

Anna Spas

Zakład Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji

anna.spas@policja.gov.pl

Renata Zbieć-Piekarska

Wydział Rozwoju Naukowego Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji

Wewnętrzna walidacja metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem Hid Real-Time PCR Analysis Software V 1.1 w Zakładzie Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji

Streszczenie

Celem przedstawionych badań było przeprowadzenie w Zakładzie Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji walidacji wewnętrznej metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems, służącego do oznaczania całkowitej ilości DNA ludzkiego przy współpracy z aparatem 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1. Wyboru parametrów istotnych z punktu widzenia rutynowo prowadzonych badań dokonano na podstawie zaleceń grupy roboczej ds. DNA ENFSI, tj. Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process. Ocenie poddano: czułość, liniowość, zakres metody oraz precyzję z uwzględnieniem powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Dodatkowo podjęto próbę ustalenia, czy zasadna jest kontynuacja analiz genetycznych, jeżeli wskazania aparatu 7500 Real-Time dają wynik negatywny, tj. nie wykazały obecności DNA jądrowego przy jednoczesnych prawidłowych wskazaniach dla kontroli wewnętrznej IPC. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów walidacyjnych stwierdzono, że zakres, w jakim walidowana metoda spełniła zadane wcześniej kryteria akceptacji, jest satysfakcjonujący, biorąc pod uwagę specyfikę badań wykonywanych w laboratorium. Niemniej bardzo uważnie należy interpretować negatywne wskazania aparatu 7500 Real-Time PCR System, sugerujące brak obecności DNA jądrowego przy jednoczesnych prawidłowych wskazaniach dla kontroli wewnętrznej IPC. Okazuje się bowiem, że nie jest zasadne odstępowanie od dalszej analizy tego rodzaju próbek z uwagi na możliwość zastosowania nowych bardzo czułych zestawów do amplifikacji DNA, które niejednokrotnie pozwalają na uzyskanie pełnego profilu DNA. Podsumowując, walidacja metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem HID REAL-TIME PCR Analysis Software V1.1 została zakończona pozytywnie, w związku z czym metoda mogła zostać wdrożona i być rutynowo wykorzystywana do oznaczania całkowitej ilości DNA ludzkiego w próbkach biologicznych będących przedmiotem badań kryminalistycznych w Zakładzie Biologii CLKP.

Słowa kluczowe walidacja, kwantyfikacja DNA, Real-Time PCR, Quantifiler® Human DNA Quantification Kit

Wstęp

Metody genetyki molekularnej znalazły zastosowanie w różnorodnych badaniach z zakresu m.in.: ekologii, ewolucji organizmów, onkologii, kryminalistyki. Dane zawarte w markerach molekularnych (zmiennych dziedzicznych cechach DNA, RNA i białek) pozwalają zarówno na wnioskowanie dotyczące genetyki populacji, analizy rodzicielstwa i pokrewieństwa, jak i na identyfikację osobniczą. Powszechnie stosowane techniki biologii molekularnej cechuje m.in.: uniwersalność

zastosowania do różnych organizmów (od wirusów, przez bakterie do człowieka), dokładność uzyskiwanych wyników, krótki czas potrzebny na badania; ponadto wymagają śladowych ilości materiału biologicznego. Naukowcy w laboratoriach na całym świecie opracowują coraz to nowe metody, które mają za zadanie dodatkowo usprawnić i skrócić pracę analityków. Dzięki temu uzyskuje się wiarygodne informacje, oszczędzając czas i materiał badawczy, jak również zmniejszając koszty analizy. Nowoczesna kryminalistyka podąża za nowymi trendami, uwzględniając

wzrost efektywności i wydajności procesów oraz obniżenie kosztów. Dzisiejsze techniki śledcze bazują na zaawansowanych metodach naukowych szczególnie z zakresu biologii, co poprawia skuteczność wykrywania sprawców przestępstw. Na miejscu zdarzenia technicy kryminalistyki zabezpieczają szereg śladów kryminalistycznych, w tym ślady biologiczne. Materiał biologiczny, jaki trafia do pracowni biologicznych laboratoriów kryminalistycznych, bardzo często cechuje znaczny stopień degradacji DNA oraz wysoki stopień zanieczyszczenia, co może skutkować zarówno małą ilością DNA, jak i jego słabą jakością. Trafna wstępna ocena ilościowa i jakościowa próbki DNA ma wpływ na wynik końcowy analizy STR. Stąd niezwykle istotnym etapem badań dowodowego materiału biologicznego jest wiarygodne określenie ilości ludzkiego DNA oraz jego jakości przez ocenę możliwości występowania inhibitorów w badanej próbce.

Początkowo oceny ilości i jakości wyizolowanego DNA dokonywano przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym o niskim stężeniu, w której DNA barwione było bromkiem etydyny – mutagenem interkalującym w strukturę DNA lub innymi barwnikami fluorescencyjnymi SYBR Gold, SYBER Safe, Gel Red, które świecą w świetle UV. Kolejną metodą była hybrydyzacja „Slot-Blot” z sondą swoistą dla ludzkiego DNA, która nie była dokładna i wymagała znacznego nakładu pracy. Później stosowano w laboratoriach niespecyficzną metodę fluorometrycznego ilościowego oznaczania DNA za pomocą aparatu Fluoroskan Ascent. Metoda ta polegała na pośrednim obliczaniu ilości DNA przez pomiar fluorescencji barwnika interkalującego do podwójnych nici kwasu nukleinowego. Biorąc pod uwagę to, że w praktyce ślady biologiczne to często mocno zdegradowane „trudne” materiały archiwalne, w których oprócz DNA ludzkiego znajduje się np. DNA bakteryjne, wynik fluorometrycznego oznaczenia DNA nie był wiarygodny. Metoda ta jest niespecyficzna wobec ludzkiego DNA i wyniki uwzględniały również DNA pochodzące z innego źródła. Za negatywną cechę metody można uznać również rodzaj wykorzystywanego barwnika (PicoGreen), który ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne (interkalator) jest bardzo silnym mutagenem. Inną stosowaną powszechnie metodą jest pomiar spektrofotometryczny oparty na pomiarze absorbancji przy długości fali 230, 260, 280 nm. Otrzymane wartości absorbancji są przeliczane automatycznie przez aparat na stężenie i czystość białkową oraz organiczną. Do urządzeń wykorzystujących tę technikę można zaliczyć NanoDrop służący do spektrofotometrycznej analizy stężenia (ilości) i czystości (jakości) wyizolowanego materiału typu DNA i RNA. Zakres stężeń, w którym oznaczenie spektrofotometryczne jest wiarygodne, to ok. 10–3000 ng/μl, co czyni tę metodę mało precyzyjną lub niewystarczająco czułą, jeżeli chodzi o badania kryminalistyczne i ilości potrzebne do analizy markerów STR.

Dopiero jedno z najnowszych osiągnięć biologii molekularnej, metoda Real-Time PCR, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy DNA w czasie rzeczywistym, umożliwiła precyzyjne rozróżnienie i oznaczenie ilości produktu. Przy wykorzystaniu technik fluorescencyjnych możliwe stało się monitorowanie ilości produktu w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR. Największą zaletą tej metody jest wysoka czułość, a także szybkość i wydajność reakcji. Wadą metody Real-Time PCR jest to, że jak każda reakcja PCR może być zakłócona przez pewne związki chemiczne, zwane inhibitorami, często występujące naturalnie w badanych próbkach biologicznych (np. hemoglobinę, mocznik, kwasy humusowe czy barwniki z tkanin), jak również przez rozpuszczalniki organiczne (np. fenol, chloroform, alkohol) oraz przez sole (np. chlorek) używane podczas ekstrakcji kwasów nukleinowych. Jednak ta pozornie negatywna cecha w przypadku badań kryminalistycznych może zostać wykorzystana, dając niezwykle cenną informację o jakości badanej próbki pozwalającą na optymalizację amplifikacji w celu pozbycia się inhibitorów reakcji PCR.

Firma Applied Biosystem wyszła naprzeciw wymaganiom stawianym przez laboratoria kryminalistyczne, które mają na co dzień do czynienia z bardzo trudnym materiałem dowodowym, jakim są próbki biologiczne, i stworzyła trzy nowe zestawy: Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit oraz Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit, które wraz z aparatem 7500 REAL-TIME PCR SYSTEM z oprogramowaniem HID REAL-TIME PCR ANALYSIS SOFTWARE V 1.1 przeznaczone są do kwantyfikacji DNA w badaniach identyfikacyjnych prowadzonych w laboratoriach kryminalistycznych).

Zgodnie z wytycznymi Naukowej Grupy Roboczej ds. Analizy DNA (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods – SWGDAM) oraz z zaleceniami Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej w Normie PN-EN ISO/IEC 17025:2005 w pomieszczeniach laboratoryjnych Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji przed przystąpieniem do zastosowania nowej metody badawczej przeprowadzono jej walidację wewnętrzną [1, 2]. Przeprowadził ją przeszkolony personel laboratorium; wykonano szereg doświadczeń, których celem było sprawdzenie skuteczności działania nowej metody badawczej w warunkach danego laboratorium [3, 4].

Cel badań

Głównym celem badań było przeprowadzenie w Zakładzie Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji walidacji wewnętrznej metody kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit firmy

Applied Biosystems służącego do oznaczania całkowitej ilości DNA ludzkiego współpracującego z aparatem 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1.

Dodatkowo podjęto próbę ustalenia, czy zasadna jest kontynuacja dalszych analiz genetycznych, jeżeli wskazania aparatu 7500 Real-Time dają wynik negatywny, tj. nie wykazały obecności DNA jądrowego przy jednoczesnych prawidłowych wskazaniach dla kontroli wewnętrznej IPC. Doświadczenie to było istotne z punktu widzenia ekonomiki zużycia odczynników.

Materiały i metody

W przeprowadzonych doświadczeniach wykorzystano standard DNA będący sekwencją męskiego DNA (*pooled human male genomic DNA*) o znanym profilu i stężeniu wyjściowym [200 ng/μl], dołączony do firmowego zestawu odczynników Quantifiler Human DNA Quantification Kit.

Ocenę ilościową i jakościową DNA przeprowadzono metodą Real-Time PCR przy użyciu zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems współpracującego z aparatem 7500 Real-Time PCR System wraz z oprogramowaniem HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1.

Próbki amplifikowano techniką multipleksowej reakcji PCR przy użyciu termocyklera GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems z wykorzystaniem zestawu odczynników: AmpFISTR NGM PCR i AmpFISTR Y-filer PCR firmy Applied Biosystems oraz ESI 17 Power Plex firmy Promega.

Rozdział produktów reakcji PCR prowadzono przy użyciu sekwentatora kapilarnego ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems z oprogramowaniem do gromadzenia danych. Rozdział próbek przeprowadzono z użyciem dziesięciokrotnie stężonego Genetic Analyzer Buffer z EDTA. Produkty rozdzielano w kapilarze o długości 36 cm wypełnionej denaturującym nośnikiem POP4™ firmy Applied Biosystems. Analizę wyniku przeprowadzono przy użyciu programu GeneMapper ID-X 1.1. firmy Applied Biosystems.

Opis walidowanej metody

Walidowana metoda jest specyficzna dla ludzkiego DNA ze względu na zastosowanie sondy TaqMan MGB. Oligonukleotydy zawierające na końcu 5' fluorescencyjny barwnik reporterowy FAM (hybrydujący z docelowym ludzkim DNA) lub VIC (hybrydujący z wewnętrzną kontrolą pozytywną), na końcu 3' zawierają cząsteczkę wygaszającą fluorescencję (*quencher*). Sonda po związaniu się z komplementarną sekwencją na etapie wydłużania jest degradowana przez polimerazę Ampli Taq Gold mającą aktywność 5'-egzonukleazową, wtedy fluorochrom ulega

oddzieleniu od wygaszacza. Następuje emisja światła fluorescencyjnego. Na podstawie ilości przyrostu fluorescencji mierzona jest początkowa ilość badanego DNA. Im silniejsza fluorescencja, tym większa liczba kopii badanego DNA, która jest monitorowana w każdym cyklu reakcji amplifikacji. Po pewnej liczbie cykli reakcji poziom fluorescencji przekroczy zdefiniowany próg CT oznaczający wejście kinetyki reakcji w fazę wykładniczego przyrostu produktu. Wartość CT jest wykorzystywana do obliczania ilości badanego DNA obecnego w mieszaninie na początku reakcji. W tym celu sporządza się serię rozcieńczeń standardu DNA, program oblicza wartości CT kwantyfikacji standardów, według których wyznacza krzywą standardową. Po reakcji amplifikacji wartości CT badanych próbek przenoszone są na krzywą i dzięki temu uzyskuje się informacje o stężeniu DNA w danej próbce.

Oprogramowanie HID REAL-TIME PCR ANALYSIS SOFTWARE V 1.1 wyznacza linię regresji przez przeliczenie najlepiej pasujących danych ilości standardów. Wzór określający wartość CT to (1):

$$CT = m [\log (Qty)] + b \quad (1),$$

gdzie:

m – nachylenie (*slope*),

b – przecięcie linii Y (*Y-intercept*),

Qty – początkowa ilość DNA.

Dlatego uzyskiwane dane analizowane są według wskazań:

- wartości R^2 definiowanej jako stopień bliskości dopasowania pomiędzy linią regresji krzywej standardowej i indywidualnych wartości kwantyfikacji badanych próbek. Wartość 1,00 wskazuje na perfekcyjne dopasowanie pomiędzy krzywą regresji a punktami danych wartości. Wartość $R^2 \geq 0,99$ wskazuje na bardzo bliskie dopasowanie pomiędzy krzywą standardową a wartościami kwantyfikacji badanych próbek. Jeżeli $R^2 < 0,98$, należy sprawdzić poprawność ustawień płytki (np. wartości ilości standardów wpisanych podczas tworzenia dokumentu dla płytki, poprawność rozcieńczeń standardów), wyeliminować błędy oraz przeanalizować wyniki ponownie;
- nachylenia krzywej (*slope*) – mówiącej o wydajności reakcji amplifikacji dla danego eksperymentu. Należy pamiętać, że wartości *slope* dla każdego zestawu odczynników Quantifiler Human, Quantifiler Y, Quantifiler Duo są różne, przedstawiono je w tabeli 1;
- *Y-intercept* wskazujące na spodziewaną wartość CT dla próbki o ilości = 1 (np. 1ng/μl).

Sprawdzeniu jakości i poprawności reakcji amplifikacji oraz obecności inhibitorów w badanej próbce służą odczyty CT dla wewnętrznej kontroli pozytywnej (IPC) [5].

Tabela 1

Rekomendowane przez producenta wartości *slope* dla poszczególnych zestawów odczynników

Kit	Zalecany zakres wartości <i>slope</i>	Średnia wartość <i>slope</i>
Quantifiler Human	-2,9 do -3,3	-3,1
Quantifiler Y	-3,0 do -3,6	-3,3
Quantifiler Duo	-3,0 do -3,6	-3,3

Opis walidowanego zestawu

Zestaw Quantifiler® Human DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems służy do oznaczania całkowitej ilości ludzkiego DNA. W zestawie powielany jest fragment DNA genomowego hTERT (*human telomerase reverse transcriptase gene*) o długości 62 par zasad. W skład zestawu wchodzi: mix primerów, mix reakcyjny, standard DNA (*pooled human male genomic DNA* – sekwencja męskiego DNA o znanym profilu). Mix primerów zawiera: pary zsyntetyzowanych primerów, wewnętrzną kontrolę pozytywną (IPC) oraz dwie sondy znakowane barwnikami reporterowymi FAM i VIC. Wewnętrzna kontrola pozytywna (IPC) świadczy o poprawności procesu amplifikacji. Po tym, jaką wartość osiąga CT IPC, można stwierdzić, czy próbka faktycznie nie zawiera DNA, czy może jest w niej inhibicja. Sonda z barwnikiem FAM hybryduje z docelowym ludzkim DNA, natomiast sonda z barwnikiem VIC hybryduje z wewnętrzną kontrolą pozytywną. Mix reakcyjny zawiera w składzie: polimerazę Ampli Taq Gold, dNTP, pasywny barwnik ROX oraz bufor. W celu zminimalizowania możliwości wystąpienia różnic w wynikach badań na potrzeby badań walidacyjnych wykorzystano zestawy odczynników o jednym numerze serii.

Wyniki

Wyboru parametrów istotnych z punktu widzenia rutynowo prowadzonych badań dokonano na podstawie zaleceń grupy roboczej ds. DNA ENFSI, tj. „Recommended Minimum Criteria of the Valiation of Various Aspects of the DNA Profiling Process”. Badanymi parametrami były: czułość, liniowość, zakres metody, precyzja, w tym powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna [2]. Uzyskane wyniki omówiono poniżej.

Badanie czułości

Badanie czułości zostało wykonane w celu ustalenia, jakie zakresy stężeń DNA ludzkiego są wiarygodnie oznaczane ilościowo przez aparat 7500 REAL-TIME PCR System wraz z oprogramowaniem HID REAL-TIME PCR Analysis Software v1.1 z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit. W eksperymencie walidacyjnym sporządzono 10 rozcieńczeń standardu DNA o stężeniu wyjściowym 200 ng/μl. Rozcieńczenia od A do E zostały oznaczone trzykrotnie, rozcieńczenia od F do J zostały oznaczone sześciokrotnie. Schemat rozcieńczeń standardu DNA przedstawiono w tabeli 2. Za kryterium akceptacji czułości przyjęto zakres rekomendowany przez producenta, tj. od 23 pg/μl do 50 ng/μl [7, 8].

Eksperyment wykazał, iż uzyskane wyniki badań ilości ludzkiego DNA w zakresie stężeń od 11,5 pg/μl do 75 ng/μl są zbliżone do ilości zadanego DNA. Analiza oparta na wartościach mediany pozwala stwierdzić, że rozproszenie wyników jest stosunkowo niewielkie, co wskazuje na to, iż uzyskane wartości są zbliżone. Przy stężeniu 5,7 pg/μl i poniżej tej wartości wskazania aparatu nie są powtarzalne. Zestawienie wyników przedstawiono w tabeli 3 oraz na rycinach 1 i 2.

Tabela 2

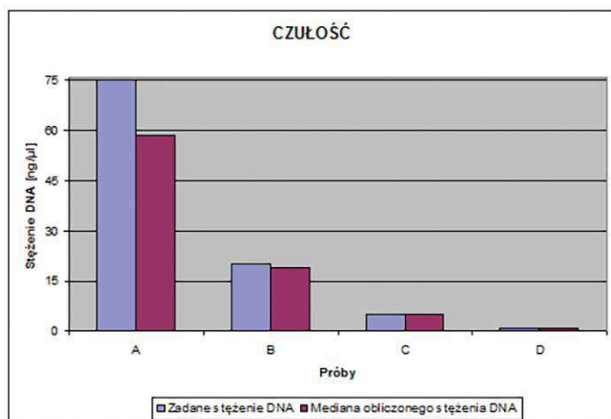
Schemat rozcieńczeń standardu DNA o stężeniu 200 ng/μl

Rozcieńczenie	Uzyskane stężenie DNA [ng/μl]	Schemat rozcieńczeń	Liczba powtórzeń
rozc. A	75	75 μl std. (200 ng/μl) + 125 μl H ₂ O _{dd}	3x
rozc. B	20	20 μl std.1 (50 ng/μl) + 30 μl H ₂ O _{dd}	3x
rozc. C	5	10 μl rozc. B (20 ng/μl) + 30 μl H ₂ O _{dd}	3x
rozc. D	1	10 μl rozc. C (5 ng/μl) + 40 μl H ₂ O _{dd}	3x
rozc. E	0,1	10 μl rozc. D (1 ng/μl) + 90 μl H ₂ O _{dd}	3x
rozc. F	0,023	50 μl std. 7 (0,068 ng/μl) + 100 μl H ₂ O _{dd}	6x
rozc. G	0,0115	100 μl rozc. H (0,023 ng/μl) + 100 μl H ₂ O _{dd}	6x
rozc. H	0,00575	100 μl rozc. I (0,0115 ng/μl) + 100 μl H ₂ O _{dd}	6x
rozc. I	0,00288	100 μl rozc. J (0,00575 ng/μl) + 100 μl H ₂ O _{dd}	6x
rozc. J	0,00144	100 μl rozc. K (0,00288 ng/μl) + 100 μl H ₂ O _{dd}	6x

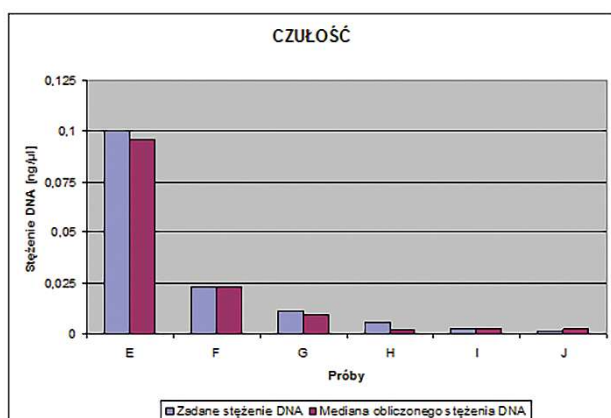
Tabela 3

Czułość metody – mediana obliczonego stężenia DNA a zadane stężenie DNA w badanych próbkach, mediana CT, mediana CT IPC

Próbka	Zadane stężenie DNA [ng/μl]	Uzyskane stężenie DNA [ng/μl]	Mediana obliczonego stężenia DNA [ng/μl]	CT	Mediana CT	CT IPC	Mediana CT IPC
A	75	57,66867	58,4976	22,794	22,77	28,459	28,25
A		58,49761		22,773		28,250	
A		59,71556		22,744		28,114	
B	20	17,37836	19,1131	24,506	24,37	27,077	27,08
B		19,11313		24,370		27,077	
B		19,66435		24,329		27,131	
C	5	5,07792	5,0123	26,261	26,28	27,127	27,13
C		4,97904		26,290		27,182	
C		5,01229		26,280		27,090	
D	1	1,04971	1,0021	28,511	28,58	27,363	27,48
D		1,00210		28,578		27,481	
D		0,91189		28,712		27,637	
E	0,1	0,09604	0,0960	31,924	31,92	27,658	27,60
E		0,08260		32,140		27,596	
E		0,09685		31,912		27,404	
F	0,023	0,02024	0,0230	34,146	33,97	27,580	27,38
F		0,02049		34,129		27,437	
F		0,02550		33,817		27,348	
F		0,02736		33,716		27,306	
F		0,00810		35,454		27,403	
F		0,03360		33,423		27,296	
G	0,0115	0,01149	0,0094	34,954	35,23	27,335	27,39
G		0,00535		36,047		27,341	
G		0,00972		35,193		27,338	
G		0,00917		35,276		27,448	
G		0,01447		34,626		27,479	
G		0,00706		35,649		27,575	
H	0,00575	0,00487	0,0019	36,180	37,51	27,490	27,36
H		0,00122		38,158		27,379	
H		0,00121		38,162		27,392	
H		0,00192		37,512		27,268	
H				Undetermined		27,331	
H		0,00967		35,201		27,229	
I	0,00288	0,00283	0,0027	36,953	37,02	27,332	27,34
I		0,00258		37,086		27,258	
I				Undetermined		27,266	
I		0,00129		38,077		27,355	
I		0,00615		35,846		27,442	
I				Undetermined		27,520	
J	0,00144		0,0023	Undetermined	37,22	27,447	27,33
J				Undetermined		27,457	
J		0,00227		37,272		27,358	
J		0,00243		37,171		27,292	
J				Undetermined		27,213	
J				Undetermined		27,112	



Ryc. 1. Czulość metody dla przedziału rozcieńczeń A-D.



Ryc. 2. Czulość metody dla przedziału rozcieńczeń E-J.

Na podstawie przeprowadzonych badań czulości stwierdzono, że wyznaczony eksperymentalnie zakres czulości metody w CLKP mieści się w przedziale stężeń od 11,5 pg/μl do 75 ng/μl DNA i spełnia zadane kryteria akceptacji.

Badanie liniowości

Badaną metodę kwantyfikacji DNA charakteryzuje zależność liniowa pomiędzy ilością początkową matrycy DNA a wartością CT, tj. cyklem, przy którym powielanie zaczyna mieć charakter wykładniczy. Wartość cyklu granicznego CT jest zależna od kinetyki reakcji i od początkowego stężenia DNA. Zazwyczaj wartość CT jest momentem wejścia reakcji w fazę logarytmiczną przyrostu ilości produktu.

Dla oznaczenia liniowości metody wykorzystano wyniki uzyskane w eksperymencie przeprowadzonym w celu określenia zakresu czulości opisanego powyżej. Liniowość metody poddano ocenie według współczynnika korelacji liniowej R. Współczynnik korelacji liniowej R jest miarą związku liniowego między dwiema zmiennymi (np. stężeniem DNA a wartością CT). Im współczynnik korelacji liniowej R jest bliższy 1, tym zależność liniowa jest silniejsza. W tab. 4 przedstawiono kryteria oceny współczynnika korelacji liniowej R.

Tabela 4

Wartości współczynnika korelacji R, a charakter zależności liniowej

Wartości współczynnika korelacji R	Zależność liniowa
< 0,2	brak związku liniowego
0,2–0,4	słaba zależność
0,4–0,7	umiarkowana zależność
0,7–0,9	dość silna zależność
>0,9	bardzo silna zależność

Za kryterium akceptacji przyjęto wartość współczynnika korelacji R > 0,9, co miałyby wskazywać na bardzo silną zależność liniową pomiędzy ilością początkową matrycy DNA a wartością CT.

Uzyskane eksperymentalnie wyniki badania liniowości przedstawiono graficznie na rycinie 3. Na wykresie widoczny jest obszar z liniową zależnością między medianą obliczonego stężenia DNA a medianą CT.

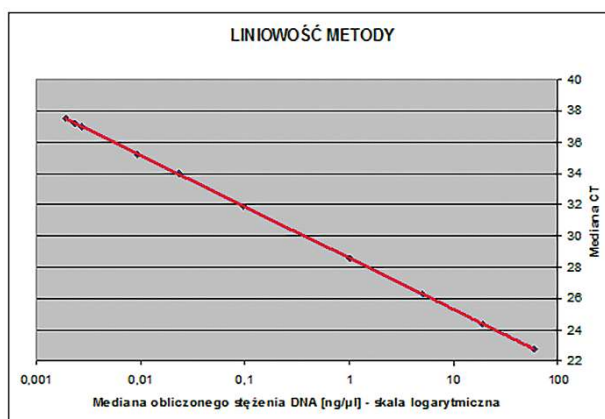
Dla pełnego zakresu stężeń DNA – próbki od A do J współczynnik korelacji liniowej R uzyskany w badaniach wynosi: 0,999997. W związku z powyższym należy stwierdzić, iż zadane kryterium akceptacji dla badania liniowości metody zostało spełnione w pełnym zakresie stężeń.

Zakres metody

Na podstawie kompleksowej analizy wyników badań czulości i liniowości wyznaczono eksperymentalnie zakres prawidłowego działania metody, tj. przedział między maksymalnym a minimalnym stężeniem DNA w badanej próbce prawidłowo oznaczanym przez aparat 7500 Real-Time PCR System. Ustalono, iż w laboratorium Zakładu Biologii zakres metody to przedział stężeń DNA od 11,5 pg/μl do 75 ng/μl.

Precyzja

Precyzja to stopień zgodności między pojedy-



Ryc. 3. Badanie liniowości metody.

czymi wynikami badania lub rozrzut wyników przy zastosowaniu danej metody do wielokrotnie powtarzalnych, niezależnych oznaczeń tej samej próbki. Precyzję walidowanej metody ustalono poprzez zbadanie powtarzalności uzyskiwanych wyników i zbadanie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Precyzja może być mierzona za pomocą odchylenia standardowego, względnego odchylenia standardowego lub współczynnika zmienności CV.

W prowadzonych doświadczeniach za miarę precyzji przyjęto wartość współczynnika zmienności (CV), który jest stosunkiem odchylenia standardowego (SD) i średniej obliczonych stężeń DNA (X), wyrażonym w procentach. Wzór określający współczynnik zmienności to (2):

$$CV = \frac{SD}{X} * 100 \% \quad (2),$$

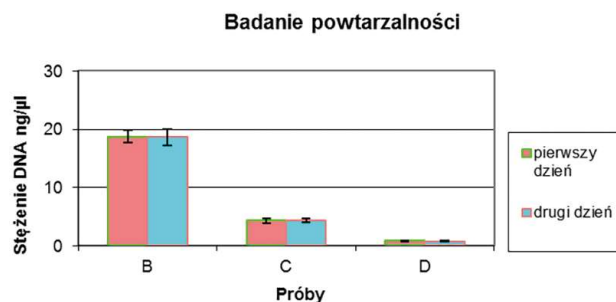
gdzie:

SD – odchylenie standardowe,

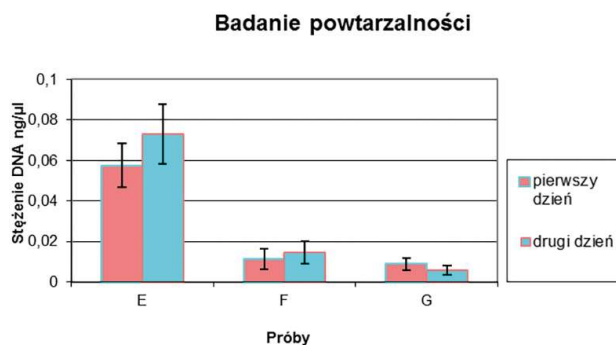
X – średnie obliczone stężenie DNA, gdzie $X \neq 0$.

Współczynnik zmienności informuje o zmienności wyników, co pozwala na określenie względnej miary ich rozproszenia. Za wynik precyzyjny uznaje się taki, dla którego wartość CV nie powinna przekraczać 15%, przy czym dla próbek o niskich stężeniach wartość CV może dochodzić do 20%, co świadczyłoby o dobrych odczytach automatu [6, 7].

Powtarzalność określa stopień zgodności oznaczeń stężenia DNA wykonanych w krótkich odstępach czasowych przez tego samego analityka, w tych samych warunkach pomiarowych (to samo urządzenie badawczo-pomiarowe, te same odczynniki, to samo laboratorium). Badanie powtarzalności przeprowadzone zostało dwukrotnie w trzydniowym odstępie przez jednego analityka z sześciokrotnym oznaczeniem każdego z 6 rozcieńczeń o znanym stężeniu DNA, dzięki czemu uzyskano 12 oznaczeń dla każdego z rozcieńczeń. Wyniki poddano analizie i obliczono średnie stężenie DNA oraz odchylenie standardowe. Wyniki badań powtarzalności przedstawiono w tabeli 5 oraz na rycinach 4 i 5. Dodatkowo na rycinie 6 przedstawiono zależność średniej wartości CT od stężenia DNA w badanych próbkach, a na rycinie 7 średnie



Ryc. 4. Powtarzalność dla przedziału stężeń B–D.



Ryc. 5. Powtarzalność dla przedziału stężeń E–G.

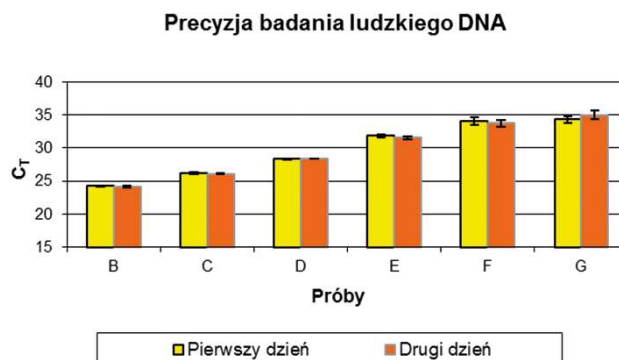
wartości CT kontroli wewnętrznej IPC, uzyskane przy użyciu kitu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.

Za kryterium akceptacji powtarzalności przyjęto wartość CV, która nie powinna przekroczyć 20%. Stwierdzono, iż walidowana metoda spełnia zadane kryterium akceptacji powtarzalności wyników dla próbek w zakresie stężeń od 0,1 ng/μ do 20 ng/μl (próbki od E do B).

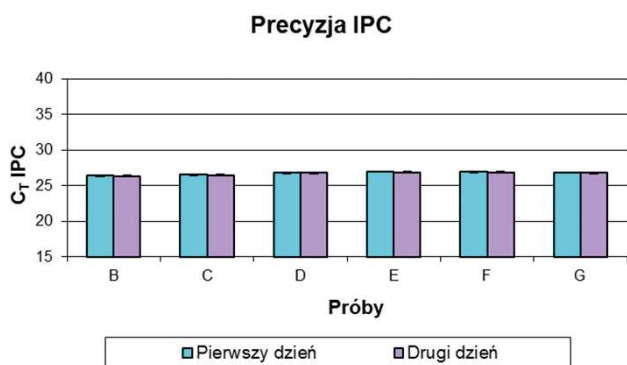
Odtwarzalność to precyzja wyników lub inaczej różnicowanie wyników uzyskanych w ciągu wielokrotnego badania tej samej próbki z zastosowaniem tej samej metody przez różnych analityków różniących się wiedzą i doświadczeniem w odstępie czasowym, a więc w odmiennych warunkach otoczenia. Badanie odtwarzalności przeprowadzono w trzydniowych odstępach. Dwóch różnych analityków wykonało sześciokrotne oznaczenie każdego z 6 rozcieńczeń (rozcieńczenia od B do G) o znanym stężeniu DNA, dzięki

Tabela 5
Powtarzalność wyrażona wartością współczynnika zmienności (CV)

Próbka n = 12	Zadane stężenie DNA [ng/μl].	Wartość współczynnika zmienności (CV) [%]
B	20	7
C	5	8
D	1	5
E	0,1	20
F	0,023	41
G	0,0115	36



Ryc. 6. Powtarzalność – zależność średniej wartości CT od stężenia DNA w badanych próbkach.

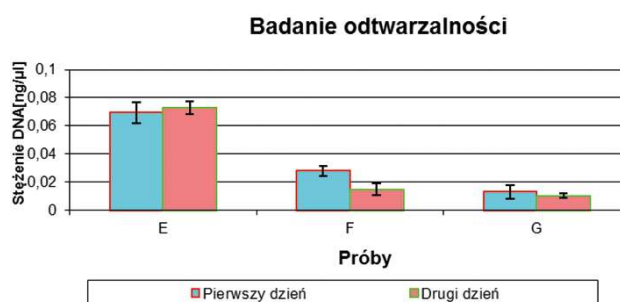


Ryc. 7. Powtarzalność – średnie wartości CT kontroli wewnętrznej IPC, uzyskane przy użyciu kitu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.

czemu uzyskano 12 oznaczeń dla każdego z rozcieńczeń. Uzyskane wyniki poddano analizie i obliczono średnie stężenie DNA oraz odchylenie standardowe. Wyniki badań odtwarzalności przedstawiono w tabeli 6 oraz na rycinach 8 i 9.

Za kryterium akceptacji odtwarzalności przyjęto wartość CV, która nie powinna przekroczyć 20%. Wyniki spełniające to kryterium uznano za akceptowalne. Stwierdzono, iż walidowana metoda spełnia zadane kryterium akceptacji odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej wyników w zakresie stężeń DNA od 0,1 ng/μl do 20 ng/μl (próbki od E do B).

Należy pamiętać, iż od metody stosowanej w laboratorium kryminalistycznym oczekiwane jest spełnienie kryterium precyzji, stąd istotna jest ocena tego



Ryc. 9. Odtwarzalność dla stężeń E–G

parametru w badaniach walidacyjnych. Kompleksowa analiza wyników uzyskanych dla powtarzalności i odtwarzalności pozwala stwierdzić, iż walidowana metoda kwantyfikacji DNA jest precyzyjna w zakresie stężeń DNA od 0,1 ng/μl do 20 ng/μl. Zestawienie wyników uzyskanych dla powtarzalności i odtwarzalności metody przedstawiono w tabeli 7.

Zasadność dalszej analizy markerów STR w przypadku wykrycia obecności DNA jądrowego w próbce

W ramach walidacji wewnętrznej kwantyfikacji ilości DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real-Time PCR System oraz oprogramowania HID Real-Time PCR Analysis Software v 1.1 przeprowadzono doświadczenie, którego celem było ustalenie, czy zasadna jest kontynuacja dalszych analiz genetycznych, jeżeli wskazania aparatu 7500 Real-Time dają wynik negatywny, tj. nie wykazały obecności DNA jądrowego przy jednoczesnych prawidłowych wskazaniach dla kontroli wewnętrznej IPC. Doświadczenie to było istotne z punktu widzenia ekonomiki zużycia odczynników.

Dalszej analizie markerów STR poddano rozcieńczenia standardu DNA o stężeniu 0,0057 ng/μl i poniżej stężenia 0,0057 ng/μl (rozcieńczenia od H do J), dla których uzyskano negatywne wskazania aparatu. Do amplifikacji zostały wykorzystane trzy komercyjne zestawy dostępne obecnie na rynku: AmpFISTR NGM PCR i AmpFISTR Y-filer PCR firmy Applied Biosystems oraz ESI 17 Power Plex firmy Promega. Wyniki przeprowadzonego eksperymentu zostały przedstawione w tabeli 8.

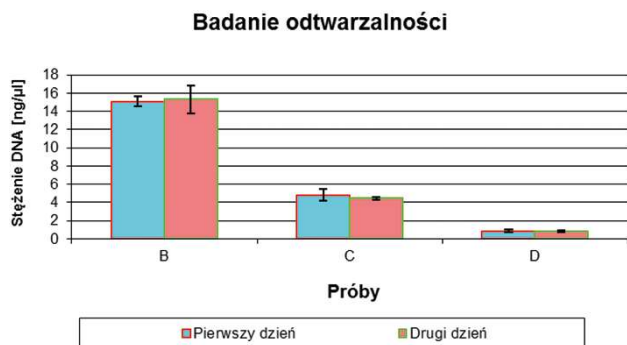
Amplifikacja przy użyciu zestawu AmpFISTR NGM PCR Applied Biosystem. Próbkę o stężeniu 5,75 pg/μl – uzyskano częściowe profile, zauważono wypadanie pojedynczych alleli (próbki H). Próbkę o stężeniu 2,88 pg/μl i 1,44 pg/μl – uzyskano pojedyncze układy (próbki I i J).

Amplifikacja przy użyciu zestawu Power Plex ESI 17 firmy Promega. Próbkę o stężeniu 5,75 pg/μl – uzyskano pełne profile STR-owe. Jedynie w jednej próbce odnotowano wypadnięcie jednego układu/allelu (próbki H). Próbkę o stężeniu 2,88 pg/μl – w jednej próbce uzyskano pełny profil, w dwóch próbkach

Tabela 6

Odtwarzalność wyrażona wartością współczynnika zmienności (CV)

Próbka n = 12	Zadane stężenie DNA [ng/μl]	Wartość współczynnika zmienności (CV) [%]
B	20	7
C	5	8
D	1	11
E	0,1	13
F	0,023	21
G	0,0115	23



Ryc. 8. Odtwarzalność dla stężeń B–D.

Tabela 7

Precyzja – zestawienie wyników powtarzalności i odtwarzalności

Próbka	Zadane stężenie DNA [ng/μl]	POWTARZALNOŚĆ wartość współczynnika zmienności (CV) [%]	ODTWARZALNOŚĆ wartość współczynnika zmienności (CV) [%]	PRECYZJA
B	20	7	7	Metoda precyzyjna
C	5	8	8	Metoda precyzyjna
D	1	5	11	Metoda precyzyjna
E	0,1	20	13	Metoda precyzyjna
F	0,023	41	21	Metoda mało precyzyjna
G	0,0115	36	23	Metoda mało precyzyjna

Tabela 8

Porównanie wyników amplifikacji

Próbka	Zadane stężenie DNA [ng/μl]	Uzyskane stężenie DNA [ng/μl]	AmpFISTR NGM PCR	ESI 17 Power Plex	AmpFISTR Y-filer PCR
H	0,00575	0,00315	amel, 12/15 układów	amel, 15/16 układów	pełny profil
H			amel, 13/15 układów	pełny profil	15/16 układów
H			amel, 14/15 układów	pełny profil	pełny profil
I	0,00288	0,00215	3/15 układów	amel, 12/16 układów	11/16 układów
I			5/15 układów	pełny profil	9/16 układów
I			4/15 układów	amel, 14/16 układów	9/16 układów
J	0,00144	0,00078	4/15 układów	amel, 13/16 układów	4/16 układów
J			1/15 układów	amel, 10/16 układów	7/16 układów
J			1/15 układów	amel, 11/16 układów	12/16 układów

odnotowano wypadnięcie od dwóch do czterech układów (próbki I). Próbki o stężeniu 1,44 pg/μl – dla jednej próbki uzyskano pełny profil, w dwóch próbkach odnotowano wypadnięcie od dwóch do czterech układów (próbki J).

Amplifikacja przy użyciu zestawu AmpFISTR Y-filer PCR Applied Biosystems. Próbki o stężeniach 5,75 pg/μl – dla dwóch próbek uzyskano pełne profile, dla jednej próbki profil częściowy (próbki H). Próbki o stężeniach 2,88 pg/μl i poniżej – uzyskano częściowe profile (próbki I i J).

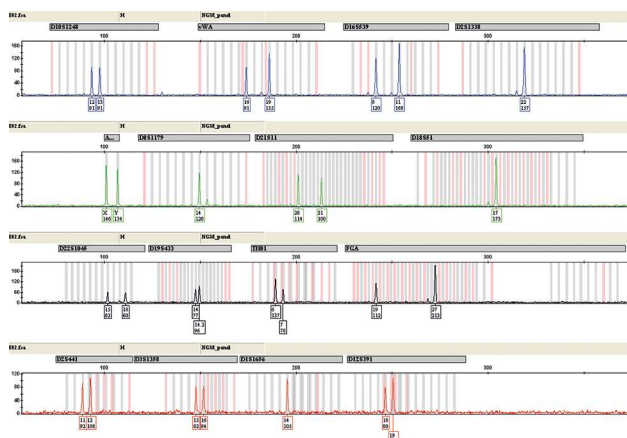
Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że choć aparat 7500 Real-Time PCR System nie wykrył obecności DNA jądrowego w próbkach i dał odczyt negatywny; odstępowanie od dalszej analizy markerów STR próbki nie jest właściwe. W takich przypadkach należy kontynuować badania. Przykładowe wyniki w postaci elektroforegramów zamieszczono na rycinach poniżej (ryc. 10–14).

Wnioski

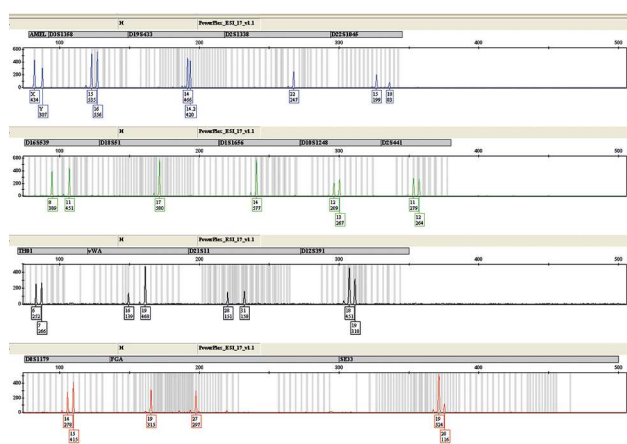
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów walidacyjnych kwantyfikacji DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler® Human DNA Quantification Kit i aparatu 7500 Real-Time PCR System wraz z opro-

gramowaniem HID REAL-TIME PCR Analysis Software v 1.1 stwierdzono, że:

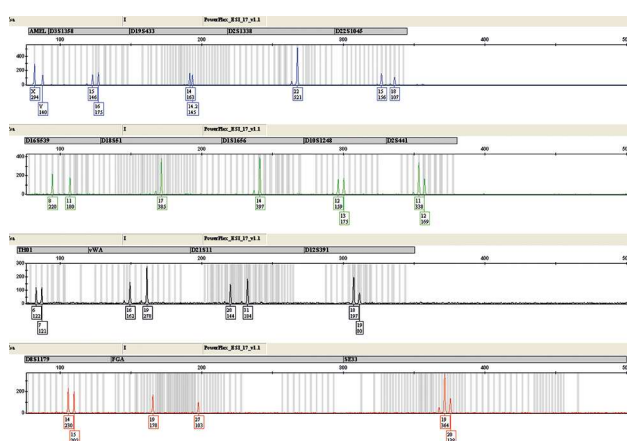
- Walidowana metoda spełnia założone kryterium akceptacji czułości w zakresie stężeń DNA od 11,5 pg/μl do 75 ng/μl. Zauważono dużą rozbieżność wyników dla prób o niskim stężeniu DNA. Wpływ na powyższe ma m.in.: zmienność wydajności amplifikacji związana ze zbyt małą ilością matrycowego DNA obecnego w badanych próbkach oraz możliwość popełnienia błędów manualnych przez analityka przy sporządzaniu rozcieńczeń czy nakładaniu prób (tzw. błąd pipetowania). Biorąc pod uwagę, że ilości DNA rekomendowane do analizy markerów STR dla poszczególnych zestawów do amplifikacji DNA mieszczą się w przedziale od 0,5 do 2,0 ng/μl DNA, ustalony zakres czułości metody kwantyfikacji DNA w próbkach biologicznych jest satysfakcjonujący dla prowadzonych przez nasze laboratorium badań. W przypadku próbek zawierających DNA o stężeniu 0,1 ng/μl lub poniżej konieczne jest dodanie do reakcji amplifikacji maksymalnej zalecanej objętości ekstraktu DNA w celu uzyskania jak najlepszych wyników w analizie markerów STR.
- Walidowana metoda spełnia założone kryterium akceptacji liniowości w pełnym zakresie stężeń DNA, tj. od 1,44 pg/μl do 75 ng/μl.



Ryc. 10. Profil DNA próbki H [5,75 pg/μl] oznaczony w systemie NGM.

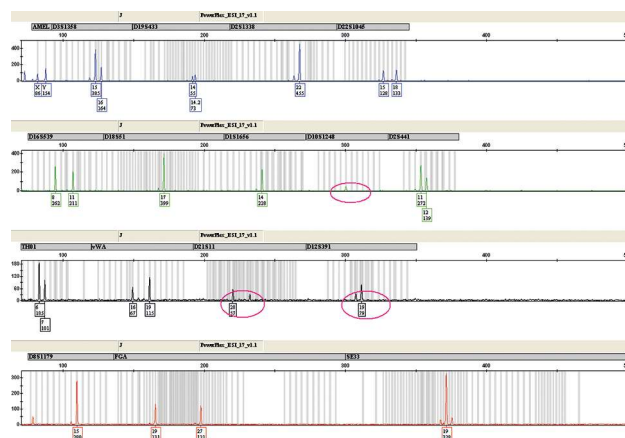


Ryc. 11. Profil DNA próbki H [5,75 pg/μl] oznaczony w systemie ESI 17 Power Plex.

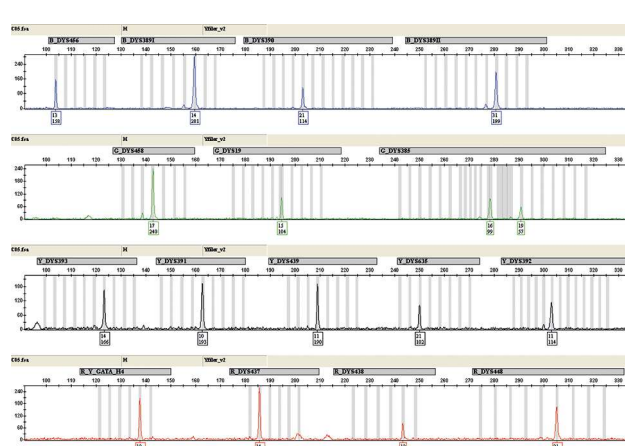


Ryc. 12. Profil DNA próbki I [2,88 pg/μl] oznaczony w systemie ESI 17 Power Plex.

- Opierając się na wynikach badania czułości i liniowości metody, wyznaczono eksperymentalnie zakres prawidłowego działania metody w laboratorium. Ustalono, iż walidowana metoda działa prawidłowo w zakresie stężeń DNA od 11,5 pg/μl do 75 ng/μl.



Ryc. 13. Profil DNA próbki J [1,44 pg/μl] oznaczony w systemie ESI 17 Power Plex.



Ryc. 14. Profil DNA próbki H [5,75 pg/μl] oznaczony w systemie Y-filer PCR.

- Od metod stosowanych w laboratorium kryminalistycznym oczekiwane jest spełnienie kryterium precyzji, stąd niezwykle istotna jest ocena tego parametru w badaniach walidacyjnych. Kompleksowa analiza wyników uzyskanych dla powtarzalności i odtwarzalności międzylaboratoryjnej pozwala stwierdzić, iż walidowana metoda kwantyfikacji DNA jest precyzyjna w zakresie stężeń DNA od 0,1 do 20 ng/μl.
- W przypadku próbek, dla których uzyskano negatywne wskazania aparatu 7500 Real-Time PCR System, sugerujące brak obecności DNA jądrowego przy jednoczesnych prawidłowych wskazaniach dla kontroli wewnętrznej IPC, uzyskane wyniki badań potwierdzają konieczność prowadzenia dalszych analiz markerów STR. Nie jest zasadne odstępowanie od dalszej analizy próbek z negatywnymi wskazaniami aparatu, gdyż zastosowanie nowych bardzo czułych zestawów do amplifikacji DNA niejednokrotnie pozwala na uzyskanie pełnego profilu DNA.

Źródła rycin i tabel

Ryciny: 1–14: autorki

Tabele: 1–8: opracowanie własne

Bibliografia

1. PN-EN ISO/IEC 17025 (2005), Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
2. ENFSI DNA Working Group, Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, 2010.
3. Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R.: Proces walidacji w kryminalistycznych badaniach profilowania DNA, „Problemy Kryminalistyki” 2008, 262, 5.
4. Brągoszewska A., Zbieć-Piekarska R.: Wskazówki do walidacji wewnętrznej multipleksowych zestawów STR, 2011.
5. Applied Biosystems „Quantifiler® Kits – User’s Manual”, 04/2006.
6. Workshop/Conference Report, Vinod P. Shah, Kamal K. Midha, John W.A. Findlay, Howard M. Hill, James D. Hulse, Iain J. McGilveray, Gordon McKay, Krys J. Miller, Rabindra N. Patnaik, Mark L. Powell, Alfred Tonelli, C.T. Viswanathan, and Avraham Yacobi: Bioanalytical Method Validation – A Revist with a Decade of Progress, 14 September 2000.
7. Jakubowska M., Katedra Chemii Analitycznej WIMiC AGH, Walidacja metod analitycznych.
8. Barbasin M., Fang R., O’Shea C.E., Calandoro L.M., Furtado M.R., Shewale J.G.: Developmental Validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit for Simultaneous Quantification of Total Human and Human Male DNA and Detection of PCR Inhibitors in Biological Samples, Forensic Sci. March 2009, Vol. 54, No. 2.
9. „Validation and new features”, HID Real Time PCR Analysis Software v1.1, Applied Biosystems, November 2010.