

Anna Łasińska

Biuro Badań Kryminalistycznych Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego

Katarzyna Baca

Biuro Badań Kryminalistycznych Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego

Paweł Woliński

Biuro Badań Kryminalistycznych Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego

Rafał Wierzchosławski (autor korespondencyjny)

Biuro Badań Kryminalistycznych Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego

r.wierzchoslawski@abw.gov.pl

Ocena przydatności folii adhezyjnych do zabezpieczania śladów biologicznych oraz izolacji komórek ludzkich metodą mikrodysekcji laserowej

Streszczenie

Folie adhezyjne są z powodzeniem wykorzystywane w kryminalistyce do zabezpieczania śladów biologicznych, które po przeniesieniu na powierzchnie folii mogą być poddawane obrazowaniu mikroskopowemu w celu identyfikacji komórek ludzkich. Do niedawna brak możliwości fizycznej separacji struktur komórkowych uniemożliwiał ich selektywne genotypowanie pomimo dostatecznej wizualizacji. Wdrożenie do kryminalistyki technologii mikrodysekcji laserowej stworzyło niespotykane dotąd możliwości manipulacji na poziomie komórkowym, w szczególności w zakresie pozyskiwania pojedynczych komórek ludzkich. Wykazano, iż folie z zabezpieczonymi śladami mogą z powodzeniem zostać wykorzystane bezpośrednio w charakterze preparatów mikroskopowych, kompatybilnych z systemem mikrodysekcji laserowej. Ponadto, z wyseparowanych w wyniku mikrodysekcji fragmentów folii z materiałem biologicznym można z zastosowaniem standardowych metod analitycznych uzyskać wysokiej jakości profile DNA, co czyni technologię łatwą do zastosowania w rutynowej działalności laboratorium kryminalistycznego.

Niniejsza praca stanowi studium oceny parametrów kilkunastu typów folii pod kątem kompatybilności z technologią mikrodysekcji laserowej. W wyniku przeprowadzonych badań wytypowano folie mogące być z powodzeniem stosowane do zabezpieczania śladów biologicznych na miejscu zdarzenia, stanowiąc jednocześnie podłoże odpowiednie dla laserowego pozyskiwania oraz genotypowania wytypowanych fragmentów śladu.

Słowa kluczowe ślady biologiczne, folie kryminalistyczne, folie adhezyjne, mikrodysekcja laserowa, polimorfizm STR

Wstęp i cel pracy

Właściwości adhezyjne folii kryminalistycznych są z powodzeniem wykorzystywane do pobierania i zabezpieczania śladów znajdujących się na materiale dowodowym, m.in. włókien, włosów, odcisków palców [1, 2, 3].

W zakresie kryminalistycznych badań biologicznych udokumentowano zastosowanie folii adhezyjnych jako skutecznej i wydajnej metody próbkowania materiału biologicznego zdeponowanego na powierzchniach płaskich, m.in. fragmentów tkanki, pojedynczych komórek czy plam zaschniętych pły-

nów ustrojowych [4, 5]. Zakres użycia folii adhezyjnych nie ogranicza się jedynie do materiału dowodowego [6, 7]. Sugerowano m.in. wykorzystanie tego typu materiałów jako metody alternatywnej względem innych, bardziej inwazyjnych metod pobierania biologicznych próbek porównawczych [8]. Przykładem folii adhezyjnych wykorzystywanych standardowo w kryminalistycznych laboratoriach biologicznych są taśmy adhezyjne typu HAT (*hydrophilic adhesive tape*). Materiał, z którego wykonywane są taśmy HAT, rozpuszcza się pod wpływem wody, co wykorzystano w procesie izolacji DNA z materiału biologicznego [8]. Komórki ludzkie zabezpieczone na powierzchni taśmy

są uwalniane po jej rozpuszczeniu bezpośrednio do roztworu lizującego, co pozwala na ominięcie etapu mechanicznej separacji komórek i przyczynia się do minimalizacji strat jądrowego DNA podczas izolacji. Materiał genetyczny pozyskany w wyniku ekstrakcji taśm typu HAT cechuje się dobrą jakością pozwalającą na przeprowadzenie profilowania genetycznego metodą analizy polimorfizmu loci mikrosatelitarnych (*Short Tandem Repeats* – STR), standardowo wykorzystywaną przez laboratoria genetyczne [8, 9, 10, 11]. Powyższe właściwości taśm HAT przyczyniły się do ich rozpowszechnienia jako wygodnego uzupełnienia tradycyjnych metod zabezpieczania oraz profilowania śladów biologicznych.

Jednak zastosowanie taśm HAT, w szczególności na dużych powierzchniach materiału dowodowego, nie jest pozbawione niedogodności. Z badań przeprowadzonych w Pracowni Badań Biologicznych Biura Badań Kryminalistycznych ABW (wyniki niepublikowane) wynika, iż nie w każdym przypadku udaje się doprowadzić do całkowitego rozpuszczenia taśmy hydrofilowej, a jej pozostałości mogą znacznie utrudnić proces izolacji DNA. Ponadto, wraz ze wzrostem rozmiaru powierzchni badanej, wzrasta również prawdopodobieństwo zdeponowania na taśmie większej ilości inhibitorów amplifikacji DNA (np. barwniki, kwas humusowy), lub/i mieszanin komórek pochodzących od różnych osób, a w konsekwencji trudności z uzyskaniem lub/i interpretacją profili DNA. Wreszcie, większe gabarytowo fragmenty taśmy przysparzają problemów zarówno natury technicznej (zbyt mała pojemność standardowo używanych probówek), jak i ekonomicznej (duże zużycie odczynników), w kontekście izolacji kwasów nukleinowych.

Mikrodysekcja laserowa

W ostatnich latach wprowadzono do kryminalistyki technologię mikrodysekcji laserowej umożliwiającą precyzyjne pozyskanie materiału w postaci pojedynczych komórek do badań molekularnych przed właściwą analizą DNA [12, 13, 14]. Historycznie rozwój mikrodysekcji laserowej był odpowiedzią na zapotrzebowanie na precyzyjne, szybkie i zapobiegające kontaminacji metody izolacji komórek lub fragmentów tkanek z preparatów. Doprowadziło to do pojawienia się zautomatyzowanych mikromanipulatorów, a następnie opisanego w 1996 r. przez Emmert-Buck i in. [15] systemu LCM (*Laser Capture Microdissection*), działającego na podstawie laserowej metody wycinania z wykorzystaniem wiązki laserowej promieniowania podczerwonego.

Obecnie zaawansowane systemy mikrodysekcji laserowej wyposażone są w moduły laserowe

emitujące promieniowanie UV lub IR, zintegrowane z wysokiej klasy mikroskopem oraz zmotoryzowanym stolikiem [16]. Całość uzupełniona jest systemem komputerowym pozwalającym sterować procesem wycinania za pomocą oprogramowania, kamery i monitora komputera [17].

Opracowane pierwotnie z myślą o wykorzystaniu w dziedzinie onkologii systemy mikrodysekcji szybko znalazły zastosowanie także w innych, różnorodnych dziedzinach nauk biologicznych, w tym w kryminalistyce [12, 13, 16, 18]. W Polsce pierwsze wdrożenie systemu mikrodysekcji laserowej w laboratorium kryminalistycznym miało miejsce w Biurze Badań Kryminalistycznych Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego w roku 2011, natomiast pierwszą opinię kryminalistyczną opartą na metodzie LCM wydano w tymże laboratorium 22 listopada 2013 roku.

Zastosowanie mikrodysekcji laserowej w kryminalistyce otwiera wiele nowych możliwości, takich jak kontrolowana izolacja określonych fragmentów materiału biologicznego, izolacja pojedynczych komórek ludzkich, eliminacja z próbki potencjalnych inhibitorów amplifikacji PCR, możliwość rozdzielenia mieszanin komórkowych pochodzących od różnych osób lub z różnych tkanek, znaczący wzrost czułości analiz itd. Ich szczegółowy opis wykracza poza zakres niniejszej publikacji.

W odniesieniu do zabezpieczanych śladów kryminalistycznych mikrodysekcja laserowa oferuje interesującą alternatywę dla całościowej izolacji DNA ze śladu pobranego na pałeczkę wymazową (często z fragmentami podłoża). Po wykonaniu preparatu mikroskopowego ten sam ślad może być poddany selektywnej izolacji pożądanego materiału biologicznego dzięki zastosowaniu systemu mikrodysekcji laserowej. W oryginalnym zastosowaniu rekomendowanym przez producentów systemów mikrodysekcji laserowej preparaty komórkowe przygotowywane są na specjalnych polimerowych podłożach polecanych przez producenta (ryc. 1a). Pojedyncze komórki lub fragmenty tkanek są następnie odseparowywane od reszty preparatu wraz z fragmentem membrany za pomocą wiązki promieniowania laserowego. Zaletą takiego rozwiązania jest standaryzacja podłoża preparatu oraz możliwość doboru materiałów polimerowych kompatybilnych z używanym systemem mikrodysekcji. W przypadku śladów kryminalistycznych, zabezpieczanych standardowo na pałeczkach wymazowych lub na foliach kryminalistycznych, niedogodność powyższego rozwiązania związana jest z koniecznością każdorazowego przeniesienia materiału na powierzchnię membrany polimerowej, co szczególnie w przypadku taśm nastręcza problemów natury technicznej i prowadzić może do strat materiału.

W Biurze Badań Kryminalistycznych ABW podjęto pilotażowe badania mające na celu ocenę przydatności systemu mikrodysekcji laserowej wyposażonego w prototypowy laser o zwiększonej mocy (zob. Metoda badawcza) do izolacji komórek ludzkich bezpośrednio z folii adhezyjnych użytych do zabezpieczenia śladów biologicznych. Niniejsza publikacja stanowi podsumowanie prac badawczych mających na celu ocenę standardowo stosowanych taśm kryminalistycznych pod kątem wydajności transferu śladów biologicznych z powierzchni materiału dowodowego oraz kompatybilności z systemem mikrodysekcji laserowej, w szczególności w zakresie przygotowania preparatów mikroskopowych oraz podatności na cięcie wiązką promieniowania laserowego. W trakcie badań przetestowano szereg parametrów determinujących przydatność folii, takich jak lepkość powierzchni, selektywna adhezyjność, przejrzystość, grubość, giętkość, podatność na cięcie oraz na separację wyciętych fragmentów. Następnie wyseparowane fragmenty folii z komórkami ludzkimi wykorzystano w charakterze materiału wejściowego w standardowej procedurze profilowania genetycznego stosowanej przez laboratoria kryminalistyczne, tzw. analizie polimorfizmu STR.

W wyniku przeprowadzonych badań wyselekcjonowano folię adhezyjną o optymalnych parametrach, tj. wysokiej i selektywnej adhezyjności oraz kompatybilności z technologią mikrodysekcji laserowej.

Wykazano również, że w testowanym zakresie wyseparowane za pomocą mikrodysekcji fragmenty taśmy z komórkami ludzkimi zawierały materiał genetyczny spełniający ilościowe oraz jakościowe wymogi standardowych metod analizy kryminalistycznej, które w rezultacie umożliwiły uzyskanie wysokiej jakości profili DNA.

Materiały i metody

Materiał badawczy

Badaniom poddano 12 pozytywowych oraz negatywowych transparentnych folii daktyloskopijnych wykorzystywanych standardowo do zabezpieczania odbitek linii papilarnych, 4 minifolie adhezyjne przeznaczone do uszczelniania 96-dołkowych płytek reakcyjnych (stosowanych m.in. w termocyklerze GeneAmp 9700) oraz dodatkowo folię antyrefleksyjną stosowaną do zabezpieczania ekranów tabletów. Szczegółowy wykaz testowanych folii i taśm przedstawiono w tabeli 1.

Zabezpieczanie śladów biologicznych i przygotowanie preparatów

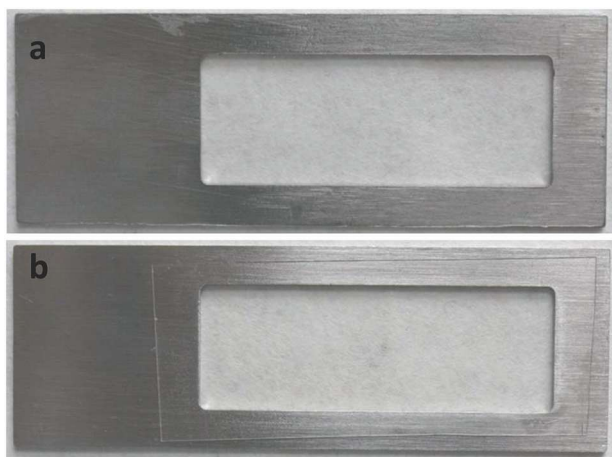
Poddanym badaniom opisanym w niniejszej publikacji materiałem dowodowym była szklanka z widocznymi śladami użytkowania w postaci odbi-

Tabela 1

Testowane folie i taśmy adhezyjne

Lp.	Typ taśmy/folii	Rodzaj taśmy/folii	Producent/nazwa własna
1	folia daktyloskopijna	żelowa negatywowa transparentna	FOTON
2	folia daktyloskopijna	żelowa negatywowa transparentna	BVDA/Keep Cool
3	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	BVDA
4	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	STANIMEX
5	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna (do mikrośladów)	STANIMEX
6	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	FILMOLUX
7	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	TESA/Film Special
8	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen
9	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen/FILMOLUX 609
10	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen/ S50
11	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen/FILMOLUX Soft
12	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Sirchie
13	folia adhezyjna	transparentna	Eppendorf / PCR Film adhesive
14	folia adhezyjna	transparentna	Eppendorf/ Storage Film adhesive
15	folia adhezyjna	transparentna	Life Technologies / MicroAmp Optical Adhesive Film
16	folia adhezyjna	transparentna	PlateMax / Genuine Axygen Quality
17	folia antyrefleksyjna	transparentna elektrostatyczna	3M / Natural View Fingerprint Fading Screen Protector

tek czerwieni wargowej i linii papilarnych, a więc domyślnie zawierająca zdeponowane przez użytkownika ślady biologiczne w postaci komórek ludzkich pochodzących z nabłonka (naskórka) warg, jak również wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego materiału genetycznego towarzyszącego substancji potowotłuszczowej tworzącej linie papilarne [19]. W celu przeniesienia śladu biologicznego na powierzchnię adhezyjną każdą z testowanych folii przycinano do rozmiaru 3×1 cm, przyklejano do powierzchni szklanki w widocznym miejscu użytkowania na ok. 10 sekund, a następnie zrywano energicznym ruchem. Następnie fragment folii z przeniesionym śladem biologicznym mocowano przez przyklejenie adhezyjnej strony taśmy do krawędzi metalowej ramki MMI (Molecular Machines & Industries) o wymiarach krawędzi $7 \times 2,5$ cm oraz wymiarach otworu roboczego 45×16 mm (ryc. 1b).



Ryc. 1. Ramki preparatów do mikrodysekcji laserowej z oryginalną membraną MMI (a) oraz z naklejoną folią adhezyjną (b).

Obrazowanie mikroskopowe i mikrodysekcja laserowa

Obrazowanie preparatów prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu optycznego z wyposażeniem konfokalnym Nikon A1-R oraz oprogramowaniem NIS-Elements (NIKON). Preparaty poddawano obserwacji w świetle przechodzącym, z zastosowaniem czarno-białej kamery cyfrowej CCD Nikon QI-1 z chłodzeniem o rozdzielczości 1280×960 , obiektywu 10x Plan Fluor N.A.0,30, w.d. 16 mm oraz 20x Plan Fluor N.A.0,45, w.d. 1,0 mm. Obrazy mikroskopowe poszczególnych folii (z wyjątkiem folii nr 4 – zob. Wyniki i dyskusja) przedstawiono na rycinie 2.

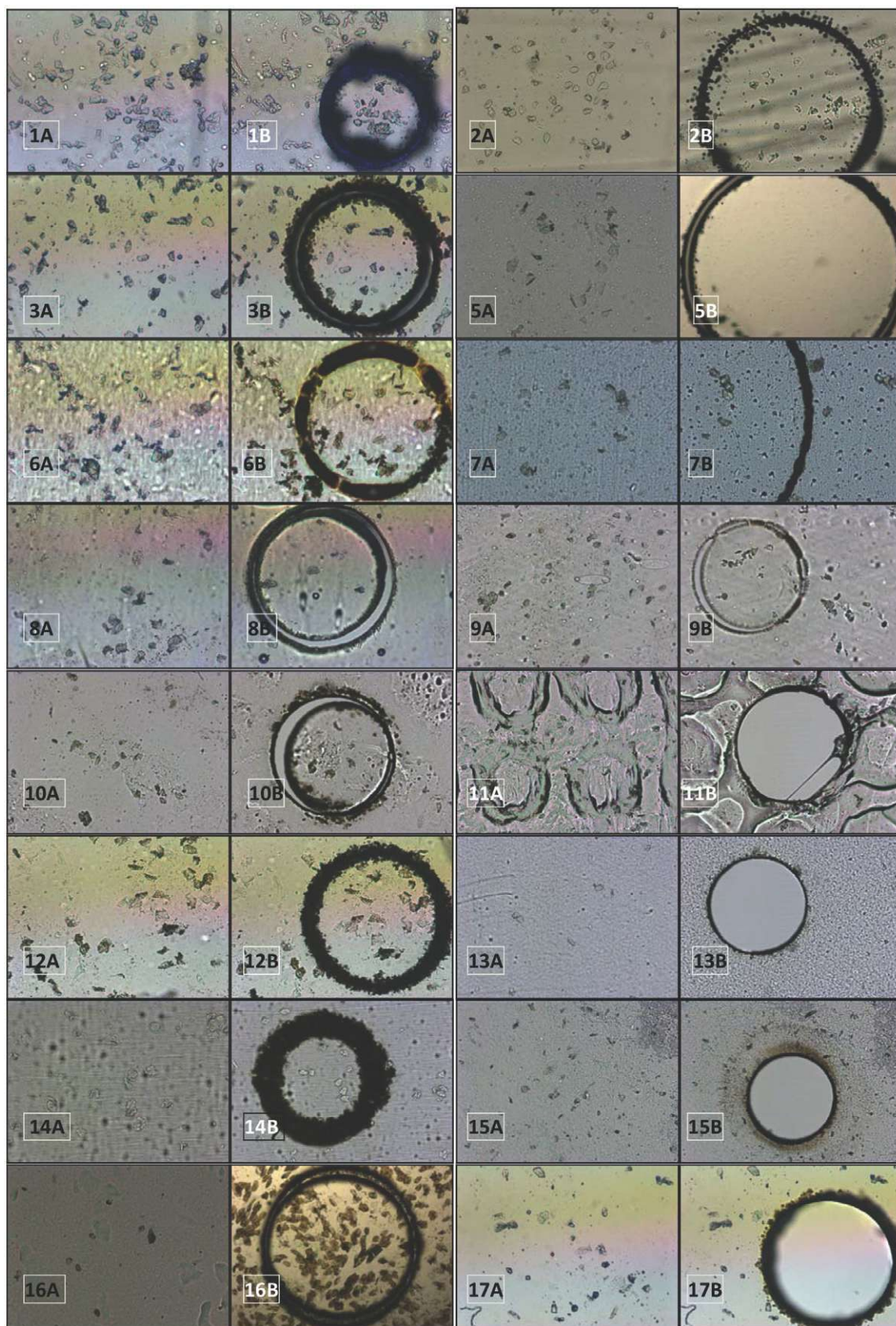
Wycinanie fragmentów folii adhezyjnych prowadzono z wykorzystaniem modułu mikrodysekcji laserowej firmy Molecular Machines & Industries (MMI)

zintegrowanego z mikroskopem Nikon A1-R. Moduł wyposażony jest w pulsacyjny, pikosekundowy laser na ciele stałym o mocy 4 mW, emitujący promieniowanie w zakresie widma UV (o długości fali 355 nm). Ramki z fragmentami folii mocowano do zmotoryzowanego stolika mikroskopu pracującego w trybie sterowania wewnętrznym oprogramowaniem modułu mikrodysekcji CellCut zintegrowanym z platformą MMI CellTools.

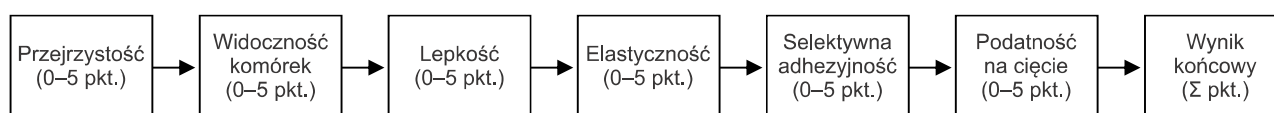
Mikrodysekcję laserową preparatów prowadzono w świetle przechodzącym z wykorzystaniem wysoko-czułej wewnętrznej cyfrowej kamery CCD MMI FI1C o rozdzielczości 1032×776 , w którą wyposażony jest moduł MMI CellCut oraz obiektyw 10x Plan Fluor N.A.0,30, w.d. 16 mm oraz 20x Plan Fluor N.A.0,45, w.d. 1,0 mm, przy zastosowaniu zmiennych parametrów mocy lasera oraz ogniskowej wiązki promieniowania laserowego. Separacja fragmentów następowała pod wpływem wiązki promieniowania laserowego na skutek zjawiska zimnej ablacji. Wyseparowane fragmenty w bezdotykowy sposób umieszczano w probówkach 0,2 ml, z wykorzystaniem autorskiej technologii automatycznego podajnika opracowanej przez firmę MMI dla linii modułów mikrodysekcji typu CellCut (www.molecular-machines.com).

Kryteria oceny folii kryminalistycznych

Ocena folii obejmowała następujące kryteria: przejrzystość/widoczność komórek, selektywna adhezja (wydajność folii pod kątem przylegania komórek ludzkich), lepkość, elastyczność, podatność na cięcie oraz grubość. Pierwsze dwa parametry oceniano na podstawie obserwacji mikroskopowej. Lepkość oraz elastyczność szacowano w sposób organoleptyczny. Podatność na cięcie wynikała ze sposobu reagowania powierzchni folii na wiązkę promieniowania laserowego. Pomiaru grubości poszczególnych folii (wyrażonego w mm) dokonano za pomocą grubościomierza elektronicznego LITEMATIC VL-50 firmy Mitutoyo o rozdzielczości $0,01 \mu\text{m}$, wyposażonego w system pomiarowy minimalizujący błąd „Abbego” oraz mechanizm redukujący nacisk pomiarowy. W związku z subiektywnym charakterem większości zastosowanych kryteriów przyjęto punktową skalę oceny w zakresie 0–5 pkt., gdzie „0” wyrażało wartość najgorszą, np. brak podatności folii na cięcie, natomiast „5” wartość najlepszą, np. bardzo dużą podatność (ryc. 3). Po zsumowaniu punktów za poszczególne parametry za nieprzydatne uznano folie, które dla przynajmniej jednego z kryteriów uzyskały poniżej 3 punktów, natomiast pozostałe uszeregowano pod względem przydatności według uzyskanej punktacji końcowej. Nie przyznawano punktów za grubość, która wyrażana była wartością metryczną.



Ryc. 2. Obrazy mikroskopowe testowanych folii. Numery odpowiadają numeracji z tabeli 1.
a – obrazy preparatów przed wycięciem, b – obrazy preparatów po cięciu laserem.



Ryc. 3. Algorytm oceny zastosowany do oceny przydatności folii.

Analiza polimorfizmu STR

W celu oznaczenia polimorfizmu STR z materiału biologicznego (wymaz z jamy ustnej) zdeponowanego na trzech wyselekcjonowanych foliach: 3M/ Natural View Fingerprint Fading Screen Protector, PlateMax/Genuine Axygen Quality, pozytywowa transparentna/Neschen, które uzyskały najwyższą ocenę punktową (tab. 3), wyseparowano przy użyciu mikrodysekcji laserowej fragmenty zawierające około 20 komórek. Po przeprowadzeniu oględzin mikroskopowych wieczka adhezyjnego oraz weryfikacji liczby komórek w wyciętym fragmencie materiał był poddawany procesowi izolacji DNA z wykorzystaniem metody fenolowej. Wyizolowane DNA zawieszano w całkowitej objętości 5 μ l H₂O, po czym całość wykorzystywano w charakterze matrycy w reakcji amplifikacji DNA. Amplifikację DNA prowadzono przy użyciu zestawu AmpFISTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) z zastosowaniem 31 cykli powielania, tj. ilości podwyższonej dla próbek z niską zawartością DNA (*Low Copy Number* – LCN). Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 12,5 μ l. Rozdział amplikonów metodą elektroforezy kapilarnej prowadzono na sekwenatorze ABI 3130. Analizę polimorfizmu STR wykonano za pomocą oprogramowania GeneMapper ID-X. Uzyskane profile DNA porównywano z profilami referencyjnymi (DNA_{ref}) stanowiącymi znane, uprzednio oznaczone z wykorzystaniem standardowych metod (izolacja kolumnkowa DNA z wymazu z jamy ustnej pobranego na pałeczkę wymazową), profile trzech osób będących dawcami śladów biologicznych wykorzystanych w eksperymentach.

Oznaczenie ilości DNA

W celu oceny zawartości DNA w izolatach pozytywnych z komórek ludzkich po mikrodysekcji laserowej całość izolatu pozyskanego z 20 wyizolowanych komórek (w objętości 2 μ l) poddano ocenie ilości DNA z wykorzystaniem systemu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems przy użyciu urządzenia 7500 Real Time PCR System firmy Applied Biosystems oraz przy zastosowaniu oprogramowania SDS Software v1.2.3. firmy Applied Biosystems zgodnie z zaleceniami producenta. Badanie przeprowadzono w trzech powtórzeniach, w obecności kontroli pozytywnej w postaci DNA o znanym

stężeniu (AmpFISTR® Control DNA 007), rozcieńczonego do stężenia roboczego 100pg/ul.

Wyniki i dyskusja

Wyniki oceny poszczególnych parametrów wraz ze szczegółową punktacją przedstawiono w tabeli 2. Obrazy mikroskopowe powierzchni folii użytych do zabezpieczenia śladów biologicznych przedstawiono na rycinie 2. Wyjątek stanowi folia nr 4 (folia daktyloskopijna pozytywowa – STANIMEX), dla której z powodu minimalnej przezroczystości nie udało się uzyskać obrazów mikroskopowych.

Odpowiednia przezroczystość folii i dobra widoczność komórek są jednym z kluczowych kryteriów warunkujących przydatność folii kryminalistycznej do bezpośredniego wykorzystania w charakterze preparatu mikroskopowego poddawanego obrazowaniu oraz mikrodysekcji laserowej. Preparaty obrazowane są w świetle widzialnym przechodzącym, co warunkuje wymóg przenikalności powierzchni folii dla wiązki świetlnej. W celu zapewnienia dobrej przenikalności, do badań wybrano folie transparentne, co w większości przypadków przełożyło się na zadowalającą przezroczystość preparatów oraz dobrą widzialność zabezpieczonych komórek. Wyjątek stanowiły folie nr 4 i 11, które otrzymały poniżej 3 punktów dla obu ocenianych kryteriów, a więc poniżej progu akceptowalności. Szczególnie korzystną strukturą powierzchni, dobrą przezroczystością oraz widzialnością komórek charakteryzowały się wszystkie folie negatywowe, folie pozytywowe nr 3, 5, 8 i 10, minifolia nr 16 oraz folia antyrefleksyjna nr 17.

Kolejnym z kluczowych parametrów warunkujących przydatność folii w technologii mikrodysekcji laserowej jest podatność na cięcie wiązką promieniowania laserowego (kolumna: Podatność na cięcie – tabela 2). Stwierdzono brak zauważalnych zależności pomiędzy podatnością na cięcie a pozostałymi ocenianymi parametrami. Pozwoliło to na sformułowanie wniosku, iż kluczowy dla tego parametru jest skład surowcowy materiału, z którego wykonano folię. W związku z faktem, iż szczegółowe listy składników poszczególnych folii objęte są zazwyczaj tajemnicą firmową, nie było możliwe określenie materiału optymalnego dla mikrodysekcji laserowej. W badaniach skupiono się zatem na oce-

Tabela 2

Wyniki oceny punktowej parametrów folii adhezyjnych

Lp.	Rodzaj folii	Przejrzy- stość	Widocz- ność komórek	Lepkość	Grubość [mm]	Elastycz- ność	Selektywna adhezyj- ność	Podat- ność na cięcie	Suma pkt
1	FOTON żelowa negatywowa transparentna	4	5	4	0,56	2	5	0	20
2	BVDA, Keep Cool żelowa negatywowa transparentna	5	5	4	0,59	2	5	3	24
3	BVDA pozytywowa transparentna	5	5	2	0,12	1	2	1	16
4	STANIMEX pozytywowa transparentna	0	0	4	0,15	3	0	0	7
5	STANIMEX pozytywowa transparentna do mikrośladów	4	5	5	0,14	1	4	4	23
6	FILMOLUX pozytywowa transparentna	3	3	5	0,11	5	3	1	20
7	TESA Film Special pozytywowa transparentna	3	3	4	0,07	4	3	3	21
8	Neschen pozytywowa transparentna	4	5	4	0,09	4	4	4	25
9	Neschen FILMOLUX 609 pozytywowa transparentna	4	3	4	0,13	4	4	4	23
10	Neschen S50 pozytywowa transparentna	5	4	3	0,05	5	3	3	23
11	Neschen FILMOLUX soft pozytywowa transparentna	2	2	3	0,11	5	2	4	18
12	Sirchie pozytywowa transparentna	4	4	4	0,15	2	4	3	21
13	PCR Film adhesive Minifolia	3	3	2	0,11	5	2	4	19
14	Storage Film adhesive Minifolia	3	4	4	0,21	4	4	1	20
15	MicroAmp Optical Adhesive Film Minifolia	3	3	3	0,11	4	3	4	20
16	Genuine Axygen Quality (PlateMax) Minifolia	5	4	3	0,09	4	5	4	25
17	3M/Natural View Fingerprint Fading Screen Protector	5	5	4	0,17	3	4	4	25

nie reakcji powierzchni folii na promieniowanie laserowe. Najwyższą punktację przyznawano w przypadku separacji fragmentu folii minimalną liczbą powtórzeń prowadzonej wiązki laserowej, przy minimalnej mocy lasera, wąskich krawędziach cięcia oraz przy jednoczesnym braku niepożądanych efektów „bąblowania” rozpuszczonego kleju, przypalania krawędzi cięcia i topienia powierzchni folii przez wiązkę lasera. Taką separację udało się uzyskać dla

folii nr 5, 8, 9, 11, 13, 15, 16 oraz 17. Brak najwyższej oceny (5) wynikał z faktu, iż w żadnej z testowanych folii nie udało się kompletnie odseparować wycinanego obszaru jednokrotnym prowadzeniem wiązki laserowej.

Kryterium lepkości dotyczy ogólnych właściwości adhezyjnych folii, tj. trwałości jej przylegania do różnych typów powierzchni. W niniejszej pracy oceniano powierzchnię szklaną oraz dodatkowo papie-

rową (bez naniesionych śladów biologicznych), przy czym podana punktacja jest wartością uśrednioną dla obu typów powierzchni. W przypadku papieru, najwyższej punktowano folie, które w sposób trwały (tj. bez odpadania) przylegały do ocenianych powierzchni, a jednocześnie możliwe było ich stosunkowo łatwe odklejenie, tj. bez zrywania włókien ligninowych papieru. Najwyższe oceny w tej kategorii uzyskały folie pozytywowe nr 5, 6, przy czym nie była to cecha charakterystyczna dla całej kategorii. Punktację poniżej progu akceptowalności uzyskały folie nr 3 oraz 13.

Elastyczność folii nie determinuje bezpośrednio ich przydatności dla mikrodyssekcji laserowej. Parametr ten włączono jednak do ogólnej punktacji ze względu na spotykaną w praktyce różnorodność kształtów oraz cech fizycznych materiału dowodowego, która powoduje, iż manipulacje folią mało elastyczną mogą być utrudnione. Parametr ten bezpośrednio przekłada się również na łatwość wykonania preparatu mikroskopowego. Najgorsze wartości uzyskały pozytywowe folie żelowe (nr 1 i 2), co niewątpliwie związane jest z dużą grubością tych folii oraz folie pozytywowe nr 3, 5 i 12.

Selektywna adhezyjność folii kryminalistycznych, tj. zdolność do wiązania komórek ludzkich, określa zasadność ich wykorzystania w charakterze metody zabezpieczania śladów biologicznych. Parametr ten nie jest bezpośrednio uwarunkowany ogólną lepkością folii, lecz wynika raczej z powinowactwa zastosowanej substancji klejowej do materii organicznej, w tym do komórek ludzkich. Najbardziej wydajne pod kątem transferu materiału biologicznego były żelowe folie negatywowe (1 i 2) oraz minifolia nr 16. Należy zaznaczyć, że w prowadzonych badaniach, selektywna adhezyjność miała charakter parametru względnego, tzn. uzyskiwana ocena uzależniona była od punktacji w kategoriach *Przejrzystość* i *Widoczność komórek*. Widoczne jest to zwłaszcza na przykładzie folii nr 4, w której z powodu małej przejrzystości

(0 pkt.) oraz widoczności komórek (0 pkt.) nie było możliwe dokonanie oceny selektywnej adhezyjności (0 pkt.). Na potrzeby niniejszych badań, których celem była ocena asortymentu folii pod kątem ich praktycznego wykorzystania w technologii mikrodyssekcji laserowej, brak możliwości oceny parametru (np. *Selektywna adhezyjność* – folia nr 4), przekładał się na przyznanie najniższej punktacji, co oznaczało niekompatybilność danej folii z technologią.

Oprócz punktowanych parametrów określano również dwa dodatkowe kryteria, tj. grubość folii oraz strukturę powierzchni. W przypadku grubości, jej wartość nie miała bezpośredniego przełożenia na przydatność folii, pozostawała jednocześnie w pośrednim związku z innymi parametrami, tj. elastycznością, przejrzystością oraz podatnością na cięcie. W związku z powyższym parametr ten, wyrażany w skali metrycznej, włączono do testów jedynie w charakterze informacyjnym. Strukturę powierzchni testowanych folii oceniano na podstawie obrazów mikroskopowych zestawionych na rycinie 2. Ze względu na dużą różnorodność, parametr ten okazał się bardzo trudny do odwzorowania w skali punktowej. Ponadto uznano, iż przydatność folii jest znacznie dokładniej wyrażana przez punktowane parametry przejrzystości i widoczności komórek.

W tabeli 3 zestawiono folie, które uzyskały ocenę powyżej progu akceptowalności, tj. 3 lub więcej punktów dla wszystkich testowanych kryteriów. Wyniki przeprowadzonych testów pozwoliły na warunkowe zakwalifikowanie siedmiu spośród testowanych folii jako przydatnych do zabezpieczania śladów biologicznych oraz kompatybilnych z mikrodyssekcją laserową. W grupie tej znajdują się folie pozytywowe (7–10), minifolia adhezyjne (15, 16) oraz folia antyrefleksyjna (17). Zarówno typ, jak i rodzaj folii, nie determinują zatem jej przydatności do mikrodyssekcji. Na uwagę zasługują produkty firmy Neschen, które w aż trzech spośród czterech przypadków zostały uznane

Tabela 3

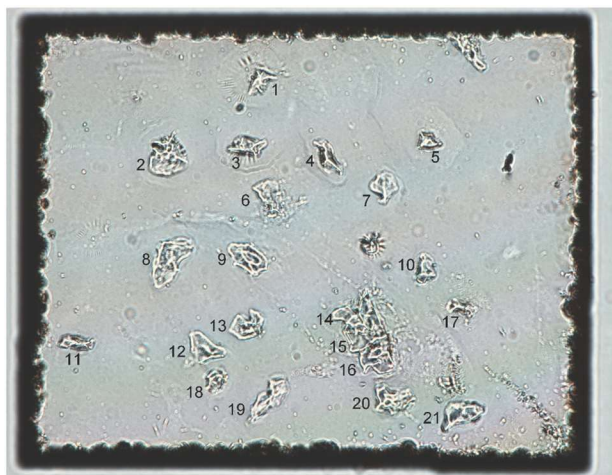
Zestawienie folii, które uzyskały ocenę powyżej progu akceptowalności dla każdego z testowanych parametrów

Nr folii	Typ folii	Rodzaj folii	Producent/model	Suma pkt
17	folia antyrefleksyjna	transparentna elektrostatyczna	3M/Natural View Fingerprint Fading Screen Protector	25
16	folia adhezyjna	transparentna	PlateMax/Genuine Axygen Quality	25
8	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen	25
9	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen/FILMOLUX 609	23
10	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	Neschen/S50	23
7	folia daktyloskopijna	pozytywowa transparentna	TESA/Film Special	21
15	folia adhezyjna	transparentna	Applied Biosystems/MicroAmp Optical Adhesive Film	20

za kompatybilne. Jednak przy wyborze do dalszych badań kierowano się wyłącznie szczegółową oceną wszystkich testowanych parametrów wyrażoną przez sumę punktów uzyskanych przez poszczególne modele folii.

Do badań polegających na genotypowaniu materiału biologicznego zabezpieczonego na powierzchni folii i wyseparowanego za pomocą mikrodysekcji laserowej zakwalifikowano trzy modele folii, które uzyskały najwyższą liczbę punktów w teście przydatności, tj. folie nr 17, 16 oraz 8 (zaznaczone szarym odcieniem w tabeli 3). Następnie z każdej z zakwalifikowanych folii wyseparowano fragmenty zawierające łącznie ok. 20 komórek ludzkich (ryc. 4), w trzech powtórzeniach reprezentujących materiał biologiczny trzech różnych dawców. Pozyskane fragmenty zostały użyte jako materiał wejściowy w standardowej procedurze izolacji DNA, amplifikacji PCR oraz elektroforezy kapilarnej stosowanej przez laboratoria kryminalistyczne (procedura opisana w dziale Materiały i metody).

W wyniku pomiaru ilości DNA w trzech niezależnych próbkach od różnych dawców zawierających po ok. 20 komórek uzyskano wartości odpowiednio, 40 pg, 66 pg, 30 pg DNA. Wartości te były o około połowę niższe od wartości oczekiwanych, wynikających z danych literaturowych odnośnie do zawartości DNA w jądrze komórkowym. Zgodnie z dostępną wiedzą 20 diploidalnych jąder komórkowych zawiera DNA w ilości 132 pg. Zatem, uwzględniając ok. 30% stratę materiału genetycznego podczas izolacji fenolowej, izolaty powinny zawierać ok. 90 pg DNA. Zaniżony pomiar uzyskano również dla próbki kontrolnej (wartość oczekiwana wynikająca z zastosowanego rozcieńczenia – 100 pg; wartość zmierzona – 50 pg).



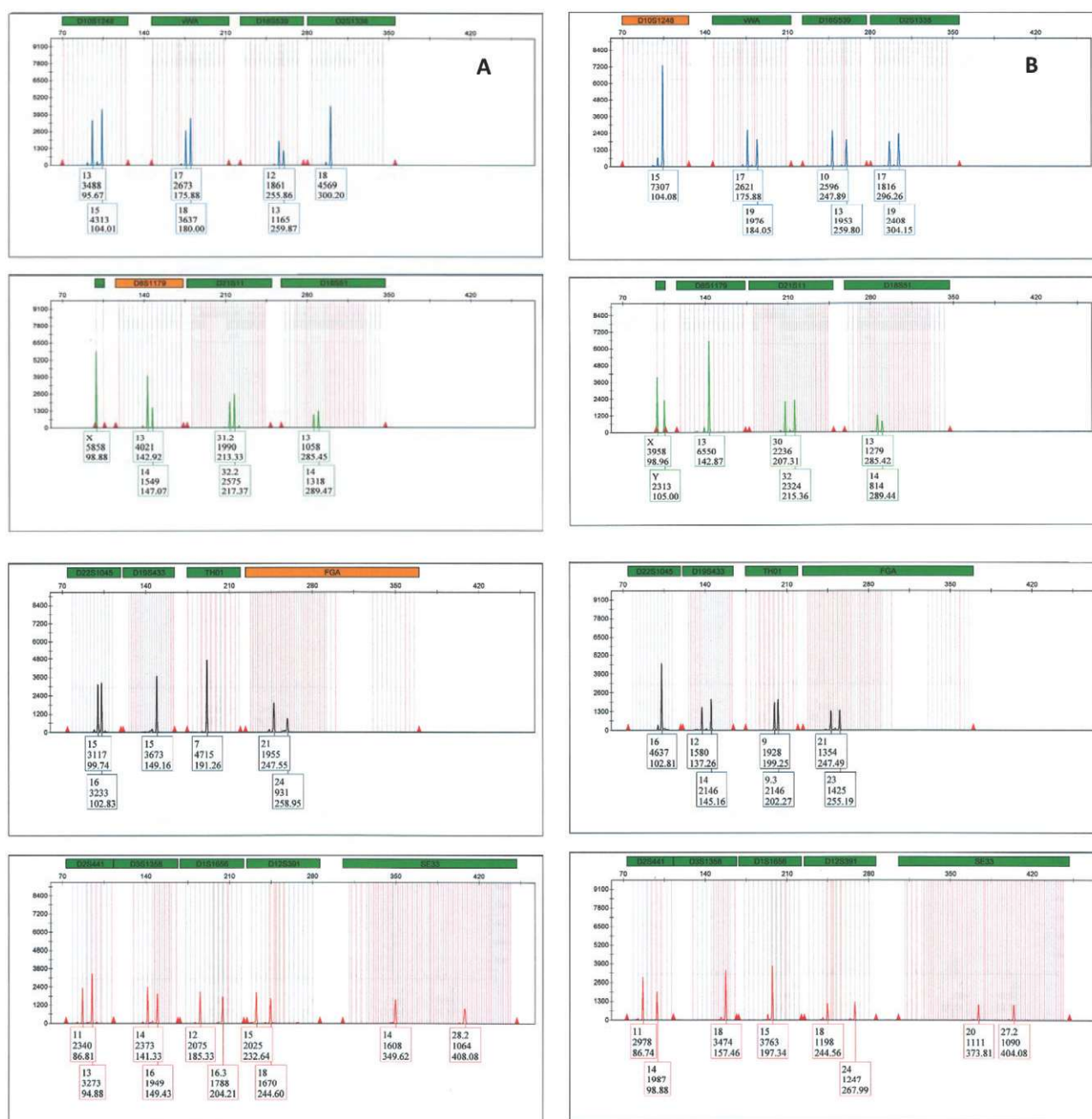
Ryc. 4. Obraz mikroskopowy wyciętego fragmentu taśmy 3M wraz z komórkami nabłonka jamy ustnej. Cyframi oznaczono poszczególne komórki, których cały obwód znalazł się w polu widzenia.

Zaobserwowane rozbieżności mogą wynikać z faktu, iż analizowane stężenia DNA oscylują w granicach najniższego punktu pomiarowego krzywej standardowej zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit, co oznacza, iż czułość zastosowanej metody może być niewystarczająca dla uzyskania wiarygodnego pomiaru. Ponadto, według wiedzy autorów, nie istnieją obecnie metody pomiarowe pozwalające na precyzyjne oszacowanie ilości DNA rzędu kilku, kilkunastu pikogramów. W konsekwencji powyższych wyników badań w eksperymentach profilowania pojedynczych komórek ludzkich wyseparowanych przy użyciu mikrodysekcji laserowej zrezygnowano z oznaczeń ilościowych metodą Real Time PCR. Na potrzeby oszacowania ilości DNA w izolatach z 20 komórek przyjęto, iż zawierały one pomiędzy 90 pg (6,6 pg x 20 komórek – 30% strat podczas izolacji) a 45 pg DNA (średnia wartość wynikająca ze wskazań metody Real Time PCR).

W analizowanym zakresie ilościowym, połączenie techniki mikrodysekcji laserowej z zastosowaniem wyselekcjonowanych folii nr 17, 16 oraz 8 umożliwiło uzyskanie pełnych profili STR, spełniających wymogi analityczne wynikające z walidacji wewnątrzlaboratoryjnej Biura Badań Kryminalistycznych ABW oraz z rekomendacji Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej – IFSG (Przykładowe profile dla folii 3M zostały zamieszczone na ryc. 5). Ponadto, dla wszystkich analizowanych folii oraz powtórzeń stwierdzono zgodność oznaczonych profili z profilami referencyjnymi dawców DNA_{ref} w pełnym zakresie analizowanych loci STR wchodzących w skład zestawu NGMSelect™. Uzyskane wyniki potwierdzają, że folie wykorzystywane do zabezpieczania śladów biologicznych mogą z powodzeniem zostać wykorzystane bezpośrednio w charakterze preparatów mikroskopowych, kompatybilnych z systemem mikrodysekcji laserowej oraz ze standardowymi metodami profilowania genetycznego.

Podsumowanie

Wdrożenie mikrodysekcji laserowej do kryminalistyki stworzyło nowe możliwości profilowania genetycznego śladów biologicznych tradycyjnie zabezpieczanych na pałeczkach wymazowych oraz na foliach kryminalistycznych. Dodatkowo, oprócz dotychczas stosowanej całościowej izolacji DNA z zabezpieczonego materiału, eksperci zyskali możliwość typowania oraz selektywnego pozyskiwania określonych komponentów śladu, głównie komórek ludzkich, w sposób zautomatyzowany i wolny od zanieczyszczeń. W celu dalszego uproszczenia procesu genotypowania śladów biologicznych, przeprowadzono



Ryc. 5. Profile genetyczne uzyskane ze śladów biologicznych w postaci 20 komórek nabłonka jamy ustnej zabezpieczonych na folii 3M (*Natural View Fingerprint Fading Screen Protector*) z wykorzystaniem mikrodysekcji laserowej, fenolowej metody izolacji DNA oraz zestawu NGMSelect™. Oś Y elektroforegramów wyskalowano w jednostkach rfu. Panele A i B przedstawiają przykładowe profile uzyskane dla dwóch różnych dawców.

testy szeregu folii adhezyjnych pod kątem ich przydatności do zabezpieczania śladów oraz kompatybilności z technologią mikrodysekcji laserowej. W wyniku przeprowadzonych testów wyselekcjonowano folie o optymalnych parametrach, gwarantujących efektywny transfer materii organicznej, w szczególności komórek ludzkich, z powierzchni materiału dowodowego, możliwość bezpośredniego obrazowania

mikroskopowego komórek oraz podatność na separację fragmentów preparatu wiązką promieniowania laserowego. Wobec wzrastającego zainteresowania technologią mikrodysekcji laserowej przedstawione wyniki badań mogą w sposób istotny przyczynić się do spopularyzowania wykorzystania folii kryminalistycznych z zabezpieczonym materiałem bezpośrednio w charakterze preparatów mikroskopowych

przystosowanych do mikrodysekcji. Proponowany sposób wykorzystania folii kryminalistycznych umożliwi typowanie i pozyskiwanie dowolnych obszarów oraz komponentów preparatu, a w konsekwencji bardziej świadome, kontrolowane i selektywne genotypowanie materiału biologicznego pozyskanego z zabezpieczanych śladów.

Zakupy aparatury analitycznej i odczynników wykorzystanych w badaniach oraz część prac badawczych zrealizowano w ramach projektu badawczo-rozwojowego AriaDNA 2010, nr 0 R 00 002712, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju.

Źródła rycin i tabel

Ryciny 1–5: autorzy

Tabele 1–3: opracowanie własne

Bibliografia

1. Barash M., Reshef A., Brauner P.: The use of adhesive tape for recovery of DNA from crime scene items, „J. Forensic Sci.”, nr 55 (4), s. 1058–64.
2. Salter M., Cook R.: Transfer of fibres to head hair, their persistence and retrieval, „FSI” 1996., nr 81 (2–3), s. 211–221.
3. Bernhard W.R.: Paint and tape: collection and storage of microtraces of paint in adhesive tape, „J. Forensic Sci.” 2000, nr 45 (6), s. 1312–5.
4. Gunnarsson J., Eriksson H., Ansell R.: Success rates of a forensic tape-lift method for DNA recovery, „Problems of Forensic Sciences” 2010, 83: p. 243–254.
5. Zech W.D., Malik N., Thali M.: Applicability of DNA analysis on adhesive tape in forensic casework, „J. Forensic Sci.”, nr 57 (4), s. 1036–41.
6. West M.J., Went M.J.: The spectroscopic detection of exogenous material in fingerprints after development with powders and recovery with adhesive lifters, „Forensic Sci. Int.” 2008, nr 174 (1), s. 1–5.
7. Widjaja E.: Latent fingerprints analysis using tape-lift, Raman microscopy, and multivariate data analysis methods, „Analyst” 2009, nr 134 (4), s. 769–75.
8. Li R.C., Harris H.A.: Using hydrophilic adhesive tape for collection of evidence for forensic DNA analysis, „J. Forensic Sci.” 2003, nr 48 (6), s. 1318–21.
9. Butler J.M. i in.: Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis, „Electrophoresis” 2004, nr 25 (10–11), s. 1397–412.
10. Moretti T.R. i in.: Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples, „J. Forensic Sci.” 2001, nr 46 (3), s. 647–60.
11. Gill P.: Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK—past, present, and future perspectives, „Biotechniques” 2002, nr 32 (2), s. 366–8, 370, 372, passim.
12. Di Martino D. i in.: Single sperm cell isolation by laser microdissection, „Forensic Sci. Int.” 2004, nr 146 Suppl, s. 151–3.
13. Li C.X. i in.: DNA profiling of spermatozoa by laser capture microdissection and low volume-PCR, „PLoS One”, nr 6 (8), s. e22316.
14. Murray C., McAlister C., Elliott K.: Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault, „Forensic Sci. Int. Genet” 2007, nr 1 (3–4), s. 247–52.
15. Emmert-Buck M.R. i in.: Laser capture microdissection, „Science” 1996, nr 274 (5289), s. 998–1001.
16. Vandewoestyne M., D. Deforce: Laser capture microdissection in forensic research: a review, „Int. J. Legal Med.”, nr 124 (6), s. 513–21.
17. Bohm M. i in.: Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue, „Am. J. Pathol.” 1997, 151 (1), s. 63–7.
18. Elliott K. i in.: Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides, „Forensic Sci. Int.” 2003, 137 (1), s. 28–36.
19. Pająk K., Wierzchośławski R.: Profilowanie genetyczne śladów daktyloskopijnych – problem wtórnego transferu materiału genetycznego, „Problemy Kryminalistyki” 2013, nr 280 (2).