170 разів (рис. 1).

Наявна достовірність відмінностей у концентраціях ДНК у змивах, які зберігалися протягом 5, 7 і 30 діб при кімнатній температурі, та змивів після зберігання в умовах наднизьких температур (-196°C). Зокрема, після розморожування криоконсервованих зразків середні вибірок «0 діб», «5 діб», «7 діб» і «30 діб» вказують на те, що за 5-30 діб концентрація ДНК у змивах за умови зберігання в умовах наднизьких температур залишається первісною.

Проведене дослідження підтверджує припущення про істотно знижену деградацію ДНК у змивах за умов зберігання за низьких температур, навіть за умов відсутності стабілізуючих ДНК факторів.

Пошук оптимальних способів виділення ДНК є критично важливим аспектом в генетичних дослідженнях, оскільки він визначає точність, ефективність та надійність подальших аналізів. Було порівняно результати по кількості ідентифікованих алельних станів

у досліджуваних локусах, отриманих в результаті змивів деіонізованою водою або за допомогою використання запропонованого буфера з 5% гліцерином.

Можна відзначити, що в разі використання буфера кількість ідентифікованих алелів дорівнює 52,8% і позначає наявність усіх алельних станів у досліджуваних локусах (рис. 2); під час змивів деіонізованою водою відзначається відсутність якісного продукту ампліфікації (випадання алелів) у досліджуваних локусах, кількість ідентифікованих алелів дорівнює 14,1%.

Під час генотипування змивів потожиркової речовини, як найскладнішого об'єкта ідентифікації за рахунок край низької кількості генетичного матеріалу, що міститься в ній, виконаних за допомогою запропонованого буфера, вдається ідентифікувати алелі в досліджуваних локусах в середньому у 4 рази більше у порівнянні зі змивами, виконаними за допомогою деіонізованої води.

Враховуючи, що запропонований буфер дозволяє отримати більш якісний початковий ДНК матеріал, були проведені порівняльні дослідження по збереженості зразків в залежності від способу отримання змивів. Показано, що при зберіганні зразків за температури 20°C, отриманих з використанням деіонізованої води, вже через 7 діб відбувається зниження концентрації ДНК у 7,5 разів, а через 30 діб – у більш ніж 18,5 разів (рис. 3). У змивах, які були виконані за допомогою запропонованої буферної суміші, концентрація активної ДНК-матриці при температурі 20°C знизилася за 7 діб у 3,2 рази, а за місяць – у 7,9 рази порівняно з контролем – 0 діб зберігання. Слід зазначити, що через 30 діб буфер, що містить 5% гліцерину, продовжує чинити свій стабілізуючий вплив на ДНК, на відміну від деіонізованої води.

Таким чином, зберігання змивів, виконаних за допомогою пропонуваного середовища – буфера з 5% гліцерином протягом 30 діб при кімнатній температурі (20°C), рівнозначне зберіганню змивів, виконаних за допомогою деіонізованої води, протягом одного тижня.

Отримані результати можна пояснити наявністю в пропонуваному буфері хаотропного агента Твіна 20, під впливом якого в процесі здійснення змиву у виконаному змиві та його фільтраті відбувається руйнування клітинних структур, і тим самим полегшується доступ ферменту ДНК-Тақ-полімерази і праймерів до ДНК-матриці. Завдяки стабілізаторам ПЛР (Твін 20, KCl, гліцерин), що входять до складу буфера,

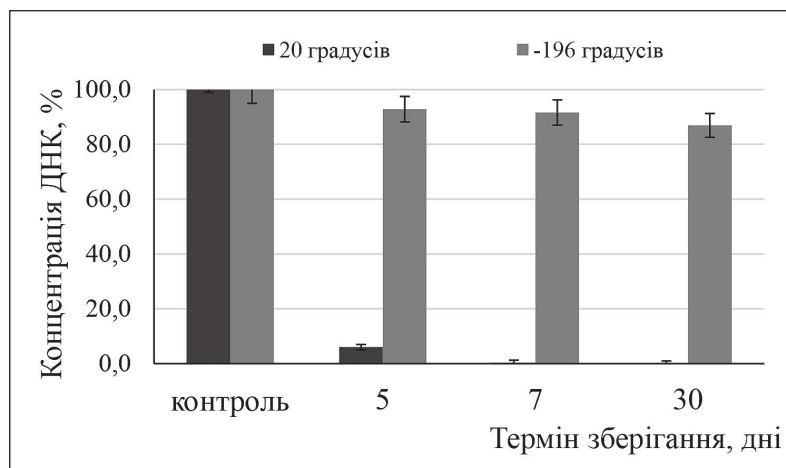


Рисунок 1 – Концентрація ДНК у зразках, отриманих з використанням деіонізованої води, після зберігання протягом 5, 7 та 30 діб за температури 20°C та -196°C.

підвищується час напівжиття ферменту ДНК-Тақ-полімерази за 95°C на етапі денатурації ДНК.

Найбільш важливим для збереження біоматеріалу в нативному стані за низьких температур під час зберігання є 5% гліцерин, щодо якого доведено захисну функцію на структури клітин під час заморожування. Однією з постійних складових буферних композицій є 0,01-0,4% NaN_3 , що чинить виражений антимікробний та антимікотичний ефект без інгібування ПЛР.

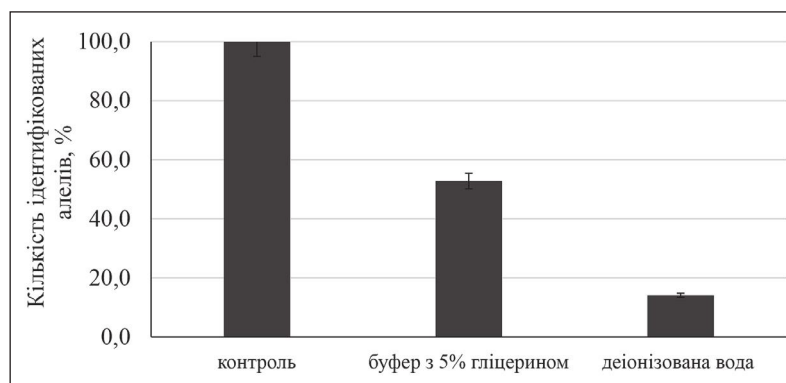


Рисунок 2 – Значення ДНК-профілів, розраховані за результатами типування зразків потожиркової речовини людини, відібраних за допомогою змивів деіонізованою водою або буфером з 5% гліцерином по відношенню до контролю – повне (100%) типування зразків.

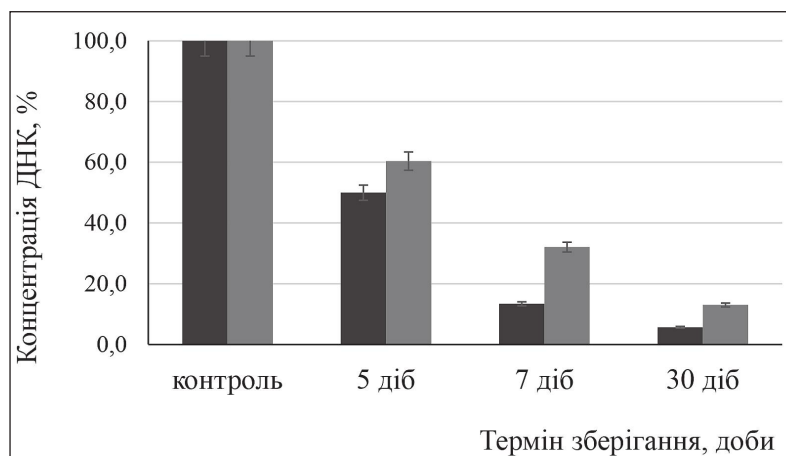


Рисунок 3 – Концентрація ДНК у зразках, отриманих з використанням деіонізованої води та модифікованого середовища, після зберігання протягом 5, 7 та 30 діб за температури 20°C.

Примітки: ■ – деіонізована вода, ■ – буфер з 5% гліцерином.

Таблиця – Концентрація ДНК в зразках, отриманих з використанням модифікованого рідкого середовища, в залежності від терміну та температури зберігання

T, °C	Концентрація ДНК, %				
	Контроль	0 діб	5 діб	7 діб	30 діб
20	100±0,028	96,25±0,08	59,17±0,12	31,08±0,12	12,54±0,14
4	-	93,82±0,10	75,09±0,14	39,70±0,11	23,97±0,08
-20	-	98,87±0,02	96,07±0,10	93,26±0,07	57,11±0,11
-196	-	99,98±0,01	99,62±0,02	97,94±0,06	94,19±0,02

Також до складу запропонованого буфера входить 0,01-0,5 мМ ЕДТА (етилендіамін-N,N,N',N'-тетраацетат). У тваринних тканинах у великих кількостях присутні іони Fe²⁺ і Fe³⁺, що входять до складу гемоглобіну і вивільняються при його денатурації. Константа зв'язування ЕДТА з іонами заліза становить $\approx 10^{-4}$ М⁻¹ Fe²⁺ і $\approx 10^{-24}$ М⁻¹ Fe³⁺ [7]. Таким чином, завдяки наявності ЕДТА у складі буфера усувається інгібіторний ефект іонів заліза на ПЛР. При цьому малі концентрації ЕДТА в буфері самі по собі не чинять інгібуючої дії на ПЛР, тим самим, не перешкоджаючи проведенню «прямої» ПЛР.

Слаболужне середовище є найбільш оптимальним для зберігання препаратів ДНК. Тому для створення буферної ємності, підтримання слаболужного значення рН і стабілізації молекул ДНК використовується розчин Тріс (1-40 мМ Тріс (гідроксиметил) амінометан).

Використання модифікованого буфера для зберігання ДНК зразків протягом 5, 7 та 30 днів при різних температурах показало (таблиця), що за температури 20°C концентрація ДНК у змивах знижується в 1,7 разів на 5 добу, у 3,2 рази на 7 добу та у 7,9 разів на 30 добу зберігання. При зниженні температури зберігання до 4°C концентрація ДНК також починає достовірно знижуватися з 5 доби зберігання, при цьому на 30 добу зберігання концентрація ДНК знижується у 4,2 рази.

Зберігання зразків, отриманих за допомогою модифікованого буфера, за від'ємних температур дозволило суттєво покращити результати збереженості ДНК зразків протягом всього терміну зберігання порівняно зі змивами, отриманими з використанням діанізваної води. Так, за температури -20°C достовірно зниження концентрації ДНК відбувалося на 7 добу зберігання, при цьому на 30 добу досліджуваний показник знижувався лише 1,75 разів. За температури рідкого азоту концентрація ДНК в досліджуваних зразках до-

стовірно не знижувалася протягом всього терміну зберігання.

Отримані результати показали, що використання модифікованого рідкого середовища для зберігання ДНК-матриці замість звичайної деіонізованої води, дозволяє отримати кращі показники збереженості протягом 30 діб.

Проведене дослідження підтверджує припущення про істотно знижену можливу деградацію ДНК у виконаних змивах за умов використання модифікованого середовища та зберігання за низьких температур, навіть за умов відсутності стабілізуючих ДНК факторів. Це має особливе значення щодо змивів потожирової речовини, де міститься мала кількість генетичного матеріалу.

Висновки.

Показано, що при зберіганні зразків потожирових слідів (ПЖС) людини при кімнатній температурі спостерігається різке зниження концентрації ДНК, особливо через 30 діб (у 170 разів). Натомість, при зберіганні в умовах ультранизких температур (-196°C) концентрація ДНК залишається практично незмінною.

Встановлено, що у порівнянні з деіонізованою водою, модифікований буфер з гліцирином (5%) та іншими стабілізуючими добавками сприяє вищій концентрації ДНК у зразках після зберігання. Зокрема, застосування буфера дозволяє зменшити деградацію ДНК навіть при кімнатній температурі, що особливо важливо для роботи з біологічними слідами низької концентрації.

Проведені дослідження показали, що зберігання зразків за наднизьких температур значно підвищує стабільність ДНК. При температурі рідкого азоту (-196°C) деградації ДНК не спостерігається навіть після тривалого зберігання протягом 30 діб.

Перспективи подальших досліджень.

Майбутні дослідження мають бути спрямовані на оптимізацію буферів для збереження ДНК та вивчення альтернативних методів зберігання, таких як портативна кріоконсервація, для покращення цілісності ДНК в різних умовах. Крім того, дослідження довгострокових наслідків зберігання при наднизьких температурах і впливу факторів навколишнього середовища на деградацію ДНК можуть сприяти подальшому вдосконаленню методів консервації для судово-медичних і наукових застосувань.

References / Література

1. GE Healthcare Life Sciences. Your forensic samples, our experience. Buckinghamshire: GE Healthcare Life Sciences; 2010. 28 p. Available from: https://www.dulis.nl/technical-sheets/W/WB/WB1/WB100032/WB100032_BR.pdf.
2. Chum PY, Haimes JD, Andre CP, Kuusisto PK, Kelley ML. Genotyping of Plant and Animal Samples without Prior DNA Purification. J. Vis. Exp. 2012;(67):e3844. DOI: <https://doi.org/10.3791/3844>.
3. Gray MA, Pratte ZA, Kellogg CA. Comparison of DNA preservation methods for environmental bacterial community samples, FEMS Microbiology Ecology. 2023;83(2):468-477. DOI: <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12008>.
4. Kline MC, Redman J, Duewer DL, Parker B, Peter J, Butler J. Recovery of DNA from Aged Bloodstains. Maryland: SAIC-Frederick Inc; 2005. 680 p.
5. Faleeva T, Ivanov I, Mishin E, Vnukova N, Kornienko I. The problem of molecular-genetic identification of sweat and grease deposits in the human fingerprints. Sudebno-meditsinskaya ekspertiza. 2016;59(14):14-18. DOI: <https://doi.org/10.17116/sudmed201659214-18>.
6. Sillen LG, Martell AE. Stability Constants of Metal Ion Complexes. London: The Chemical Society; 1964. 545 p.
7. Lee SB, Crouse CA, Kline MC. Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts. Forensic Science Review. 2010;22(2):131-144.

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ЗБЕРЕЖЕННЯ ДНК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В СУДОВІЙ ЕКСПЕРТИЗІ І НАУКОВІЙ ПРАКТИЦІ

Чернобай Н. А., Булавина В. С., Руднева К. Є.

Резюме. Дослідження присвячено вивченню способів отримання та довготривалого зберігання ДНК зразків з метою використання їх у різних сферах, зокрема криміналістиці, медицині тощо. У судовій експертизі збереження ДНК є необхідним для ідентифікації осіб та підтвердження кримінальних розслідувань, що дозволяє повторно аналізувати докази за допомогою сучасних технологій, забезпечуючи справедливості у

судових рішеннях. У медицині збереження ДНК допомагає вивчати генетичні захворювання та схильності, що сприяє своєчасній ідентифікації, ранній профілактиці та розробці ефективних методів лікування. Крім того, збереження ДНК відіграє важливу роль у дослідженнях еволюції, надаючи інформацію про біорізноманіття та генетичні зв'язки між видами.

Метою цього дослідження було розробити оптимальний метод отримання та зберігання зразків ДНК з високою концентрацією протягом часу.

Об'єкт і методи дослідження. Змиви ДНК з залишків відбитків пальців людини були зібрані за допомогою деіонізованої води або модифікованого буфера (10 мМ Tris (гідроксиметил) амінометан, 0,5% об. Твін 20, 50 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA (етилендіамін-N,N,N',N'-тетраацетат), 5% гліцерин, 0,1% NaN₃ (азид натрію), стерильна деіонізована вода). Зберігання проводилось протягом 0-30 діб при температурах 4°C, 20°C, -20°C та -196°C.

Результати. Дослідження зосереджено на вдосконаленні методів зберігання ДНК, зокрема для біологічних слідів з низькою концентрацією, таких як залишки відбитків пальців людини. Результати показали, що зразки, збережені при кімнатній температурі, зазнають різкого зниження концентрації ДНК, особливо після 30 діб. Однак зразки, збережені при наднизьких температурах (-196°C), майже повністю зберігають свою цілісність. Модифікований буфер з 5% гліцерином та іншими стабілізуючими агентами для виконання змивів виявився більш ефективним, ніж деіонізована вода, знижуючи деградацію ДНК навіть при кімнатній температурі.

Отримані результати підкреслюють важливість оптимізації технік збереження ДНК, особливо в судовій та медичній практиці, для забезпечення надійності та точності генетичного аналізу протягом часу.

Ключові слова: ДНК, довготривале зберігання, кріоконсервування, судова експертиза.

IMPROVING DNA PRESERVATION TECHNIQUES FOR FORENSIC AND SCIENTIFIC APPLICATIONS

Chernobai N. A., Bulavina V. S., Rudnieva K. E.

Abstract. The study focuses on methods for obtaining and long-term storage of DNA samples for their application in various fields, including forensic science, medicine, and others. In forensic investigations, DNA preservation is essential for identifying individuals and verifying criminal cases, enabling re-analysis of evidence using advanced technologies and ensuring fairness in judicial decisions. In medicine, DNA storage aids in studying genetic disorders and predispositions, facilitating timely identification, early prevention, and the development of effective treatment methods. Additionally, DNA preservation plays a vital role in evolutionary research, providing insights into biodiversity and genetic links between species.

The aim of this study was to develop an optimal method for obtaining and preserving DNA samples with high concentration over time.

Object and research methods. DNA extractions from human fingerprint residues were collected using deionized water or a modified buffer (10 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.5% v/v Tween 20, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 5% glycerol, 0.1% NaN₃ (sodium azide), sterile deionized water). Storage was carried out for 0–30 days at temperatures of 4°C, 20°C, -20°C, and -196°C.

Results. The research focused on improving DNA storage methods, particularly for biological traces with low concentrations, such as human fingerprint residues. The results showed that samples stored at room temperature experienced a sharp decrease in DNA concentration, especially after 30 days. However, samples stored at ultra-low temperatures (-196°C) almost entirely retained their integrity. The modified buffer containing 5% glycerol and other stabilizing agents proved more effective than deionized water in reducing DNA degradation, even at room temperature.

The findings highlight the importance of optimizing DNA preservation techniques, especially in forensic and medical practices, to ensure the reliability and accuracy of genetic analyses over time.

Key words: DNA, long-term storage, cryopreservation, forensic science.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Chernobai N. A.: <https://orcid.org/0000-0002-5736-9277>^{BCD}

Bulavina V. S.: <https://orcid.org/0000-0001-8746-9693>^{AD}

Rudnieva K. E.: <https://orcid.org/0000-0002-7676-749X>^{AEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors of the article confirm that they have no conflict of interest. / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Chernobai Nadiia Andriyivna / Чернобай Надія Андріївна

National Scientific Center «Hon. Prof. M.S. Bokarius Forensic Science Institute» / Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса»

Ukraine, 61177, Kharkiv, 8-A Zolochivska str. / Адреса: Україна, 61177, м. Харків, вул. Золочівська 8-А

Tel: +380500515110 / Тел.: +380500515110

E-mail: nadiiachernobai@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 10.07.2024 / Стаття надійшла 10.07.2024 року

Accepted 19.11.2024 / Стаття прийнята до друку 19.11.2024 року