

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**



МЕТОДИКА

**ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА
ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

(шифр специальности – 25.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика дифференцирования биологических объектов на вещественных доказательствах
2. Шифр специальности методики	25.1(11)
3. Информация о разработчике методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК
4. Сущность методики	Дифференцирование антигенов спермы и влагалищных клеток в смешанных пятнах на вещественных доказательствах
4.1. Объекты исследования	Смешанные пятна
4.2. Методы исследования	Серологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	Метод дифференциального лизиса клеток (влагалищный эпителий и сперматозоиды) Диагностика менструального происхождения крови в пятнах на вещественных доказательствах электрофоретическим методом. Дифференцирование антигенов крови и выделения по системе АВ0
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №1 от 18.06.2020г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК

ОГЛАВЛЕНИЕ

МЕТОДИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Метод дифференциального лизиса клеток (влагалищный эпителий и сперматозоиды)

Техника проведения реакции.....5

Учет результатов.....5

Диагностика менструального происхождения крови в пятнах на вещественных доказательствах электрофоретическим методом.

Оборудование.....5

Реактивы и реагенты.....5

Замечания по приготовлению реактивов.....5

Подготовка материала к исследованию.....6

Метод электрофоретического исследования.....7

Тактика эксперта при проведении исследования. Оценка результатов.....8

Дифференцирование антигенов крови и выделений по системе АВ0

Метод дифференцирования антигенов крови и выделений по системе АВ0 аффинной хроматографией.....9

Метод дифференцирования антигенов крови и выделений по системе АВ0 с применением сывороток с высоким титром.....10

Метод дифференцирования антигенов крови и выделений по системе АВ0 методом тепловой обработки.....10

Метод дифференцирование антигенов системы АВ0 спермы и влагалищных выделений.....10

Метод дифференцирование антигенов системы АВ0 спермы и влагалищных выделений ракетным иммуноэлектрофорезом12

Перечень использованных источников.....13

МЕТОДИКА ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Метод дифференциального лизиса клеток (влагалищный эпителий и сперматозоиды)

Введение

В связи с тем, что представленные на экспертизу следы спермы, как правило, имеют примесь эпителиальных клеток или крови жертвы, возникает необходимость их разделения. С этой целью применяется техника «дифференциального лизиса», заключающаяся в следующем. Во время предварительной инкубации в растворе, содержащем лизирующие агенты и протеолитический фермент, происходит разрушение клеточных оболочек и ядер эпителия, клеток крови.

Техника постановки реакции

1. Исследуемый материал помещают в микроцентрифужную пробирку, предварительно внося в нее 1 мл дистиллированной воды. Экстрагирование при комнатной температуре или в условиях холодильника от 2 до 20 часов (в зависимости от давности пятна). Вместо дистиллированной воды можно использовать 10% раствор аммиака или ТЕ буфер.

2. Тщательно перемешивают содержимое пробирки. Затем иголкой делают отверстие диаметром 0,5-1 мм в дне пробирки, помещают ее как верхнюю в другую аналогичную или несколько большего диаметра пробирку. На центрифуге (3 минуты при 4000 об/мин) через отверстие отжимают содержимое из верхней пробирки в нижнюю. Отфильтрованная жидкость представляет собой взвесь содержащихся в пятне клеток и их элементов. Можно просто перенести супернатант (надосадочную жидкость) в чистую пробирку, но при этом часть клеток теряется.

3. Отфильтрованную жидкость центрифугируют в течении 1 мин. При 10 000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, оставляя на дне 50 мкл вместе с осадком. Осадок в объеме 1-2 мкл используют для микроскопии, при этом возможно обнаружение различных клеток и их элементов, а также сперматозоидов. Окрашивают азур-эозиновой смесью, добавив 1-2 капли ее к 1-2 мкл осадка.

4. К взвеси клеточного осадка (приблизительно 50 мкл) добавляют 150 мкл дистиллированной воды и 2-3 мкл **протеиназы К**, встряхивают и ставят в термостат на 2 часа при +37°С. На данном этапе происходит разрушение клеток крови, слюны, влагалищного эпителия. Напротив, головки сперматозоидов преимущественно сохраняются, так как их белковые компоненты содержат достаточно большое количество серосодержащих аминокислот и образуют много дисульфидных связей, что в целом повышает устойчивость структуры к действию детергентов и протеиназ. Более короткие и более длительные сроки инкубации, чем указанные, не рекомендуются, так как могут привести либо к неполному лизису эпителиальных клеток, либо к лизису сперматозоидов.

5. Содержимое пробирки центрифугируют в течении 5 минут при 10 000 об/мин, супернатант удаляют, оставляя в пробирке 50 мкл. Небольшое

количество (1-2 мкл) осадка используют для микрокопирования, при этом обнаруживаются головки сперматозоидов.

Диагностика менструального происхождения крови в пятнах на вещественных доказательствах электрофоретическим методом

Оборудование: аппарат для электрофореза ЭПАУ-20-50 или ПЭФ-3х; фиксирующие рамки (от комплекта аппарата ЭПАУ-20-50), трафарет с резиновой прокладкой (также от комплекта аппарата ЭПАУ-20-50), пластмассовый наконечник для формирования лунок пинцеты; мостики из фильтровальной бумаги (в 4 слоя), секундомер, весы торсионные или аналитические; ацетат-целлюлозные мембраны размерами 90х90 см.

Реактивы и реагенты: мединал, веронал, нигрозин (или амидочерный 10В или КумассиR-250, бромфеноловый синий, сульфосалициловая кислота, трихлоруксусная кислота, изосыворотка любой группы, уксусная кислота, трипсин кристаллический. .

Замечания по приготовлению реактивов:

-электродный буфер (рН 8,6) готовят следующим образом: 8,76 г мединала. 1,36 г веронала помещают в колбу, заливают 700-800 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до 1000 мл. При ЭПАУ-20-50 достаточно 1000 мл буфера, с ПЭФ-3 - требуется 2000 мл; раствор трипсина готовят путем растворения 10 мг трипсина в 5 мл рабочего буфера дистиллированной водой в соотношении 1:10. Для приготовления 0.01% к 0,5 мл 0,2% раствора добавить 10,5 мл разведенного рабочего буфера. Раствор готовят непосредственно перед использованием, т.к. хранению они не подлежат;

-жидкая изосыворотка, используемая для контроля разгонки белковых фракций, смешивается рабочим буфером в соотношении 1:10;

-5%раствор бромфенолового синего, применяемый в качестве лидирующего красителя, дистиллированной воде;

-красящий раствор нигрозина, являющийся одновременно и фиксатором белковых фракций на фореграммах. Приготавливают следующим образом: нигрозин 0,05 г, сульфосали-а 2,0 г, трихлоруксусная кислота 2,0 г, дистиллированная вода до 100 мл. Готовый раствор можно использовать не ранее, чем через 2 суток (срок созревания). При отсутствии нигрозина можно использовать 0,05% раствор амидочерного 10В или 0,05% раствор Кумасси, которые готовятся такой же прописи, что и нигрозин, но вместо дистиллированной воды используется 7% раствор уксусной кислоты. Окрашенные фореграммы отмывают (при окраске нигрозином) в теплой воде, при окраске амидочерным или Кумасси в нескольких порциях уксусной кислоты(7%), а затем в воде.

Метод основан на особом свойстве менструальной крови - почти полном отсутствии фибрина, в связи с чем пятна ее растворяются быстрее, чем пятна крови иного происхождения. Объективно разницу в продолжительности периода растворения можно зафиксировать на фореграмме: при разгонке полученных в течение определенного времени с помощью раствора трипсина вытяжек на фореграмме вытяжки из пятна менструальной крови появляется фракция альбуминов(пятно растворяется), тогда как на

фореграмме вытяжки из пятна иного происхождения той же давности белковые фракции отсутствуют - пятно не успело раствориться. Появление фракции альбуминов связано с тем, что они имеют меньшие по сравнению с другими белками крови размеры молекул и молекулярную массу, поэтому первыми выходят в раствор (вытяжку). Поскольку пятно менструальной крови практически не содержит фибрина. В пятне крови иного происхождения имеется фибрин, который в процессе старения пятна, уплотняясь, образует пленки, препятствующие выходу белков крови. При действии трипсина на пятно такой крови расщеплению подвергается прежде всего именно фибринные пленки (поскольку трипсин по механизму действия специфичному ферменту - фибринолизину; как и последний, он преимущественно расщепляет связи, образованные аминокислотами аргинином и лизином). В связи с этим, время воздействия трипсина, в вытяжку из пятна менструальной крови выйдут альбумины в то время как вытяжка из пятна крови иного происхождения остается «чистой»

Подготовка материала к исследованию.

Для проведения электрофоретического исследования обязательным условием является

Наличие в лаборатории контрольных образцов менструальной и периферической крови одинаковой давности. Допускается разница в давности между исследуемыми и контрольными пятнами для пятен давностью до 6 месяцев - не более 2 недель, для пятен давностью свыше 6 месяцев - не более 1 месяца.

Контрольные образцы менструальной крови берут от здоровых женщин репродуктивного возраста на стерильную марлю, высушивают, хранят в бумажных пакетах (с указанием Ф.И.О., возраста , даты взятия крови) при температуре 18-20°C, относительной влажности не более 60%. Контрольные образцы периферической крови забирают у людей, не страдающих заболеванием в те же дни, что и менструальную кровь, также на стерильную марлю, условия хранения такие же. Перед использованием образцов в экспертизах они должны быть проведены по варианту методики соответственно давности этих пятен (см.ниже).

Для того чтобы по давности образцы максимально приближались к исследуемым пятнам, образцы менструальной крови целесообразно забирать два раза в месяц - в начале (до 15 числа) и в конце (после 20 числа).

Для электрофоретического исследования из пятен готовят навески содержащие 10 мг сухой крови. При небольших размерах пятна, когда в навеске 10 мг сухой крови, нельзя отказываться от исследования (в эксперименте положительный результат получен с навесками, содержащими 8 и 5 мг сухой крови). Поэтому, если количество материала ограничено , можно брать навеску исследуемого и соответственно, контрольных пятен; при учете результатов следует ориентироваться на фореграмму вытяжки из пятна-образца менструальной крови.

метод электрофоретического исследования.

Ход исследования зависит от давности исследуемых пятен крови. Если она не менее 35 дней, то используется следующий вариант методики:

- готовят навески исследуемых и контрольных пятен;
- кусочки пятен фиксируют в чашках Петри 96° этанолом в течение 30 МИНУТ(с добавлением этанола по мере его испарения) или проглаживают горячим утюгом в течении 3-5 минут через бумагу - указатель температуры устанавливают в соответствии с термостойкостью материала предмета-носителя, но не менее 120-140°C; обработанные кусочки помещают в пробирки:
- ГОТОВЯТ 0.01% о раствор трипсина;
- подготавливают пленку: осторожно помещают ее в кювету с рабочим буфером так чтобы пропитывание происходило снизу, затем пинцетом извлекают, слегка промачивают на листе фильтровальной бумаги, помещают на трафарет и, отступя на 3 см от верхнего края (который будет помещен со стороны катода)- наносят канавки;
- кусочки пятен заливают равными объемами 0,01% раствора трипсина на 0,5-1.5 минут при комнатной температуре, начиная с исследуемых, так, чтобы раствор фермента покрывал их: время воздействия трипсина определяют по растворению контроля менструальной крови (вытяжка начинает окрашиваться или опалесцировать);
- по окончании экспозиции кусочки пятен осторожно извлекают из пробирок препоровальной иглой; вытяжки в количестве 2-3 мкл наносят в канавки на пленке, начиная с контрольных: далее вносят контрольную сыворотку и 5% водный раствор бромфенолового синего лидирующего красителя (скорость его разгонки несколько выше, чем у альбуминов).
- пленку фиксируют в рамке, помещают в камеру аппарата для ЭФ; рабочее напряжение 200В. сила тока 14 мА (аппарат ПЭФ-3) или 14-20 мА (аппарат ЭПАУ-20-50); разгонка 30-40 минут;
- по окончании разгонки пленку помещают в красящий раствор на 10-15 минут при окраске раствором нигрозина отмывание от избытка красителя производят в теплой водопроводной воде; при использовании других красителей - в нескольких порциях 7% уксусной кислоты, затем в проточной воде до тех пор, пока мембрана не обесцвечивается настолько, что будут четко различаться все фракции на фореграммах;
- пленку высушивают на листе фильтровальной бумаги. При давности пятен свыше 35 дней их не фиксируют:
- навески заливают 0,2% раствором трипсина. Экспозиция (при комнатной температуре может быть от 1,5 до 60 мин в зависимости от давности пятен. Для пятен давности от 35 дней до 25 месяцев (75 дней) необходимую в конкретном исследовании экспозицию ориентировочно можно определить по графику, отражающему зависимость продолжительности воздействия трипсином от давности пятна. Точное время экспозиции (в сек) устанавливается по формуле $t=2 \cdot T$, где t - время экспозиции, T - давность пятна в днях. Пример: 1) - давность пятна 1 месяц 20 дней (50 дней). Время воздействия трипсина $50 \times 2 = 100$ сек или 1 мин 40 сек: 2) давность пятна 18 месяцев 3 дня (549 дней). Время воздействия трипсина равно $549 \times 2 = 1098$ или 18 мин 18 сек.
- Ориентиром также может служить растворение контрольного образца менструальной крови. Для пятен давностью свыше 25 месяцев экспозиция

составляет более 25 минут, точное время определяется по растворению образцов менструальной крови;

- весь дальнейший ход исследований такой же, как и в варианте для свежих пятен. Положительным результатом является появление фракции альбуминов на фореграмме исследуемого пятна при наличии таковой в контрольной вытяжке из пятна-образца менструальной крови на том же уровне, что и в контрольной сыворотке крови. При этом на фореграмме вытяжки из контрольного образца периферической крови эта фракция должна отсутствовать.

При проведении электрофоретического исследования необходимо иметь в виду следующие положения:

- результаты исследования не зависят от давности образования пятна (до 5 лет в наших исследованиях) и дня менструального кровотечения;

- данная методика позволяет различать менструальную и немensesуальную кровь из половых путей женщин, которая растворяется так же как периферическая кровь;

- на результаты исследования не влияет наличие в исследуемом пятне примеси спермы, слюны, мочи, вагинального отделяемого;

Менструальная кровь может быть обнаружена в пятне с примесью крови иного происхождения. если соотношение не менее 1:3 (часть менструальной крови. 3 части периферической крови)

- если возникает необходимость исследования материала от трупа (например, тампон с отделяемым), то, кроме обычных образцов в опыт обязательно включается образец крови, взятый во время вскрытия трупа. Эксперт должен иметь сведения о времени, прошедшем с момента смерти и условиях в которых находился труп, поскольку эти два фактора определяют развитие посмертного фибринолиза и, следовательно, растворимость исследуемого пятна.

При оценке результатов электрофоретического исследования необходимо иметь в виду, что при некоторых патологических состояниях, когда уменьшается содержание фибрина или нарушается его образование (синдром ДВС, гемофилия, болезнь Верлофа и др.) пятна периферической крови могут растворяться так же быстро, как и менструальной. В связи с этим, в исследование включают образцы крови всех участников события, от которых не исключается ее происхождение;

- пятна, подвергавшиеся действию повышенной влажности, независимо от давности, сохраняют свойства свежих пятен, поэтому их фиксируют и заливают 0,01% раствором трипсина.

Тактика эксперта при проведении исследования. Оценка результатов.

Методика определения менструального происхождения крови в следах на предметах-носителях включает два вида исследований - цитологический и электрофоретический. Оптимальным является параллельное использование обоих методов, что обычно удается и при ограниченном количестве исследуемого материала.

В случаях, когда давность пятна не известна, комплексную методику использовать нельзя. В связи с невозможностью подбора контрольных

образцов менструальной и периферической крови, поэтому ограничиваются только цитологическим исследованием.

При исследовании «загнивших» пятен, которые при электрофоретическом исследовании независимо от давности ведут себя как свежие, «проверочным» будет служить цитологические исследования. (большое количество микробной флоры - кокков, дрожжевой флоры, единичные эпителиальные клетки с нечеткими контурами с едва различимым ядром или без него) **ЕНКА** *Результатов исследования:*

1. При проведении предварительной пробы получен положительный результат; в мазке

из пятна характерная цитологическая картина (большое количество вагинальных клеток, иногда наличие пластов клеток эндометрия); положительный результат электрофоретического исследования делается вывод о наличии в пятне менструальной крови.

2. При нехарактерной цитологической картине (отсутствие пластов клеток эндометрия и клеток слизистой оболочки влагалища или незначительное количество только вагинальных: положительном результате электрофоретического исследования может быть сделан вывод о наличии в пятне крови, не содержащей фибрина, что характерно для менструальной крови

3. Если электрофоретическое исследование не проводилось, но имеются четкие данные цитологического исследования: наличие осадка, большое количество вагинальных клеток в мазках возможен вывод о происхождении крови из половых путей женщины с указанием, что осадок и большое количество клеток характерны для менструальной крови.

4. При отсутствии вагинальных клеток в препаратах и фракции альбуминов на фореграммах вытяжек из исследуемых пятен делается вывод о не обнаружении в пятнах менструальной крови.

Дифференцирование антигенов крови и выделения по системе АВ0

Метод дифференцирования антигенов крови и выделения по системе АВ0 аффинной хроматографией.

Постановка реакции — (см методика аффинной хроматографии) После 18-часовой абсорбции нити извлекают, помещают на предметные стекла, однократно промывают и проводят элюцию. Одновременно вырезают участок хроматографической бумаги, который является верхней точкой проникновения жидкости, промывают его 5—6 раз охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия и проводят элюцию. В данном случае элюцию целесообразно осуществлять во взвесь эритроцитов с применением 1 % раствора альбумина. Антигены, выявленные в нити, соответствуют антигенам крови, а антигены, обнаруженные на хроматографической бумаге, являются антигенами выделений, так как последние, будучи водорастворимыми, мигрируют вместе с жидкостью и скапливаются в верхней части хроматографической бумаги.

Метод дифференцирования антигенов крови и выделения по системе АВ0 с применением сывороток с высоким титром.

Используют изоиммунные сыворотки анти-А и анти-В с титром 1:512—1:1024 и выше в реакции абсорбции агглютининов в количественной модификации. Предварительно с этими сыворотками исследуют образцы крови и выделений от лиц, проходящих по делу. В данном титре выявляются антигены выделений как наиболее сильные и не обнаруживаются антигены крови. В выбранном титре сывороток исследуют следы выделений и крови на вещественном доказательстве.

Метод дифференцирования антигенов крови и выделений по системе АВ0 методом тепловой обработки.

Смешанное пятно (кровь, слюна, сперма и т.д.) прогревают при 110 °С в течение 1,5 ч. Часть пятна вырезают, помещают в агглютинационную пробирку и заливают изотоническим раствором хлорида натрия. Ингредиенты оставляют на 18 ч при 4 °С. Спустя указанный срок жидкость отсасывают, центрифугируют, наносят на марлю и высушивают при комнатной температуре.

Из высушенного пятна берут 3 нити, помещают на 3 предметных стекла. На первую нить наносят изо- или иммунную сыворотку анти-А, на вторую — сыворотку анти-В и на третью — иммунную сыворотку анти-Н. Препараты устанавливают во влажные камеры и помещают в холодильник при 4 °С на 18—24 ч. Затем проводят реакцию абсорбции-элюции по общепринятой схеме. При этом открывают лишь антигены выделений, так как антигены крови после указанной обработки не экстрагируются, хотя полностью сохраняют абсорбционную способность.

Дифференцирование антигенов крови, спермы и влагалищных выделений от антигенов слюны, мочи и пота с помощью бутанола. Пятна после тепловой обработки (см. выше) заливают бутанолом либо смесью бутанол — этанол в соотношении 2:1 и оставляют на 4 ч при 65 °С. Затем вытяжки отсасывают, центрифугируют и надосадочную жидкость наносят на предметные стекла или на марлю. В последнем случае 3 нити помещают на 3 предметных стекла, заливают соответствующими сыворотками и проводят реакцию абсорбции — элюции или смешанной агглютинации. Так поступают с вытяжками, высушенными на предметных стеклах.

После обработки высокой температурой и бутанолом в смешанном пятне открываются только антигены спермы и влагалищных выделений. Антигены слюны, мочи и пота как водорастворимые не определяются.

Метод дифференцирование антигенов системы АВ0 спермы и влагалищных выделений.

Исследуемые пятна экстрагируют изотоническим раствором хлорида натрия в течение 18 ч при 4 °С. Спустя указанный срок жидкость отсасывают и центрифугируют. Затем готовят полиакриламидный гель. Формирование геля начинают с приготовления реагентов:

для малых камер

для больших камер

Акрис

Акриламид — 30 г

Акриламид — 150 г

Бисакриламид — 1 г

Бисакриламид — 5 г

Дистиллированная вода — до
100 мл

Дистиллированная вода — до
500 мл

Электродный буфер pH 8,3—8,35

Трис — 1,5 г

Глицин — 8,5 г

Дистиллированная вода — до 3 л

Гелевый буфер pH 9,15—9,25

Трис - 73,2 г

НС1 конц. — 5,5 г

Дистиллированная вода — 100 мл

ТЭМЕД - 0,92 мл

В течение 2—3 дней буфером пользоваться нельзя (до установки pH)

Гель (6,9 %)

для малых камер для больших камер

Акрис — 11,5 мл

Акрис — 23,0 мл

Гелевый буфер — 6 мл

Гелевый буфер — 12 мл

Дистиллированная вода —

Дистиллированная вода — 65 мл

32,5 мл

Персульфат аммония — 33 мг

Персульфат аммония — 70 мг

Образцы

Сахароза 60 % — 2 капли

Вытяжки из пятен — 3 капли

В карманы полиакриламидного геля вносят 25 мкл вытяжки из исследуемых объектов и проводят электрофорез: сначала при 80 В, а через 5 мин — 250 В. Образцы должны дойти до нижней границы полиакриламидного геля.

После электрофореза полиакриламидный гель делят на 30 фрагментов, толщина каждого должна быть равной 3 мм. Каждый фрагмент помещают в агглютинационную пробирку и туда же помещают маленький кусочек чистой марли. В каждую пробирку приливают изотонический раствор хлорида натрия с таким расчетом, чтобы полиакриламидный гель был полностью погружен в раствор. Пробирки помещают в холодильник при 4 °С на 18 ч. Спустя указанное время кусочки марли вынимают из пробирок, высушивают, покрывают 10 % альбумином и определяют в них антигены системы АВ0.

Эритроциты готовят на 1 % альбумине.

Антигены спермы определяют, как правило, с 1-й по 30-ю фракцию, а антигены влагалищных выделений — только с 1-й по 18-ю. Это объясняется тем, что электрофоретическая подвижность белковых компонентов влагалищных выделений ниже, чем таковая спермы.

Метод дифференцирование антигенов системы АВ0 спермы и влагалищных выделений ракетным иммуноэлектрофорезом

Приготовление агарозного геля. К 1 г агарозы добавляют 100 мл гелевого буфера (трис — 8,84 мг, веронал — 4,51 мг, лактат кальция 0,11 г, вода дистиллированная до 1 л, в качестве консерванта употребляют азид натрия — 10 мл 2 % раствора). стакан ставят на электрическую плитку для расплавления агарозы (жидкость доводят до кипения). После кипячения гель остужают, однако

не доводят его до полного затвердения. В гель добавляют либо изосыворотки, либо иммунные сыворотки анти-А, анти-В¹ из такого расчета, чтобы в 100 мл агарозы содержалось 5—2,5 % объема сыворотки. С этой целью к 15,4 мл агарозы добавляют 0,40 мл изо- или иммунной сыворотки анти-А или анти-В (2,5%) или к такому же объему геля добавляют 0,81 мл перечисленных сывороток (5 %). Ингредиенты смешивают в стакане и выливают на промытое обезжиренное стекло размером 9х12 см. После застывания агарозы в ней делают лунки диаметром 0,2—0,4 см на расстоянии 0,5 см друг от друга.

Приготовление образцов слюны и крови. Жидкую слюну помещают в полиэтиленовые стаканчики и центрифугируют 20 мин при 6000 об/мин. Так же поступают и с вытяжками из пятен слюны. Экстрагирование пятен слюны проводят изотоническим раствором хлорида натрия в течение 18 ч при 4 °С.

Экстрагирование пятен крови проводят также изотоническим раствором хлорида натрия в течение 18 ч при 4 °С. Спустя указанный срок жидкость отсасывают, переносят в пробирки из полиэтилена и центрифугируют в течение 20 мин при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают, вытяжку (под контролем на белок с азотной кислотой) разводят до концентрации белка 1:1000, при необходимости вытяжку разводят до концентрации 1:10 000. Жидкую слюну и вытяжку из пятен слюны не разводят.

Проведение электрофореза. Приготовленную пластинку помещают в аппарат для электрофореза. Устанавливают мостики, соединяющие гель с электродным трис-барбитуратным буфером (трис — 17,68 г, веронал — 9,02 г, лактат кальция — 2 г, дистиллированная вода — до 2 л). В качестве консерванта используют азид натрия (20 мл 2 % раствора). Включают электрический ток малой мощности и в лунки вносят приготовленные образцы крови и слюны в объеме 10 мкл. После внесения образцов напряжение увеличивают до 150 В, при этом электрофорез длится в течение 4—5 ч, а при напряжении 60—70 В — в течение ночи.

Обработка геля. После проведения электрофореза пластину с гелем вынимают из аппарата, помещают на ровную поверхность, покрывают слоем фильтровальной бумаги, смоченной в дистиллированной воде. На эту фильтровальную бумагу кладут еще 4 слоя сухой фильтровальной бумаги. На последнюю устанавливают стеклянную пластину, а на нее груз массой не менее 5 кг. Экспозиция составляет 15 мин.

Отжатый таким образом агарозный гель помещают на 15 мин в кювету с изотоническим раствором хлорида натрия, а затем — в две порции дистиллированной воды, в каждой по 15 мин.

Отжимание геля повторяют. Промытые пластинки с агарозным гелем помещают на ровную горизонтальную поверхность, на нее кладут один слой фильтровальной бумаги, затем 4 слоя сухой фильтровальной бумаги, стеклянную пластинку, на которой устанавливают груз массой не менее 5 кг и оставляют на 15 мин. Спустя указанное время гель высушивают феном. Иммунофореграмму окрашивают 0,5 % раствором Кумасси, помещенным в смесь этанол — уксусная кислота — вода (45:10:45). В случае положительного результата образующийся преципитат выявляется в виде ракеты.

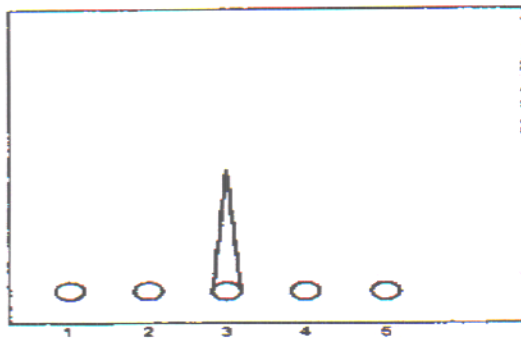


Рис. Ракетный иммунофорез. Ракета — положительный результат. Объяснение в тексте.

Ошибки. Между слоем агарозного геля и фильтровальной бумагой могут образоваться пузырьки воздуха. Этого можно избежать, если лист фильтровальной бумаги будет плотно контактировать с агарозным гелем. Если все же пузырьки воздуха образуются, их можно удалить с помощью препаровальной иглы, прокалывая слой фильтровальной бумаги и, таким образом, удаляя воздух (рис.).

Перечень использованных источников:

1. Сборник материалов по судебно- медицинской экспертизе.-М.,1960.
2. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) – Астана, 2010
3. «Исследование вещественных доказательств» Томилин. М.1962.
4. Информационное письмо Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Выявление антигенов А,В,Н в следах крови реакцией абсорбции-элюции с применением моноклональных антител.-М., 1989.-7с.
5. Методические рекомендации Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Об использовании моноклональных антител при экспертизе следов крови и выделений человека. М,1992г
6. Методические указания Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР от 14 июня 1975г. Об установлении наличия и групповой принадлежности слюны, наличия мочи, спермы. –М, 1975г. -8с.
- 7.Методическое письмо Главного судебно – медицинского эксперта Минздрава СССР. От 10 декабря 1970г. Определение групп изосерологической системы АВО в пятнах крови малой величины методом абсорбции-элюции при помощи изосывороток а и В. –М, 1970. -8с.

