

Renata Rodzik, Magdalena Dębska

Walidacja magnetycznej metody izolacji DNA z zastosowaniem AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System

Wstęp

Znaczący rozwój genetyki sprawił, że kryminalistyka z powodzeniem wykorzystuje metody badań DNA pozwalające na odtworzenie przebiegu zdarzenia oraz powiązanie ofiary lub podejrzanego z konkretnym przestępstwem. Ślady biologiczne pozostawione na miejscu zdarzenia zawierają często niewielką ilość materiału genetycznego, który ma znaczący wpływ na proces analizy próbek i jakość wyniku końcowego. Uzyskanie pełnego profilu genetycznego z zabezpieczonych śladów nierzadko stanowi dla eksperta kryminalistyki duże wyzwanie. W celu poprawy ogólnej wydajności, koncentracji i czystości DNA oraz skrócenia procesu analizy firma Applied Biosystems stworzyła zestaw o nazwie handlowej PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit dający ekstrakty o wysokiej jakości DNA wolnego od inhibitorów reakcji PCR.

Podczas procesu walidacji ocenie poddane zostały wyniki uzyskane w laboratorium i deklaracje producenta dotyczące zarówno aparatury, jak i stosowanych odczynników w zakresie wykorzystania ich w procesie ekstrakcji DNA z biologicznych śladów kryminalistycznych. Przeprowadzenie walidacji nowo wdrażanej do stosowania metody w laboratorium Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji było zgodne z wytycznymi Naukowej Grupy Roboczej ds. Analizy DNA (ang. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods – SWGDAM) oraz Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (ang. International Standards Organization – ISO) w Normie PN-EN ISO 17025:2005.

W ramach walidacji nowa metoda została poddana wszechstronnej ocenie efektywności, niezawodności i wiarygodności.

Przedmiot walidacji

Walidacji poddano metodę magnetycznej, automatycznej izolacji DNA z zastosowaniem systemu AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System firmy Applied Biosystems.

Opis walidowanego systemu oraz jego przeznaczenie

AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System składa się z:

- aparatu AutoMate Express™ Instrument (ryc. 1–2),
- dwóch zestawów odczynników PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit:
 - PrepFiler Express™
 - PrepFiler Express BTA™.



Ryc. 1. Stacja robocza do automatycznej izolacji DNA z zastosowaniem kulek magnetycznych – AutoMate Express™ Instrument

Fig. 1. Workstation for automated DNA extraction with paramagnetic beads – AutoMate Express™ Instrument

Źródło (ryc. 1–20): autorki

Zestaw odczynników PrepFiler Express™ przeznaczony jest do ekstrakcji DNA z typowych śladów biologicznych, takich jak ślina, krew, sperma, włosy, wymazy ze śluzówki jamy ustnej. Za pomocą drugiego zestawu odczynników – PrepFiler Express BTA™ możliwa jest izolacja DNA z tzw. „trudnych śladów”, m.in. z materiału kostnego oraz materiału biologicznego znajdującego się na podłożach o dużej przyczepności i lepkości, takich jak guma do żucia, znaczki pocztowe, taśmy klejące i niedopałki papierosów. Metoda magnetycznej ekstrakcji DNA oparta jest na powinowactwie DNA do ligandu związanego z kulkami magnetycznymi, dzięki czemu można uzyskać ekstrakty o dużej wydajności i czystości. Izolacja DNA z zastosowaniem AutoMate Express™ Instrument możliwa jest dzięki specjalnym wkładom z odczynnikami zawierającymi m.in. magnetyczne kulki (ryc. 3) i przebiega w czterech etapach:

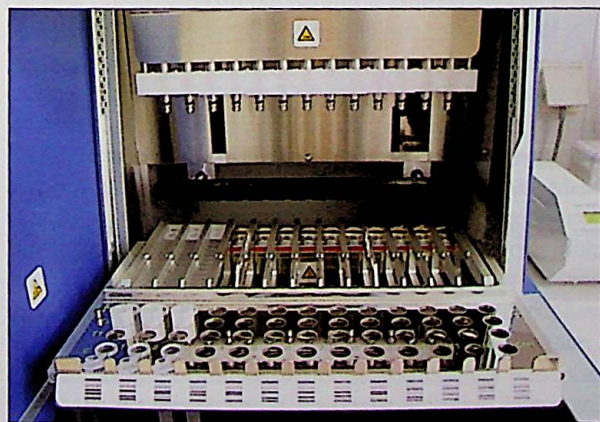
- liza komórek,
- wiązanie DNA z magnetycznymi kulkami,
- przemywanie DNA za pomocą buforów,
- elucja uwolnionego DNA.

Przy zastosowaniu AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System możliwa jest jednoczesna ekstrakcja DNA z 13 próbek w czasie 30 min. Finalnie otrzymuje się DNA zawieszone w 50 µl buforu.

Testowane parametry

Testowano następujące parametry:

- badanie czułości i liniowości,
- badanie powtarzalności i odtwarzalności,
- badanie kontaminacji krzyżowej,
- badanie różnych typów biologicznych próbek kryminalistycznych analizowanych w laboratorium Zakładu Biologii CLKP,



Ryc. 2. Wnętrze stacji roboczej AutoMate Express™ Instrument z załadowanymi wkładami z odczynnikami oraz próbkami

Fig. 2. The interior of Automate Instrument Express™ workstation with loaded cartridges and tubes

- porównanie efektywności metody magnetycznej z metodami ekstrakcji stosowanymi w Zakładzie Biologii CLKP (metodą organiczną oraz absorpcji-elucji).

Rodzaj wykorzystanego materiału biologicznego i liczba przebadanych próbek

Materiał badawczy stanowiły próbki:

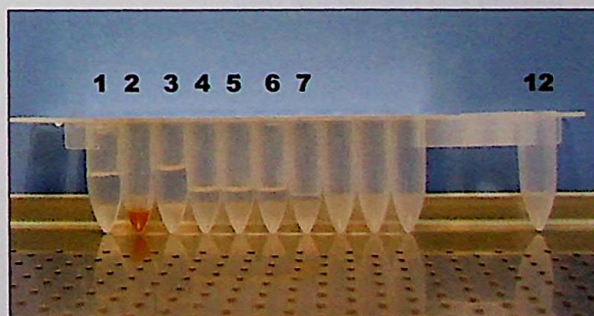
- krew płynna pobrana na antykoagulant EDTA,
- plamy krwi naniesione na jałowe płótno,
- wymazy ze śluzówki jamy ustnej,
- ślina,
- włosy w fazie anagenu,
- substancja potowo-tłuszczowa,
- sperma naniesiona na jałowe płótno,
- krew na podłożach zawierających inhibitory reakcji PCR,
- krew zabezpieczona na bibule i przechowywana przez 20 lat w temperaturze pokojowej,
- fragmenty kostne pochodzące z N.N. zwłok, stanowiące materiał dowodowy do ekspertyz wykonywanych w Zakładzie Biologii CLKP.

Materiał biologiczny w postaci wymazów ze śluzówki jamy ustnej i substancji potowo-tłuszczowej pobierano na wymazówki i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia.

Próbki krwi, spermy, włosów, substancji potowo-tłuszczowej pobrane zostały od znanych dawców – pracowników Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji, na wykorzystanie których, w zakresie niezbędnym do przeprowadzenia walidacji systemu, uzyskano pisemną zgodę każdej z osób.

Wszystkie doświadczenia wykonano w obecności kontroli negatywnej, dla której otrzymano prawidłowe wyniki.

W toku doświadczeń walidacyjnych przeprowadzono ekstrakcję 87 próbek z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express™ i ekstrakcję 89 próbek z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express BTA™.



Ryc. 3. Wkład z odczynnikami do aparatu AutoMate Express™ Instrument

- 1 – bufor lizujący,
- 2 – kulki magnetyczne,
- 3 – roztwór wiążący,
- 4–6 – bufor myjący,
- 7 – bufor elucyjny,
- 12 – ogrzewana komora do elucji

Fig. 3. Cartridge with the reagents for AutoMate Express™ Instrument

Metody badawcze

Ekstrakcja DNA

- Do przeprowadzenia ekstrakcji DNA z próbek krwi, wymazów ze śluzówki jamy ustnej, substancji potowłuszczowej, spermy, włosów, wykorzystano zestaw odczynników PrepFiler Express™.
- Do przeprowadzenia izolacji DNA z próbek materiału biologicznego na podłożach o dużej przyczepności i lepkości oraz z materiału kostnego wykorzystano zestaw odczynników PrepFiler Express BTA™.

Ekstrakcję przeprowadzono z użyciem aparatu AutoMate Express™ Instrument.

Do porównania efektywności izolacji DNA metodą magnetyczną zastosowano dwie inne metody, standardowo używane w Zakładzie Biologii CLKP:

- metodę organiczną (dla przygotowanych próbek kryminalistycznych),
- metodę absorpcji-elucji (dla materiału kostnego) z użyciem QIAamp DNA Blood Maxi Kit firmy QIAGEN Maxi Kit.

Do porównania efektywności metody magnetycznej pod kątem zdolności do oczyszczania materiału biologicznego z inhibitorów reakcji PCR oraz ekstrakcji zdegradowanego DNA wybrano metodę organiczną.

Ocena ilości DNA

Ocenę ilości DNA przeprowadzono metodą Real Time PCR za pomocą aparatu ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System i z użyciem zestawu odczynników Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems.

Amplifikacja fragmentów DNA

Otrzymane ekstrakty amplifikowano z wykorzystaniem multiplexowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® NGM firmy Applied Biosystems i aparatu GeneAmpPCR® System 9700 firmy Applied Biosystems. Do przeprowadzenia amplifikacji z próbek pobranych z materiału kostnego wykorzystano zestaw odczynników AmpFISTR®NGM PCR Amplification Kit oraz AmpFISTR® IdentiFiler z użyciem GeneAmp PCR® Systems 9700 firmy Applied Biosystems.

Elektroforeza i analiza produktów reakcji PCR

Produkty reakcji PCR poddano elektroforezie z użyciem aparatu ABI PRISM® 3130xl. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono, stosując program GeneMapper ID v 3.2.1.

Zdefiniowanie testowanych parametrów i kryteriów akceptacji, opis przeprowadzonych doświadczeń dla badanych parametrów i wyniki

Charakterystykę badanych parametrów przeprowadzono na podstawie rekomendacji ENFSI DNA Working Group zawartych w Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (2010) [1].

Badanie czułości i liniowości

Doświadczenie:

Czułość jest to ilość materiału biologicznego, z którego możliwe jest wyizolowanie DNA o stężeniu umożliwiającym przeprowadzenie dalszych oznaczeń i uzyskanie wiarygodnych wyników. Badanie czułości polegało na wyznaczeniu zakresu ilości DNA wyekstrahowanego z materiału biologicznego wystarczającego do uzyskania pełnego profilu DNA. W celu wyznaczenia czułości ekstrakcja DNA została przeprowadzona w czterech powtórzeniach dla pięciu różnych objętości krwi płynnej (8 µl, 5 µl, 1 µl, 0,25 µl, 0,1 µl). Za kryterium akceptacji badania czułości przyjęto uzyskane stężenia DNA [ng/µl] dla różnych objętości badanej krwi płynnej w próbce [µl]. Zbadano także liniowość metody. Za kryterium akceptacji liniowości przyjęto wartość współczynnika korelacji R , który powinien mieścić się w I grupie zależności (tabela 1). Współczynnik korelacji określa zależność liniową między objętością badanej krwi płynnej w próbce [µl] a stężeniem DNA [ng/µl]. Im współczynnik ten jest bliższy wartości 1, tym zależność liniowa jest silniejsza.

Wyniki:

Średnie stężenia DNA [ng/µl] dla różnych objętości badanej krwi płynnej w próbce [µl] przedstawiono w tabeli 2. W wyniku badania czułości ze wszystkich badanych objętości krwi, od 0,1 µl do 8 µl, uzyskano DNA w zakresie stężeń od 0,01 ng/µl do 2,55 ng/µl. Dla wszystkich badanych objętości krwi otrzymano pełne profile DNA przy wykorzystaniu zestawu do amplifikacji STR AmpFISTR® NGM. W badaniach czułości przeprowadzonych przez firmę Applied Biosystems, wykonanych podczas walidacji rozwojowej, także ze wszystkich badanych objętości krwi uzyskano pełne profile DNA [2]. Dla badania liniowości otrzymany współczynnik korelacji R wynosił 0,9939 i mieścił się w I grupie zależności (tabela 1), spełniając założone kryterium akceptacji. W podobnych badaniach liniowości przeprowadzonych przez Applied Biosystems współczynnik korelacji R wynosił 0,9996 [2]. Zależność liniowa wzrastała proporcjonalnie między objętością badanej krwi płynnej w próbce od 0,1 µl do 8 µl a stężeniem DNA w zakresie od 0,01 ng/µl do 2,55 ng/µl (ryc. 4).

Tabela 1.

Wartości zależności liniowej dla współczynnika korelacji R

Values for linear dependence of correlation coefficient R

Grupa zależności	Zależność liniowa	Współczynnik korelacji R
I	bardzo silna zależność	> 0,9
II	dość silna zależność	0,7–0,9
III	umiarkowana zależność	0,4–0,7
IV	słaba zależność	0,2–0,4
V	brak związku liniowego	< 0,2

Źródło (tab. 1–8): opracowanie własne

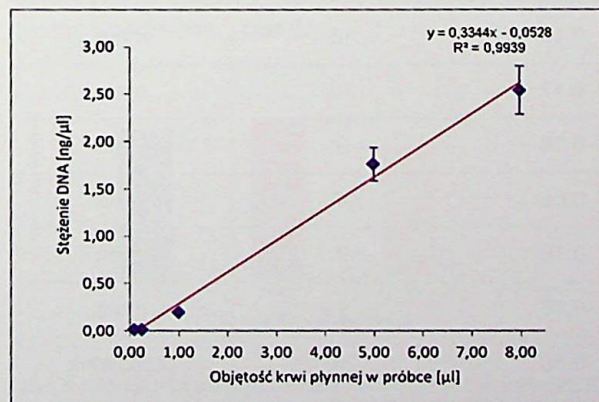
Tabela 2.

Badanie czułości: średnie stężenia DNA [ng/μl] dla różnych objętości badanej krwi płynnej w próbce [μl]

Sensitivity test: mean concentration of DNA [ng/μl] for different volumes of liquid blood samples [μl]

Próbki krwi płynnej [μl]	Średnie stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce (n = 4)
8 μl	2,55
5 μl	1,76
1 μl	0,20
0,25 μl	0,02
0,1 μl	0,01

n – ilość powtórzeń badanej próbki



Ryc. 4. Wykres zależności stężenia DNA [ng/μl] od objętości badanej krwi płynnej w próbce [μl]

Fig. 4. Dependence of concentration of DNA [ng /μl] on liquid blood in the sample [μl]

Badanie powtarzalności i odtwarzalności

Doświadczenie:

Powtarzalność to zróżnicowanie wyników uzyskanych przez jednego analityka w ciągu wielokrotnego badania tej samej próbki w tych samych warunkach pomiarowych,

a więc w tym samym laboratorium i warunkach środowiskowych, na tym samym urządzeniu badawczo-pomiarowym i przy zastosowaniu tych samych odczynników. Badanie powtarzalności przeprowadzono w jednym dniu, wykonując trzy ekstrakcje w tych samych warunkach pomiarowych.

Do badania powtarzalności użyto materiału badawczego w postaci:

- 13 próbek krwi płynnej o objętości 5 μl (po jednej próbce na każde z 13 ramion aparatu AutoMate Express™ Instrument),
- 50 mg pyłu kostnego pochodzącego z pięciu różnych fragmentów kostnych (utrzymując to samo położenie w ramieniu aparatu AutoMate Express™ Instrument dla tej samej próbki).

Dla próbek z płynnej krwi zastosowano zestaw odczynników PrepFiler Express™, natomiast dla próbek z pyłu kostnego zestaw odczynników PrepFiler Express BTA™. Za kryterium akceptacji badania powtarzalności przyjęto wartość współczynnika zmienności CV [%] dla średnich stężeń DNA, mieszczący się w I–II grupie zmienności. Współczynnik zmienności CV [%] jest uniwersalnym miernikiem precyzji określającym iloraz odchylenia standardowego i średniej arytmetycznej, wyrażonym w procentach. Wartości współczynnika zmienności CV [%] zawarto w tabeli 3.

Współczynnik zmienności definiowany jest wzorem:

$$CV = (SD/X) \times 100\%; X \neq 0$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe z próby,

X – średnia arytmetyczna z próby.

Tabela 3.

Wartości współczynnika zmienności CV [%]

Values of variation coefficient CV [%]

Grupa zmienności	Zmienność	Współczynnik zmienności CV [%]
I	mała	0–20
II	przeciętna	21–40
III	duża	41–100
IV	bardzo duża	101–150
V	skrajnie duża	> 150

Odtwarzalność to zróżnicowanie wyników uzyskanych przez różnych analityków w ciągu wielokrotnego badania tej samej próbki z zastosowaniem tej samej metody, w odstępie czasowym. Badanie odtwarzalności przeprowadzono przez trzy kolejne dni, wykonując w trzykrotnym powtórze-

niu ekstrakcję tej samej próbki z zastosowaniem tej samej metody przez analityków różniących się doświadczeniem. Do badania odtwarzalności użyto materiału badawczego w postaci plam krwi uzyskanych z objętości 5 µl umieszczonych na jałowym płótnie. Dla próbek z płynnej krwi zastosowano zestaw odczynników PrepFiler Express™. Za kryterium akceptacji odtwarzalności przyjęto pomiar stężenia DNA w otrzymanych ekstraktach dokonany metodą Real Time PCR w dwóch powtórzeniach, wyznaczając wartość CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej (IPC CT) oraz stężenie DNA [ng/µl] każdej badanej próbki. Wartość IPC CT jest numerem cyklu, w którym pojawia się sygnał fluorescencyjny powyżej wartości progowej, reprezentujący początkową ilość określonego fragmentu DNA. Prawidłowa wartość IPC CT powinna oscylować w granicach 28.

Wyniki:

Dla badania powtarzalności z badanej krwi płynnej w próbce uzyskano następujące wyniki. Współczynnik

zmienności CV [%] dla każdego z 13 ramion AutoMate Express™ Instrument przedstawia tabela 4.

W większości analizowanych powtórzeń stwierdzono dużą powtarzalność wyników, świadczy o tym mały współczynnik zmienności ($CV \leq 20$). W przypadku ramienia E7 i E12 uzyskano przeciętną powtarzalność wyników ($CV = 21-40$). Rozbieżności w uzyskanych wynikach mogły być konsekwencją braku precyzji operatora w trakcie przygotowania lizatu podczas I etapu ekstrakcji lub niehomogenicznego charakteru materiału badawczego, którym była krew.

Wyniki badania powtarzalności z różnego rodzaju materiału kostnego przedstawiono w tabeli 5.

W trzech badanych przypadkach uzyskano wysoką powtarzalność wyników (dla pyłu kostnego z główki kości długiej, fragmentu trzonu kości długiej oraz żuchwy), świadczył o tym mały współczynnik zmienności ($CV \leq 20$). W pozostałych dwóch przypadkach uzyskano przeciętną zmienność wyników ($CV = 21-40$).

Tabela 4.

Wartość współczynnika zmienności CV [%] dla średnich stężeń DNA [ng/µl] uzyskanych z próbki krwi płynnej dla każdego z 13 ramion aparatu AutoMate Express™ Instrument

Value of variation coefficient CV [%] for mean concentration of DNA [ng/µl] extracted from liquid blood samples in every 13 shoulders of AutoMate Express™ Instrument

Numer ramienia w AutoMate Express Instrument	Średnie stężenie DNA [ng/µl] w badanej próbce (n = 3)	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności CV [%]	Zmienność
E 1	1,45	0,19	13	mała
E 2	1,3	0,17	13	mała
E 3	1,92	0,18	9	mała
E 4	1,39	0,05	4	mała
E 5	1,59	0,18	9	mała
E 6	1,4	0,18	9	mała
E 7	1,73	0,58	34	przeciętna
E 8	1,66	0,24	14	mała
E 9	1,45	0,06	4	mała
E 10	1,79	0,15	8	mała
E 11	1,47	0,22	15	mała
E 12	1,31	0,49	38	przeciętna
E 13	1,9	0,26	14	mała

n – ilość powtórzeń badanej próbki

Tabela 5.

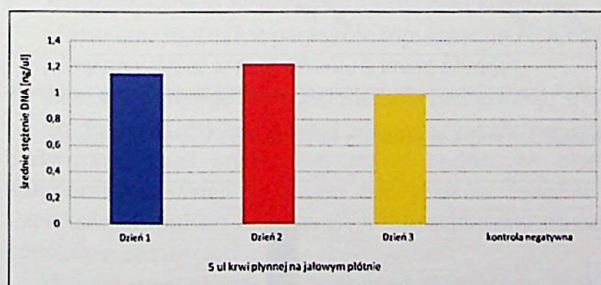
Wartość współczynnika zmienności CV [%] dla średnich stężeń DNA [ng/μl] uzyskanych z materiału kostnego

Value of variation coefficient CV [%] for mean concentration of DNA [ng/μl] extracted from bone samples

Materiał badawczy	Średnie stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce (n = 3)	Odchylenie standardowe SD	Współczynnik zmienności CV [%]	Zmienność
1. główka kości długiej	0,0844	0,0158	19	mała
2. fragment trzonu kości długiej	0,0710	0,0067	9	mała
3. fragment żuchwy	0,0691	0,0095	14	mała
4. fragment kości udowej	0,0425	0,0130	31	przeciętna
5. fragment trzonu kości udowej	0,6452	0,1940	30	przeciętna

n – ilość powtórzeń badanej próbki

Dla badania odtwarzalności z badanej krwi płynnej w próbce uzyskano wyniki przedstawione na rycinie 5. Ze względu na dużą różnicę w otrzymanych stężeniach DNA [ng/μl] uzyskanych dla tej samej próbki, wynikającą najprawdopodobniej z popełnionych błędów manualnych w trakcie przygotowania lizatu podczas I etapu ekstrakcji, odrzucono jeden wynik pomiaru stężenia, który znacząco odbiegał od pozostałych w przypadku ekstrakcji wykonanej w trzecim dniu. Graficzne zestawienie średnich stężeń DNA [ng/μl] w próbkach ekstrahowanych metodą magnetyczną przedstawia rycina 5.



Ryc. 5. Badanie odtwarzalności: średnie stężenia DNA [ng/μl] badanej krwi płynnej w próbce poddanej ekstrakcji metodą magnetyczną z zastosowaniem zestawu odczynników PrepFiler Express™

Fig. 5. Reproducibility test: mean concentration of DNA [ng/μl] in liquid blood samples extracted by magnetic extraction using a reagent kit PrepFiler Express™

Porównywalne wartości stężeń DNA [ng/μl] uzyskane z ekstrakcji wykonanej w trzech kolejnych dniach świadczą o odtwarzalności metody. Na podstawie uzyskanych dla pozytywnej kontroli wewnętrznej (IPC CT) wartości CT, które zawierały się w granicach ± 1 jednostki CT, stwierdzono, że zestaw odczynników PrepFiler Express™ pozwala na uzyskanie ekstraktów o dużej czystości.

Badanie kontaminacji krzyżowej

Doświadczenie:

Przeprowadzone w celach walidacyjnych badanie polegało na określeniu czy AutoMate Express™ Instrument nie wprowadza zanieczyszczeń krzyżowych z jednej badanej próbki do drugiej. Do doświadczenia użyto 13 próbek, w postaci bibuły niedopałka papierosa o wymiarach 0,5 x 0,5 cm (pochodzących od jednego dawcy) i 13 kontroli negatywnych. Ekstrakcja DNA została przeprowadzona dwukrotnie tego samego dnia, badane próbki (zawierające DNA i kontroli negatywnych) zostały rozmieszczone na przemian w ramionach aparatu. Wszystkie ekstrakcje DNA wykonane zostały z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express BTA™. Oceniając wystąpienie lub brak kontaminacji, brano pod uwagę wyniki ilościowe w postaci stężenia DNA oraz uzyskane elektroforegramy.

Wyniki:

Analiza uzyskanych wyników potwierdziła brak kontaminacji krzyżowej wynikającej z przeniesienia materiału biologicznego z jednej próbki do drugiej. Dla wszystkich kontroli negatywnych uzyskano poprawne wyniki. Użycie jednorazowych kartridży z odczynnikami, pipet wyposażonych w filtry oraz ruch ramion robota w jednej płaszczyźnie, skutecznie wyeliminowały możliwość kontaminacji materiału z jednej próbki materiałem z drugiej. W przypadku badań przeprowadzonych przez Applied Biosystems podczas walidacji rozwojowej stwierdzono w kontroli negatywnej wystąpienie jednego pików w układzie vWA o wysokości 70 RFU, przy zastosowaniu zestawu do amplifikacji AmpF/STR®Identifiler®. Przeprowadzenie reakcji amplifikacji zestawem AmpF/STR®MiniFiler™ dało wyniki prawidłowe dla wszystkich kontroli negatywnych [2].

Badanie różnych typów biologicznych próbek kryminalistycznych analizowanych w laboratorium Zakładu Biologii CLKP

Ocena ilościowa ekstraktów DNA otrzymanych z różnego rodzaju próbek biologicznych

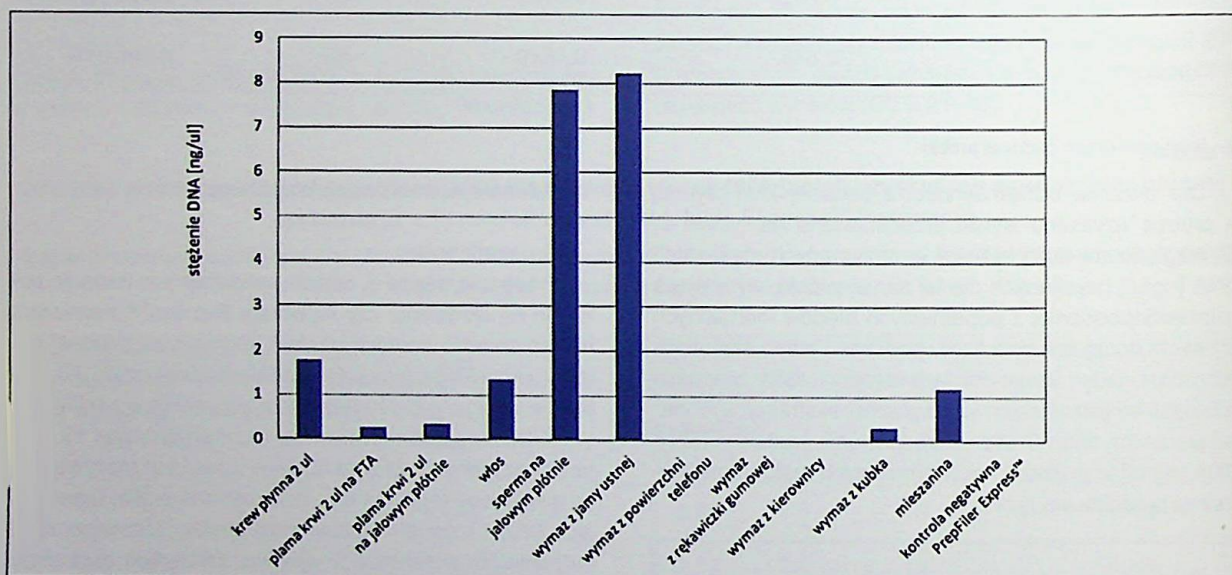
Doświadczenie:

Doświadczenie przeprowadzono na przygotowanych w laboratorium próbkach kryminalistycznych powszechnie badanych w laboratorium genetycznym oraz na próbkach stanowiących materiał dowodowy do ekspertyz wykonywanych w Zakładzie Biologii CLKP. próbki poddano ekstrakcji zestawem odczynników PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit. Izolację DNA przeprowadzono w jed-

nym powtórzeniu dla 20 typów próbek biologicznych. Każdy przebieg ekstrakcji wykonano w obecności kontroli negatywnej. Za kryterium akceptacji badania różnych typów biologicznych próbek kryminalistycznych przyjęto pomiar stężenia DNA w otrzymanych ekstraktach, dokonany metodą Real Time PCR w dwóch powtórzeniach, wyznaczając wartość CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej (IPC CT) oraz stężenie DNA [ng/μl] każdej badanej próbki.

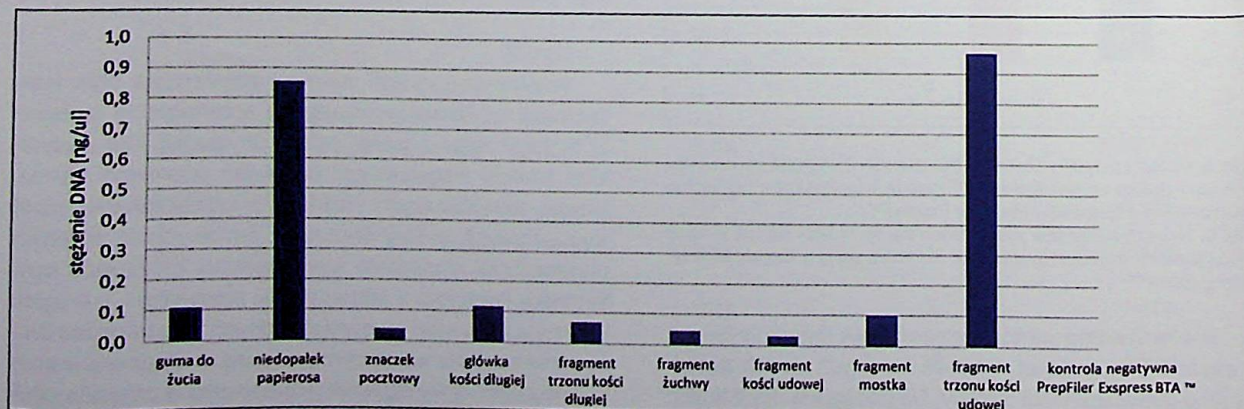
Wyniki:

Wyniki ilościowej oceny genomowego DNA wyekstrahowanego z różnego rodzaju przygotowanych próbek kryminalistycznych i dowodowych z użyciem systemu AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System przedstawiono na rycinach 6 i 7.



Ryc. 6. Graficzne zestawienie stężeń DNA [ng/μl] uzyskanych z przygotowanych próbek kryminalistycznych, poddanych ekstrakcji magnetycznej zestawem odczynników PrepFiler Express™

Fig. 6. Concentration of DNA [ng/μl] obtained from prepared forensic samples, extracted with magnetic extraction with PrepFiler Express™ reagent kit



Ryc. 7. Graficzne zestawienie stężeń DNA [ng/μl] uzyskanych z przygotowanych próbek kryminalistycznych i dowodowych, poddanych ekstrakcji magnetycznej zestawem odczynników PrepFiler Express BTA™

Fig. 7. Concentration of DNA [ng/μl] obtained from prepared forensic and evidential samples, extracted with magnetic extraction with PrepFiler Express BTA™ reagent kit

Przeprowadzona ekstrakcja DNA z próbek biologicznych (substancja potowo-tłuszczowa, krew, sperma, włos) z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express™ dała następujące wyniki stężeń DNA [ng/μl]:

- dla wymazu z jamy ustnej – 8,24 ng/μl, dla spermy na jałowym płótnie – 7,85 ng/μl (najwyższe),
- dla 2 μl krwi płynnej – 1,77 ng/μl, dla włosa – 1,36 ng/μl, dla mieszaniny – 1,19 ng/μl,
- dla 2 μl krwi na FTA – 0,26 ng/μl, dla wymazu z kubka – 0,30 ng/μl, dla 2 μl krwi na jałowym płótnie – 0,36 ng/μl (najniższe),
- dla wymazu z powierzchni telefonu – 0,003 ng/μl, dla wymazu z kierownicy – 0,005 ng/μl, dla wymazu z rękawiczki gumowej – 0,008 ng/μl (śladowe ilości dla materiału kontaktowego).

W wyniku przeprowadzenia ekstrakcji DNA z próbek biologicznych (kości i śladów na podłożach adhezyjnych: z gumy do żucia, niedopałka papierosa oraz znaczka pocztowego) z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express BTA™ otrzymano następujące wyniki stężeń DNA [ng/μl]:

- dla niedopałka papierosa – 0,85 ng/μl oraz dla fragmentu trzonu kości udowej – 0,97 ng/μl (najwyższe),
- dla gumy do żucia – 0,1 ng/μl, dla znaczka pocztowego – 0,03 ng/μl,
- dla materiału kostnego w granicach 0,030–0,97 ng/μl.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła stwierdzić, że znaczne różnice w otrzymanych stężeniach DNA mogły być spowodowane:

- rodzajem badanego materiału (np. ślady kontaktowe, krew płynna, włos, sperma, materiał kostny pochodzący z różnego rodzaju kości),
- zdegradowaniem (w przypadku materiału kostnego),
- wiązaniem się DNA z podłożem (np. krew na FTA czy jałowym płótnie w porównaniu z krwią płynną),
- dawcą, od którego pochodzi materiał biologiczny.

Wartości CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej dla badanych próbek kryminalistycznych poddanych ekstrakcji magnetycznej zestawem odczynników PrepFiler Express™ i PrepFiler Express BTA™ kształtowały się na podobnym poziomie.

W przeprowadzonej przez Applied Biosystems walidacji rozwojowej uzyskano podobne wyniki, które potwierdzały, że zróżnicowanie uzyskiwanych stężeń zależało od rodzaju materiału biologicznego użytego do ekstrakcji oraz od dawcy, od którego materiał pobrano [2]. Autorzy zaznaczają, że przyczyną występujących różnic w uzyskiwanych stężeniach DNA mogło być utrudnione przenikanie buforu lizującego do komórek związanych z podłożem.

W doświadczeniu przeprowadzonym w Zakładzie Biologii CLKP ze wszystkich badanych próbek kryminalistycznych uzyskano stężenia DNA wystarczające do przeprowadzenia kolejnych etapów badań. Otrzymane ekstrakty amplifikowano z wykorzystaniem multipleksowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® NGM

firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie. Na podstawie analizy otrzymanych wyników stwierdzono, że w większości przypadków uzyskano pełne profile DNA z większości badanych próbek biologicznych. Dla próbek z wymazu z telefonu, fragmentu trzonu kości długiej i fragmentu kości udowej, w których stwierdzono degradację materiału, otrzymano niepełne profile DNA. Jedynie w przypadku śladu kontaktowego (wymazu pobranego z kierownicy) nie otrzymano profilu genetycznego.

Badanie optymalnych warunków do ekstrakcji DNA z materiału kostnego

Doświadczenie:

Na podstawie uzyskanych wyników z poprzedniego doświadczenia przeprowadzono optymalizację warunków ekstrakcji metodą magnetyczną z zastosowaniem odczynników PrepFiler Express BTA™ dla próbek biologicznych stanowiących materiał kostny.

Celem doświadczenia było zbadanie optymalnych warunków do przeprowadzenia ekstrakcji DNA z materiału kostnego pod kątem czasu inkubacji oraz naważki pyłu kostnego. Zalecana przez producenta ilość pyłu kostnego to 50 mg, natomiast czas inkubacji to 2 h (maksymalnie 18 h) w temperaturze 56°C. Materiałem badawczym było osiem różnych fragmentów kostnych o różnym stopniu degradacji materiału genetycznego.

Optymalną ilość pyłu kostnego użytą do ekstrakcji DNA badano, stosując trzy naważki: 30 mg, 50 mg oraz 70 mg. Najbardziej efektywny czas inkubacji, pod względem wydajności ekstrakcji DNA z kości, badano, stosując dwa czasy inkubacji – 2 h oraz 18 h. Efektywność ekstrakcji DNA z zastosowaniem różnych warunków oceniano pod względem uzyskanych stężeń DNA [ng/μl].

Wyniki:

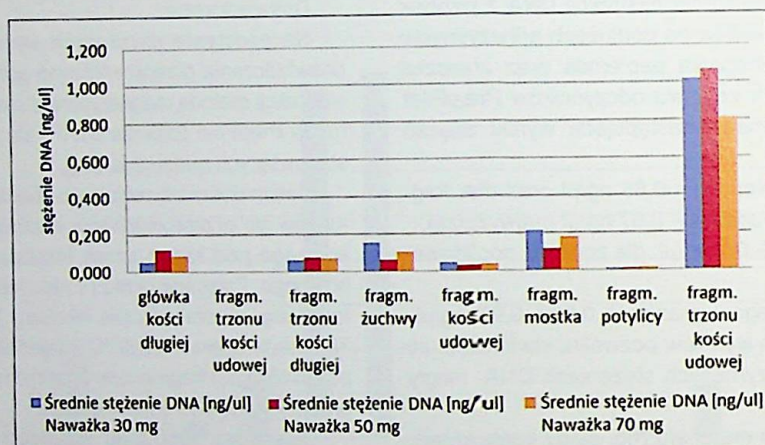
Średnie stężenia DNA [ng/μl], uzyskane po ekstrakcji z różnych naważek pyłu kostnego (30 mg, 50 mg, 70 mg), przedstawiono na rycinie 8.

Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia polegającego na ekstrakcji DNA z różnych naważek pyłu kostnego – 30 mg, 50 mg i 70 mg, stwierdzono, że zwiększanie wielkości próby materiału kostnego, przeznaczonego do izolacji DNA nie wiązało się ze wzrostem stężenia DNA. W niektórych przypadkach (fragment żuchwy, mostka i kości udowej) zaobserwowano odwrotną tendencję – zastosowanie większej naważki, 70 mg pyłu kostnego, skutkowało gorszą wydajnością ekstrakcji DNA niż z użyciem 30 mg. Różnice w uzyskiwanych stężeniach DNA z różnych naważek pyłu kostnego mogły być wynikiem np. utrudnionego przenikania roztworu lizującego (bufor lizujący, DTT, proteinaza K) do próbki przy większej jej objętości. Rodzaj użytego do ekstrakcji materiału kostnego mógł mieć wpływ na uzyskanie niższego stężenia DNA przy zastosowaniu

większej ilości pyłu kostnego. Tak mogło być w przypadku materiału ekstrahowanego z fragmentu mostka, w przypadku którego zaobserwowano zbrzydlanie się pyłu kostnego podczas etapu lizy, a tym samym gorsze przenikanie buforu do całości materiału.

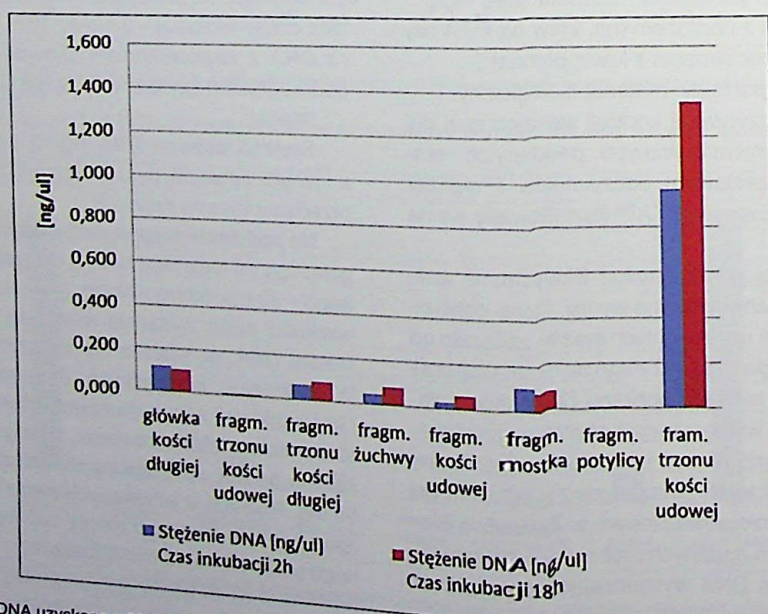
Z większości badanych próbek pyłu kostnego uzyskano stężenia DNA wystarczające do przeprowadzenia kolejnych etapów badań. Otrzymane ekstrakty amplifikowano z wykorzystaniem multiplexowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® Identifier firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie. Analiza profili DNA uzyskanych dla próbek z różnych naważek pyłu kostnego – 30 mg, 50 mg i 70 mg – wykazała, że w większości analizowanych przypadków uzyskano pełne profile DNA z różnego rodzaju materiału

kostnego. Jedynie w przypadku próbki z fragmentu trzonu kości udowej, gdzie naważki stanowiły 30 mg i 50 mg pyłu kostnego, stwierdzono w obu przypadkach profile negatywne. Dla tej próbki o naważce 70 mg zaobserwowano w obrazie elektroforetycznym pojedyncze allele, jednakże oceniono je jako śladową ilość DNA nienadającą się do interpretacji. Śladową ilość DNA odnotowano także dla wszystkich próbek z fragmentu potylicy. Dla drugiej próbki stanowiącej fragment trzonu kości udowej uzyskano niepełne profile DNA dla wszystkich trzech wariantów stosowanych naważek pyłu kostnego. Również dla próbki 30 mg pyłu z fragmentu mostka stwierdzono niepełny profil DNA. Średnie stężenia DNA [ng/μl], uzyskane po ekstrakcji DNA z 50 mg pyłu kostnego przy zastosowaniu dwóch czasów inkubacji – 2 h i 18 h, przedstawiono na rycinie 9.



Ryc. 8. Średnie stężenia DNA [ng/μl] uzyskane z różnych ilości naważek pyłu kostnego – 30 mg, 50 mg, 70 mg

Fig. 8. Mean concentrations of DNA [ng/μl] obtained from different quantities of bone dust – 30 mg, 50 mg, 70 mg



Ryc. 9. Średnie stężenia DNA uzyskane z 50 mg pyłu kostnego przy zastosowaniu dwóch czasów inkubacji – 2 h i 18 h

Fig. 9. Mean concentrations of DNA obtained from 50 mg of bone dust using two incubation times – 2 h, 18 h

Wydłużenie czasu inkubacji z 2 h do 18 h skutkowało, w czterech przypadkach na osiem analizowanych, zwiększeniem uzyskanego stężenia DNA [ng/μl]. W dwóch przypadkach (fragment trzonu kości udowej i fragment potylicy) uzyskano bardzo niskie, porównywalne stężenia DNA – 0,005 ng/μl i 0,004 ng/μl dla kości udowej oraz 0,008 ng/μl i 0,007 ng/μl dla potylicy. Dla główki kości długiej i fragmentu mostka większe stężenia DNA uzyskano po 2 h inkubacji. Ekstrakty uzyskane po 2 i 18 godzinach inkubacji amplifikowano z wykorzystaniem multiplexowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® IdentiFiler firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie. Analiza profili DNA wykazała, że większą ilość pełnych profili zanotowano dla próbek po inkubacji 2 h w porównaniu z próbkami inkubowanymi 18 h. Dla próbek inkubowanych 18 h zaobserwowano większą ilość układów, w których zaburzony został balans heterozygot oraz z których wypadły poszczególne allele.

Porównanie efektywności metody magnetycznej z metodą organiczną oraz absorpcji-elucji

Doświadczenie:

Celem doświadczenia było porównanie efektywności magnetycznej metody ekstrakcji genomowego DNA z:

- metodą organiczną (dla przygotowanych próbek kryminalistycznych),
- metodą absorpcji-elucji (dla materiału kostnego).

Za kryterium akceptacji badania dotyczącego porównania efektywności metod izolacji DNA przyjęto pomiar stężenia DNA. Ocenie poddano również jakość uzyskanych profili DNA dla badanych próbek.

Ekstrakcję DNA przeprowadzono w jednym powtórzeniu dla przygotowanych próbek kryminalistycznych powszechnie badanych w laboratorium genetycznym, porównując ze sobą metody ekstrakcji magnetycznej z metodą organiczną, według następujących procedur:

- Metoda magnetyczna:
 - próbki biologiczne – ekstrakcja z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express™. Inkubacja w roztworze do lizy (500 μl buforu lizującego PrepFiler™, 5 μl 1 M DTT) w temperaturze 70°C przez 40 minut na wytrząsarce przy obrotach 750 rpm. Objętość końcowa ekstraktu: 50 μl.
 - próbki biologiczne tzw. adhezyjne, tj. guma do żucia, niedopałek papierosa, znaczek pocztowy – z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express BTA™. Inkubacja w roztworze do lizy (220 μl buforu lizującego PrepFiler BTA™, 3 μl 1 M DTT, 7 μl proteinazy K) w temperaturze 56°C przez 40 minut na wytrząsarce przy obrotach 750 rpm. Objętość końcowa ekstraktu to 50 μl.
- Metoda organiczna – inkubacja w roztworze lizy (300 μl 2% SDS w buforze ekstrakcyjnym, 12 μl DTT, 15 μl

proteinazy K) przez 18 h w temperaturze 56°C. Po inkubacji próbki poddano kolejnym etapom ekstrakcji zgodnie z instrukcją badawczą nr HJ-25/In-IV/1/III/1/04 z dnia 2.07.2004 r. akredytowaną przez PCA. Końcowa objętość ekstraktu (50 μl) otrzymanego metodą organiczną odpowiadała objętości, w jakiej zawieszono DNA ekstrahowane metodą magnetyczną.

Ekstrakcję DNA przeprowadzono w jednym powtórzeniu również dla materiału kostnego stanowiącego materiał dowodowy do ekspertyz wykonywanych w Zakładzie Biologii CLKP, porównując ze sobą metody ekstrakcji magnetycznej z metodą absorpcji-elucji, według następujących procedur:

- Metoda magnetyczna – z użyciem zestawu odczynników PrepFiler Express BTA™. Inkubacja w roztworze do lizy (220 μl buforu lizującego PrepFilerBTA™, 3 μl 1 M DTT, 7 μl proteinazy K) w temperaturze 56°C przez 2 h na wytrząsarce przy obrotach 1100 rpm. Naważka pyłu kostnego – 0,05 g. Objętość końcowa ekstraktu to 50 μl.
- Metoda absorpcji-elucji z wykorzystaniem zestawu QIAamp DNA Blood Maxi Kit firmy QIAGEN Maxi Kit. Inkubacja w roztworze do lizy (5,5 ml buforu ATL, 300 μl 1 molowego DTT, 150 μl proteinazy K) w temperaturze 56°C przez 18 h na wytrząsarce przy obrotach 1100 rpm. Naważka pyłu kostnego – 3 g. Objętość końcowa ekstraktu to 50 μl.

Pomiaru stężenia DNA we wszystkich otrzymanych ekstraktach dokonano metodą RT-PCR w dwóch powtórzeniach, wyznaczając wartość CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej oraz stężenie DNA [ng/μl] każdej badanej próbki. DNA z próbek wyekstrahowanych z użyciem metody absorpcji-elucji amplifikowano stosując zestaw AmpFISTR® IdentiFiler, natomiast z próbek wyekstrahowanych z użyciem metod ekstrakcji magnetycznej i organicznej zestawami AmpFISTR®NGM PCR Amplification Kit, AmpFISTR® IdentiFiler.

Wyniki:

Porównanie wyników ilościowej oceny genomowego DNA wyekstrahowanego metodą magnetyczną oraz organiczną z różnego rodzaju przygotowanych próbek kryminalistycznych przedstawiono w tabeli nr 6.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że z próbek izolowanych metodą organiczną zawierających materiał biologiczny w postaci spermy, wymazu z jamy ustnej, włosa, niedopałka papierosa oraz krwi na jałowym płótnie, uzyskano wyższe stężenia DNA niż z próbek izolowanych metodą magnetyczną. W przypadku śladów kontaktowych (wymaz z powierzchni telefonu, wymaz z kierownicy, wymaz z kubka), krwi płynnej oraz znaczka pocztowego ilość wyizolowanego DNA była porównywalna dla obu metod ekstrakcji. Przy zastosowaniu ekstrakcji DNA metodą organiczną nie stwierdzono obecności DNA w próbce dla wymazu z rękawiczki gumowej. Jedynie w przypadku gumy do żucia i plamy krwi na FTA

otrzymano wyższe stężenia DNA [ng/μl] przy zastosowaniu ekstrakcji metodą magnetyczną. Monpetit A. Shaw i in. [3] w badaniach porównujących ekstrakcję organiczną i magnetyczną przy zastosowaniu robota Qiagen BioRobot EZ1 także stwierdzili większy odzysk DNA z różnego rodzaju podłoży w przypadku ekstrakcji organicznej. Autorzy zauważyli jednak, że jakość uzyskiwanych ekstraktów jest wyższa w przypadku metody magnetycznej, o czym świadczyła bardziej efektywna amplifikacja ekstraktów po izolacji magnetycznej w porównaniu z organiczną. War-

tości CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej dla każdej badanej próbki kształtowały się na podobnym poziomie w obu badanych metodach: magnetycznej i organicznej. Ekstrakty uzyskane z badanych próbek biologicznych za pomocą metody magnetycznej i organicznej amplifikowano z wykorzystaniem multipleksowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® NGM firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie.

Tabela 6.

Stężenia DNA [ng/μl] w badanych próbkach kryminalistycznych ekstrahowanych metodą magnetyczną zestawem odczynników PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit oraz metodą organiczną
Concentration of DNA [ng /μl] in samples extracted by magnetic method using forensic PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit and organic method

Próbki kryminalistyczne powszechnie badane w Zakładzie Biologii CLKP	Metoda magnetyczna (stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce) (n = 1)	Metoda organiczna (stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce) (n = 1)
krw płynna o objętości 2 μl	1,77	1,80
plama krwi o objętości 2 μl na FTA	0,26	0,06
plama krwi o objętości 2 μl na jałowym płótnie	0,36	0,85
włos w fazie anagenu, część dokorzeniowa 5 mm	1,36	7,60
sperma na jałowym płótnie, fragment 5 x 5 mm	7,85	27,89
wymaz z jamy ustnej w całości zabezpieczony na wacik wymazówki	8,24	48,75
substancja potowo-tłuszczowa (wymaz z powierzchni telefonu)	0,003	0,008
substancja potowo-tłuszczowa (wymaz z rękawiczki gumowej)	0,008	0,000
substancja potowo-tłuszczowa (wymaz z kierownicy)	0,005	0,006
substancja potowo-tłuszczowa (wymaz z kubka)	0,30	0,31
mieszanina: 4 μl krwi żeńskiej i 1 μl krwi męskiej	1,19	0,60
guma do żucia, fragment do 50 mg	0,11	0,02
niedopałek papierosa, wycinek z bibuły filtracyjnej do 25 mm ²	0,85	17,30
znaczek pocztowy	0,04	0,09

W większości analizowanych próbek uzyskano pełne profile DNA. W dwóch przypadkach, dla próbki z wymazu z kierownicy oraz z powierzchni telefonu ekstrahowanych obydwojema metodami, w wyniku przeprowadzenia dalszych badań uzyskano niepełne profile DNA. Tylko dla próbki stanowiącej wymaz z rękawiczki gumowej, izolowanej metodą organiczną, nie uzyskano pozytywnego wyniku badań genetycznych (nie oznaczono profilu DNA).

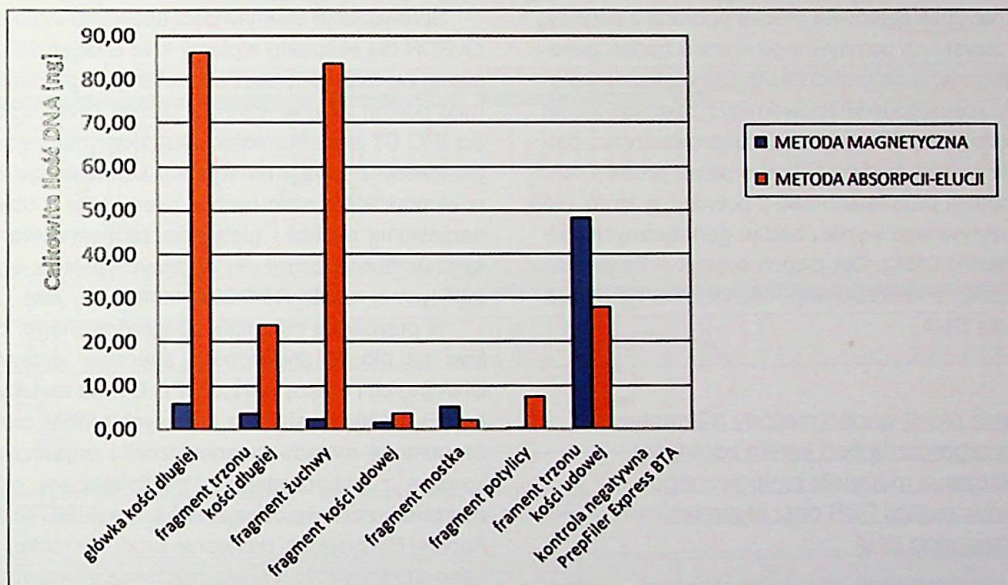
Na rycinie 10 zawarto wyniki całkowitej ilości DNA [ng] otrzymane w wyniku ekstrakcji z materiału kostnego dwoma metodami: magnetyczną i absorpcji-elucji.

Postępując zgodnie z wytycznymi producenta zawartymi w procedurach dotyczących ekstrakcji DNA z materiału kostnego, stwierdzono znacznie wyższe zawartości całkowitego wyizolowanego DNA przy zastosowaniu metody absorpcji-elucji w porównaniu z metodą magnetyczną

(ryc. 10). Jedynie w przypadku dobrze zachowanego fragmentu trzonu kości udowej, stanowiącego materiał świeży, metoda magnetyczna skutkowała wyższą wydajnością ekstrakcji DNA. Drugim takim przypadkiem był fragment mostka, w którym zastosowanie magnetycznej metody ekstrakcji wiązało się z wyższą całkowitą ilością uzyskanego DNA w porównaniu z użyciem metody absorpcji-elucji.

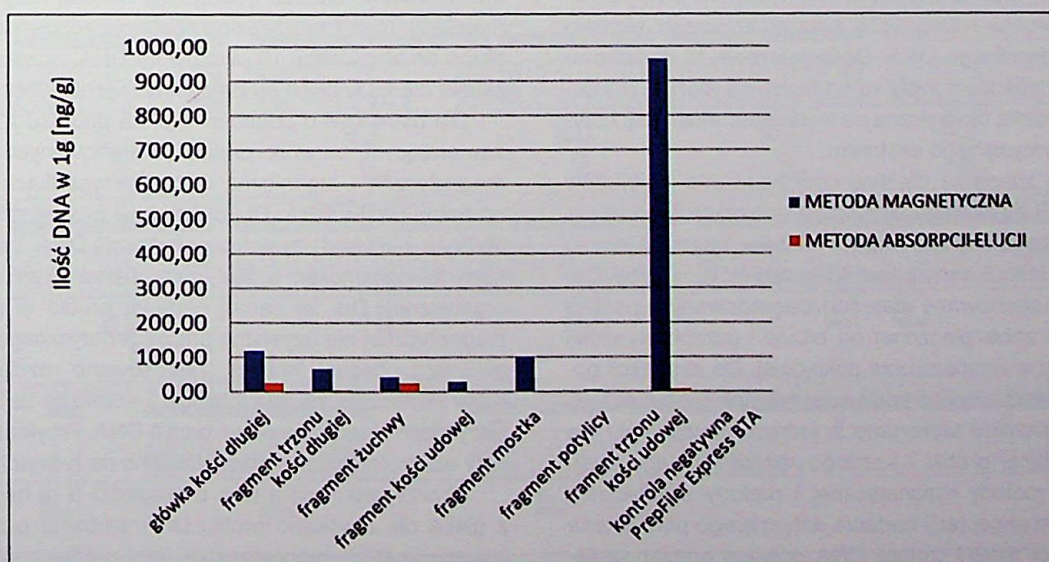
W celu zbadania efektywności obu metod ekstrakcji DNA: magnetycznej i absorpcji-elucji niezbędnym było przeliczenie całkowitej ilości uzyskanego DNA [ng] na stałą

jednostkę masy – 1ng. Spowodowane to było różnicą w procedurach polegającą na różnej ilości naważki pyłu kostnego branej do ekstrakcji. W przypadku metody magnetycznej wyjściową ilością materiału kostnego było 0,05 g, natomiast w metodzie absorpcji-elucji 3 g. Po zestawieniu wyników całkowitej ilości DNA w przeliczeniu na 1 g stwierdzono znacznie wyższą efektywność ekstrakcji DNA przy zastosowaniu metody magnetycznej w porównaniu z metodą absorpcji-elucji we wszystkich analizowanych przypadkach (ryc. 11).



Ryc. 10. Graficzne zestawienie całkowitej ilości DNA [ng] uzyskanej po ekstrakcji DNA z materiału kostnego z zastosowaniem metod organicznej i magnetycznej

Fig. 10. Comparison of the total amount of DNA [ng] in samples extracted with magnetic and absorption-elution methods



Ryc. 11. Porównanie efektywności metody magnetycznej i absorpcji-elucji: całkowita ilość wyekstrahowanego DNA w przeliczeniu na 1g materiału kostnego

Fig. 11. Comparison of extraction effectiveness of magnetic and absorption-elution methods: the total amount of extracted DNA per 1 g of bone material

Wartości CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej dla każdej badanej próbki kształtowały się na podobnym poziomie w obu badanych metodach. Ekstrakty uzyskane z badanych próbek biologicznych za pomocą metody magnetycznej i organicznej amplifikowano z wykorzystaniem multipleksowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® IdentiFiler firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie. Dla wszystkich próbek materiału kostnego ekstrahowanych z zastosowaniem metody magnetycznej, w wyniku przeprowadzenia dalszych etapów badań, uzyskano pełne profile DNA. Wyjątek stanowiła próbka pobrana z potylicy, w której nie uzyskano pozytywnego wyniku badań genetycznych (nie oznaczono profilu DNA). Dla większości próbek materiału kostnego ekstrahowanych z zastosowaniem metody absorpcji-elucji, w wyniku przeprowadzenia dalszych etapów badań, także uzyskano pełne profile DNA. Wyjątek stanowiła próbka pobrana z potylicy, w której nie uzyskano pozytywnego wyniku badań genetycznych (nie oznaczono profilu DNA). Dla dwóch próbek – fragmentu żuchwy i fragmentu kości udowej – oznaczono natomiast niepełne profile DNA.

Porównanie efektywności metody magnetycznej z metodą organiczną pod kątem zdolności do oczyszczania materiału biologicznego z inhibitorów reakcji PCR oraz ekstrakcji zdegradowanego DNA

Doświadczenie:

Doświadczenie miało na celu porównanie efektywności ekstrakcji nowo wprowadzanej metody magnetycznej z obecnie stosowaną w CLKP metodą organiczną pod kątem zdolności do oczyszczania materiału biologicznego z inhibitorów reakcji PCR oraz efektywności ekstrakcji zdegradowanego DNA. Doświadczenie to dodatkowo umożliwiło zbadanie wpływu podłoża, na którym znajdowała się próbka biologiczna na wydajność ekstrakcji i czystości otrzymywanego ekstraktu.

W celu zbadania efektywności usuwania inhibitorów reakcji PCR z ekstraktu, krew płynną o objętości 5 µl naniesiono na podłoże zawierające inhibitor: fragment jeansu o wymiarach 5 x 5 mm z barwnikiem denim, liść i glebę. Dodatkowo ekstrahowano materiał zdegradowany w postaci próbki krwi zabezpieczonej na bibule i przechowywanej przez 20 lat w temperaturze pokojowej. Do ekstrakcji pobrano fragment bibuły z krwią o wymiarach 5 x 5 mm.

Doświadczenie wykonano w jednym powtórzeniu dla każdej badanej próbki i każdego rozpatrywanego przypadku dla metody magnetycznej i metody organicznej. Za kryterium akceptacji badania dotyczącego porównania efektywności metod izolacji DNA przyjęto pomiar stężenia DNA. Uzyskane ekstrakty amplifikowano, poddano elektroforezie, a następnie zanalizowano uzyskane profile

DNA badanych próbek. Pomiaru stężenia DNA w otrzymanych ekstraktach dokonano w dwóch powtórzeniach, wyznaczając wartość CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej (IPC CT) oraz stężenie DNA [ng/µl] każdej badanej próbki.

Wyniki:

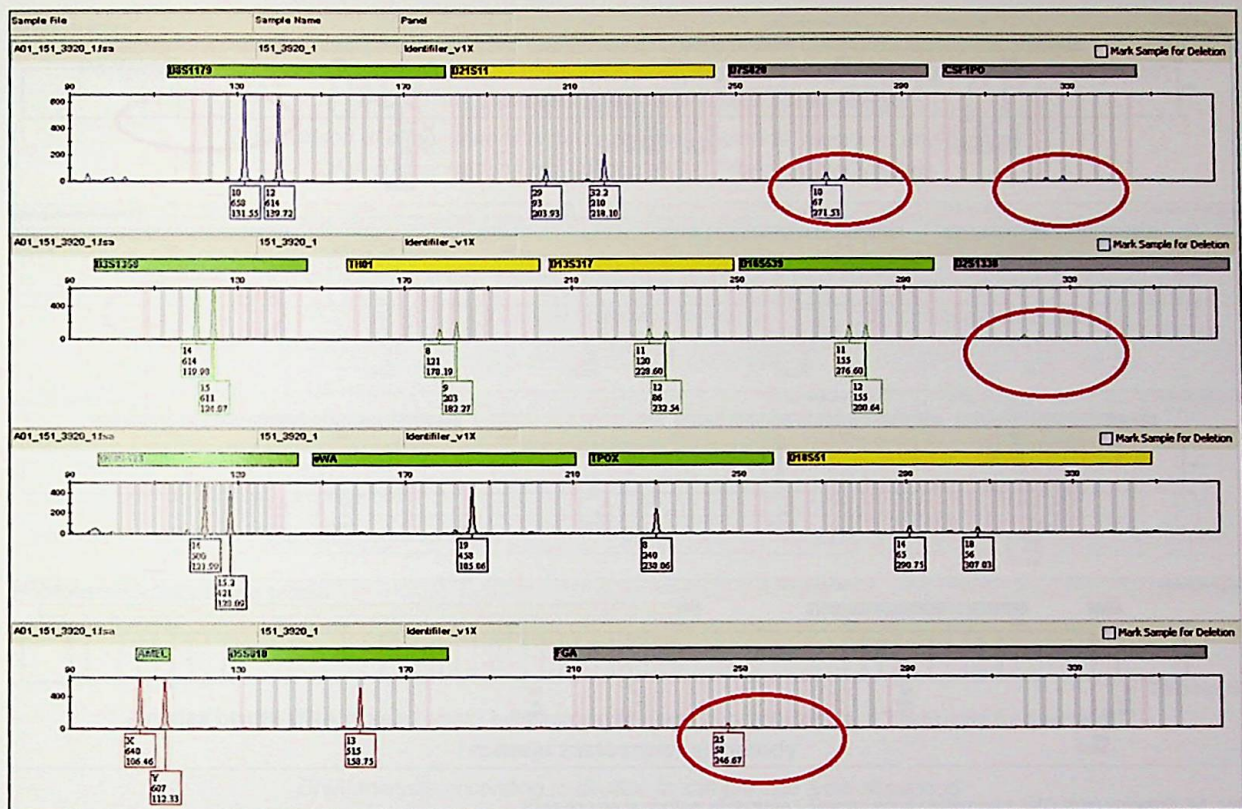
Wartości CT dla pozytywnej kontroli wewnętrznej (IPC CT) oraz stężenia DNA [ng/µl] uzyskanego w próbkach w obecności podłoża zawierających inhibitor oraz próbki zawierającej zdegradowane DNA w zależności od zastosowanej metody przedstawiono w tabeli 7.

Sprawdzenie efektywności usuwania inhibitorów reakcji PCR dla ekstraktu z plamy krwi o objętości 5 µl naniesionej na fragment jeansu zawierającego barwnik denim dało porównywalne wartości stężeń DNA [ng/µl] i wartości IPC CT dla obu metod ekstrakcji: magnetycznej i organicznej. Z uwagi na wysoką koncentrację inhibitorów w ekstraktach uzyskanych z plamy krwi o objętości 5 µl naniesionej na liść i glebę nie zaobserwowano detekcji sygnału fluorescencji dla badanych próbek oraz kontroli pozytywnej reakcji RT PCR.

W przypadku materiału zdegradowanego, czyli plamy krwi na bibule, stwierdzono znacznie wyższe stężenie DNA [ng/µl] i niższą wartość IPC CT dla metody organicznej. Ekstrakty uzyskane z badanych próbek biologicznych za pomocą metody magnetycznej i organicznej amplifikowano z wykorzystaniem multipleksowej reakcji PCR z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® NGM firmy Applied Biosystems, następnie produkty reakcji PCR poddano elektroforezie. W celu zniesienia efektu inhibicji obecnej w próbkach z podłożem zawierającym liść i glebę, sporządzono szereg rozcieńczeń. Przy ustalaniu rozcieńczeń sugerowano się wartościami stężeń uzyskanymi dla 5 µl płynnej krwi bez obecności podłoża z inhibitorem, z której ekstrahowano materiał genetyczny metodą magnetyczną (tabela 2). Następnie ze sporządzonego rozcieńczenia pobrano do amplifikacji 10 µl roztworu DNA, oczekując uzyskania dla wszystkich próbek pełnych profili DNA.

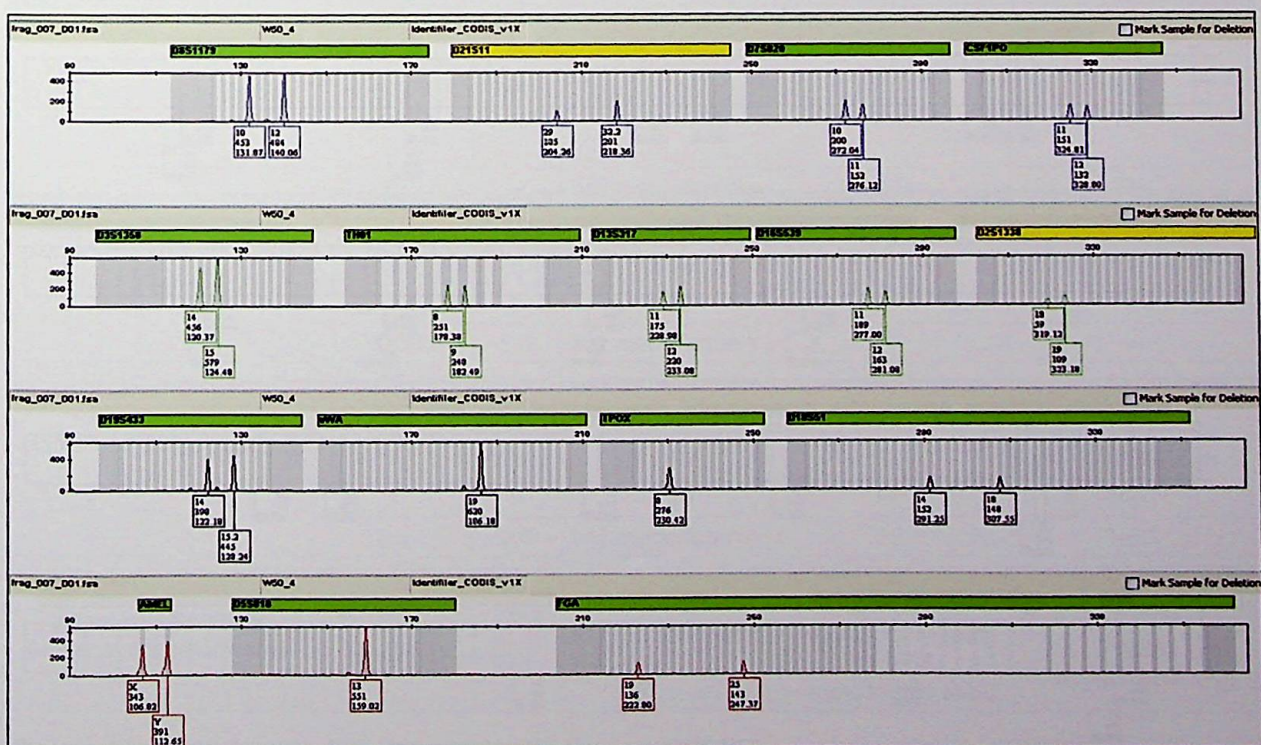
Dla plam krwi o objętości 5 µl na podłożu z jeansem zawierającym barwnik denim ekstrahowanych metodą magnetyczną i organiczną w obu przypadkach uzyskano pełne profile DNA. Dla plamy krwi o objętości 5 µl na podłożu z liściem uzyskano pełny profil DNA, bez dodatkowych rozcieńczeń próbki, przy zastosowaniu metody organicznej. Dla tej samej badanej próbki w metodzie magnetycznej nie uzyskano profilu genetycznego. W celu eliminacji obecnej inhibicji, zastosowano rozcieńczenia, które skutecznie zniosły inhibicję i pozwoliły uzyskać dla wszystkich ekstraktów pełne profile DNA. Przykładowe obrazy elektroforetyczne przedstawiono na rycinach 16–17.

W przypadku plam krwi o objętości 5 µl na podłożu z glebą nie uzyskano profilu DNA zarówno przy zastosowaniu metody magnetycznej, jak i organicznej. W celu eliminacji obecnej inhibicji, zastosowano rozcieńczenia, które skutecznie zniosły inhibicję i pozwoliły uzyskać



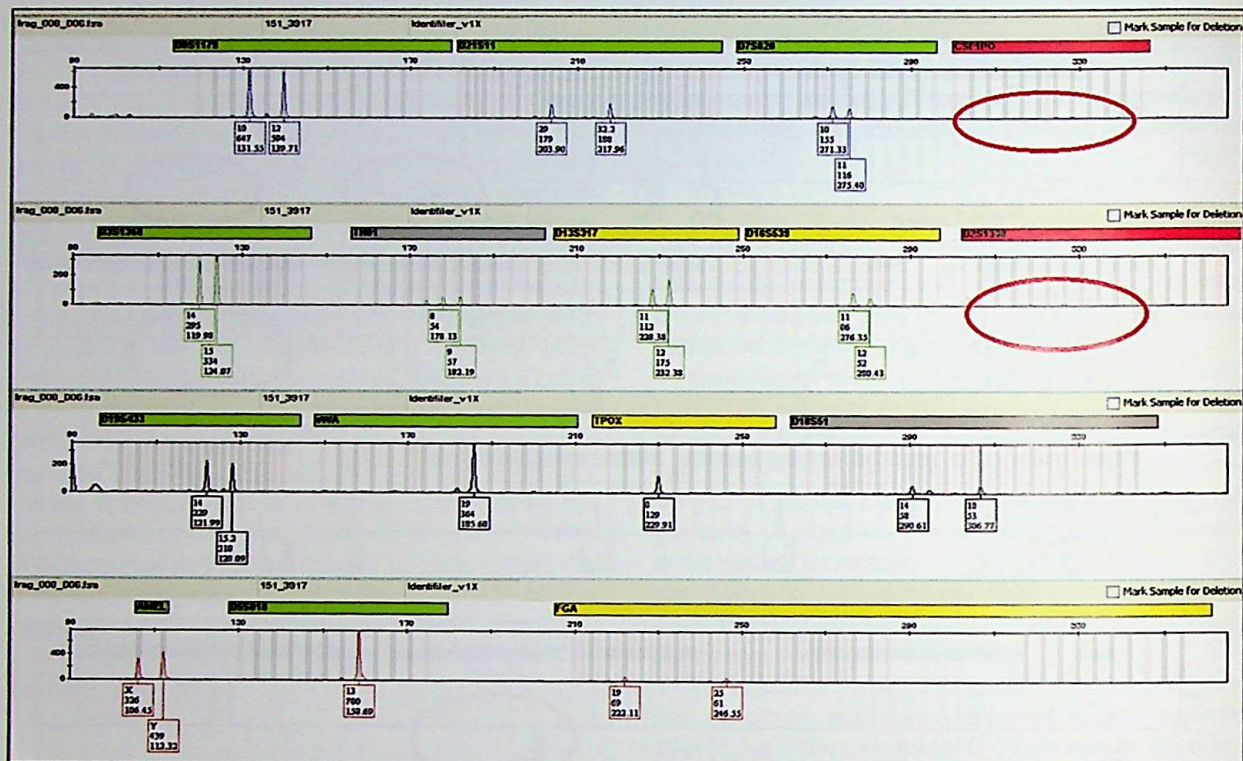
Ryc. 12. Niepełny profil DNA z fragmentu żuchwy – ekstrakcja metodą absorpcji-elucji

Fig. 12. Partial profile of DNA obtained from a fragment of jaw – extraction by absorption-elution method



Ryc. 13. Pełny profil DNA z fragmentu żuchwy – ekstrakcja metodą magnetyczną

Fig. 13. Full profile of DNA obtained from a fragment of jaw – extraction by magnetic method



Ryc. 14. Niepełny profil DNA z fragmentu kości udowej – ekstrakcja metodą absorpcji-elucji
 Fig. 14. Partial profile of DNA obtained from fragment of femur – extraction by absorption-elution method



Ryc. 15. Pełny profil DNA z fragmentu kości udowej – ekstrakcja metodą magnetyczną
 Fig. 15. Full profile of DNA obtained from a fragment of femur – extraction by organic method

Porównanie efektywności dwóch metod ekstrakcji magnetycznej i organicznej: stężenia DNA [ng/μl] i IPC CT dla zastosowanego materiału badawczego

Comparison of effectiveness of two extraction methods: magnetic and organic DNA concentrations [ng /μl] and IPC CT for extracted probes

Materiał badawczy	Metoda magnetyczna		Metoda organiczna	
	Stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce (n = 1)	Wartość IPC CT	Stężenie DNA [ng/μl] w badanej próbce (n = 1)	Wartość IPC CT
plama krwi o objętości 5 μl na fragmencie jeansu zawierającego barwnik denim	2,01	27,64	2,85	27,61
plama krwi o objętości 5 μl na liściu	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
plama krwi o objętości 5 μl na glebie	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
plama krwi na bibule (materiał zdegradowany)	0,07	28,62	2,14	27,24

n – ilość powtórzeń badanej próbki,

b.d. – brak detekcji.

Tabela 8.

Analiza profili DNA w zależności od zastosowanego rozcieńczenia w materiale badawczym i rodzaju zastosowanej metody

DNA analysis according to dilution in sample and type of method

Materiał badawczy	Ekstrakt DNA [μl]	Woda [μl]	Rozcieńczenia	Analiza profili w zależności od zastosowanej metody	
				Metoda magnetyczna	Metoda organiczna
plama krwi o objętości 5 μl z fragmentem jeansu zawierającego barwnik denim	0,5* 0,35**	9,5* 9,65**	bez rozcieńczenia	FP FP	FP FP
plama krwi o objętości 5 μl z liściem	10	–	bez rozcieńczenia	NEG	FP
	1	9	1 : 9	FP	–
	1	9	1 : 15	FP	–
	1	9	1 : 20	FP	–
	0,5	9,5	bez rozcieńczenia	FP	–
plama krwi o objętości 5 μl z glebą	10	–	bez rozcieńczenia	NEG	NEG
	1	9	1 : 9	FP	NEG
	1	9	1 : 15	FP	NEG
	1	9	1 : 20	FP	NEG
	0,5	9,5	bez rozcieńczenia	FP	NEG
plama krwi na bibule (materiał zdegradowany)	10* 0,45**	– 9,55**	bez rozcieńczenia	PP D2S1338 – wypadnięcie alleli, D18S51 – wypadnięcie allelu	PP D2S1338, D18S51 – wypadnięcie alleli

FP – (ang. *full profile*) pełny profil, PP – (ang. *partial profile*) częściowy profil, NEG – wynik negatywny,

* – ilości ekstraktu DNA i wody użyte do przeprowadzenia reakcji PCR dla metody magnetycznej,

** – ilości ekstraktu DNA i wody użyte do przeprowadzenia reakcji PCR dla metody organicznej.

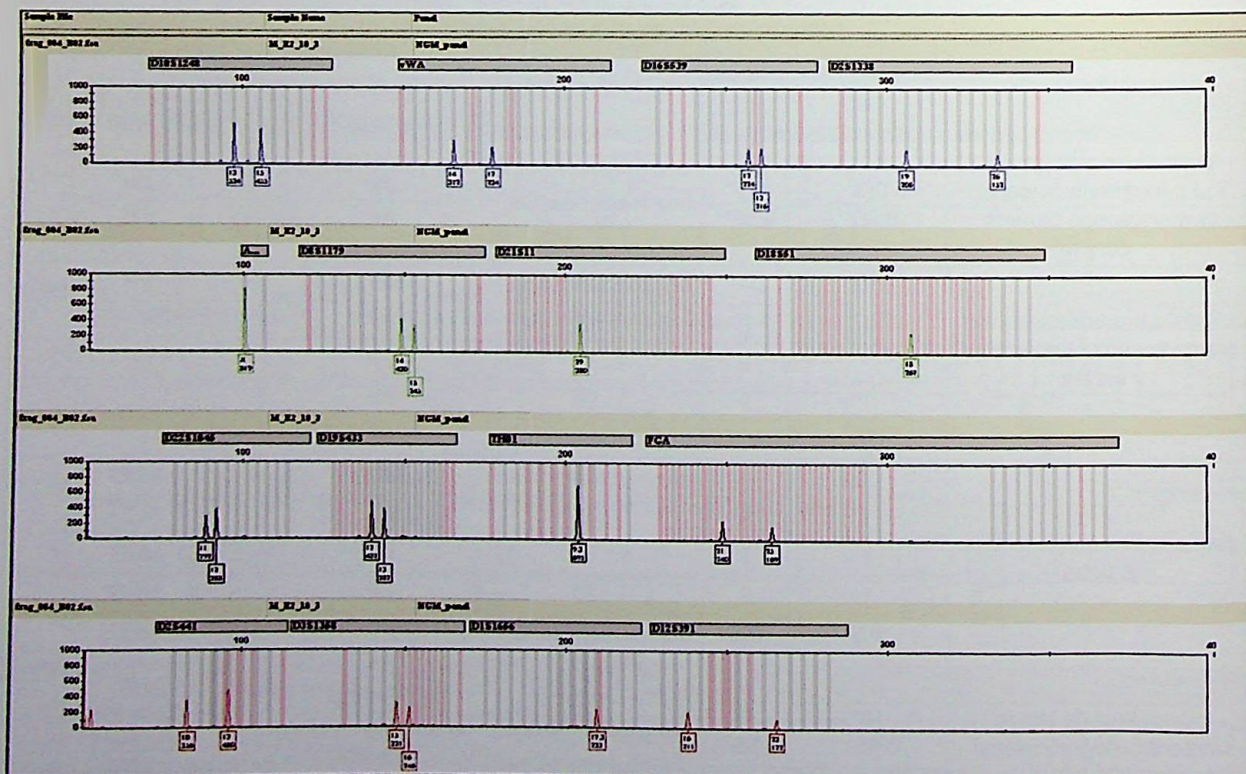
dla wszystkich ekstraktów pełne profile DNA w obrazie elektroforetycznym jedynie dla metody magnetycznej. Przykładowy obraz elektroforetyczny przedstawiono na rycinie 18. Podobne badania przeprowadzone przez Monpetit A. Shaw i in. [3] wykazały, że zastosowanie metody magnetycznej może być skutecznym narzędziem do eliminacji inhibitorów reakcji PCR. Autorzy zaznaczają, że przy zastosowaniu metody organicznej niemożliwe jest całkowite usunięcie inhibitorów PCR rozpuszczalnych w wodzie. W przypadku metody magnetycznej oczyszczane DNA wiązane jest z cząsteczkami magnetycznymi i może być niemal całkowicie oddzielone od roztworu. Dzięki temu, stosując kolejne cykle płukania, można dużo efektywniej w porównaniu z metodą organiczną usunąć rozpuszczalne w roztworach wodnych inhibitory reakcji PCR.

Dla obu metod ekstrakcji: magnetycznej i organicznej, dla plam krwi na bibule – materiał zdegradowany, otrzymano niepełne profile DNA obrazujące degradację materiału widoczną w postaci obniżonych sygnałów detekcji w dłuższych układach, a także brak amplifikacji fragmentów o największej masie cząsteczkowej w przypadku układów D2S1338 i D18S51. Obrazy elektroforetyczne dla rozpatrywanego przypadku ekstrakcji przedstawiono na rycinach 19–20.

Wnioski końcowe

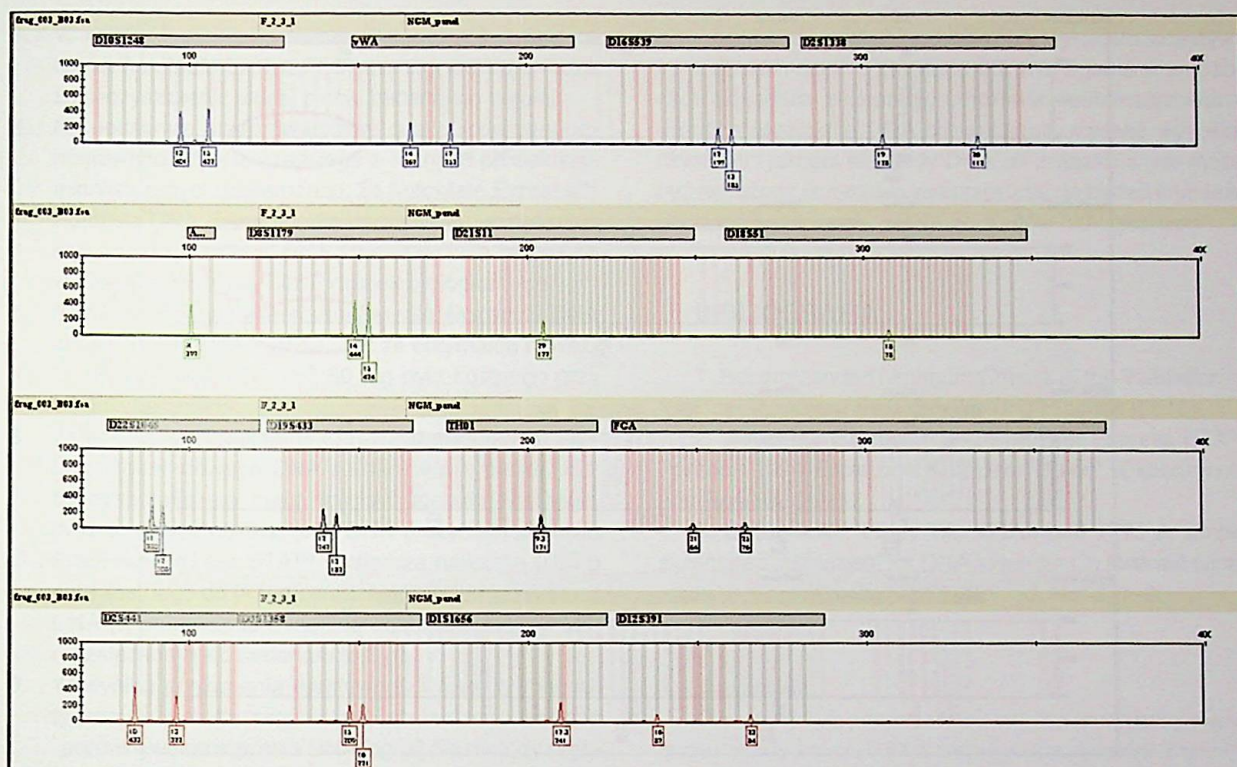
Przeprowadzone doświadczenia walidacyjne systemu do ekstrakcji genomowego DNA AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System uprawniają do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Badanie czułości wykazało, że dla uzyskanych stężeń DNA w zakresie od 0,01 ng/μl do 2,55 ng/μl, wyekstrahowanych z objętości wyjściowego materiału biologicznego od 1 μl do 8 μl, we wszystkich przypadkach uzyskano pełne profile DNA.
2. Wyznaczony doświadczalnie współczynnik korelacji $R = 0,9939$, mieszczący się w pierwszej grupie zależności (tj. bardzo silna zależność), świadczył o liniowości metody.
3. W warunkach laboratoryjnych Zakładu Biologii CLKP wyznaczona doświadczalnie powtarzalność dla aparatu AutoMate Express™ Instrument odpowiadała wymaganiom zawartym w założonych kryteriach akceptacji.
4. W wyniku przeprowadzonych badań odtwarzalności udowodniono, że metoda ekstrakcji DNA z użyciem aparatu AutoMate Express™ Instrument jest odtwarzalna.



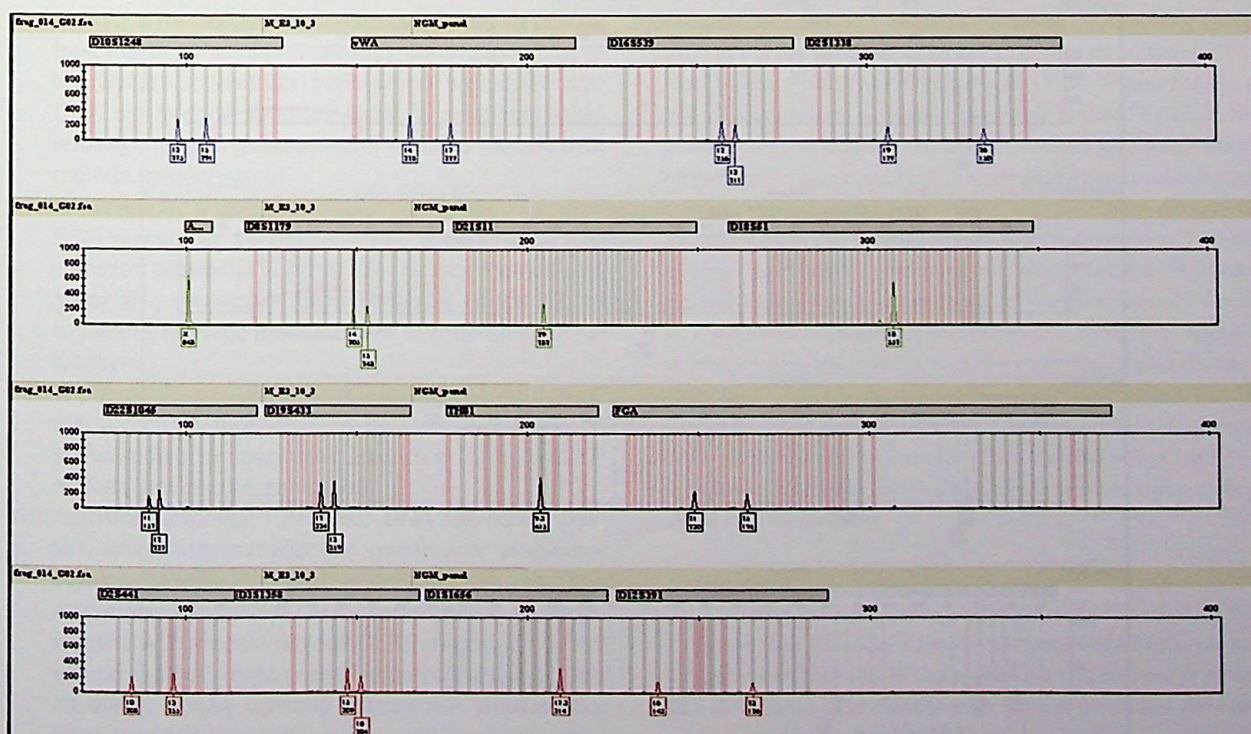
Ryc. 16. Elektroforegram przedstawiający pełny profil DNA uzyskany z rozcieńczenia ekstraktu (1 : 15), ekstrahowany metodą magnetyczną z 5 μl krwi w obecności podłoża z inhibitorem – liściem

Fig. 16. Full profile of DNA obtained from 5 μl of blood with presence of inhibitor (dilution 1 : 15), extracted from leaf using magnetic method



Ryc. 17. Elektroforegram przedstawiający pełny profil DNA uzyskany bez rozcieńczenia ekstraktu, ekstrahowany metodą organiczną z 5 μ l krwi w obecności podłoża z inhibitorem – liściem

Fig. 17. Full profile of DNA obtained from 5 μ l of blood with presence of inhibitor extracted from leaf using organic method



Ryc. 18. Elektroforegram przedstawiający pełny profil DNA uzyskany z rozcieńczenia ekstraktu (1 : 15), ekstrahowany metodą magnetyczną z 5 μ l krwi w obecności podłoża z inhibitorem – glebą

Fig. 18. Full profile of DNA obtained from 5 μ l of blood with presence of inhibitor (dilution 1:15), extracted from soil using magnetic method



Ryc. 19. Elektroforegram przedstawiający przykład ekstrahowanego metodą magnetyczną profilu DNA krwi zabezpieczonej na bibule, przechowywanej przez 20 lat w warunkach pokojowych

Fig. 19. Profile of DNA obtained by magnetic method from degraded blood stored on FTA for 20 years



Ryc. 20. Elektroforegram przedstawiający przykład ekstrahowanego metodą organiczną profilu DNA krwi zabezpieczonej na bibule, przechowywanej przez 20 lat w warunkach pokojowych

Fig. 20. Profile of DNA obtained by organic method from degraded blood stored on FTA for 20 years

5. W wyniku badania kontaminacji krzyżowej stwierdzono, że AutoMate Express™ Instrument nie wprowadza zanieczyszczeń z jednej próbki badanej do drugiej.
6. Na podstawie przeprowadzonej oceny ilościowej genomowego DNA izolowanego z różnych próbek kryminalistycznych stwierdzono, że AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System może być wykorzystywany do ekstrakcji DNA z powszechnie badanych w Zakładzie Biologii CLKP próbek biologicznych.
7. Badania optymalnych warunków dla ekstrakcji DNA z materiału kostnego wykazały, że optymalną naważką do ekstrakcji DNA jest 50 mg pyłu kostnego przy 2 h inkubacji DNA.
8. Zaleca się stosowanie metody magnetycznej do ekstrakcji genomowego DNA z kości w przypadku, kiedy dysponuje się małą ilością materiału kostnego. W automatycznej ekstrakcji DNA z użyciem zestawu PrepFiler Express BTA™ wystarcza naważka 0,05 g pyłu kostnego do przeprowadzenia skutecznej izolacji DNA (w porównaniu z metodą absorpcji-elucji, w której zalecana ilość materiału to 3 g).
9. W wyniku porównania efektywności metody magnetycznej z metodą organiczną, stwierdzono wyższe i porównywalne stężenia DNA [ng/μl] dla metody organicznej, jedynie w przypadku ekstrakcji DNA z gumy do żucia i krwi na FTA bardziej wydajną metodą była metoda magnetyczna.
10. W wyniku porównania efektywności metody magnetycznej z metodą absorpcji-elucji, w przypadku ekstrakcji DNA z materiału kostnego, stwierdzono znacznie wyższe zawartości całkowitego wyizolowanego DNA dla metody absorpcji-elucji (z wyjątkiem kości udowej i mostka, gdzie bardziej wydajną metodą była metoda magnetyczna).
11. W przypadku próbek z zawartością inhibitorów reakcji PCR wykazano, że zastosowanie dodatkowych rozcieńczeń ekstraktu, w przypadku izolacji metodą magnetyczną, skutecznie zniosło inhibicję i pozwoliło na uzyskanie pełnego profilu DNA w obrazie elektroforetycznym.
12. W przypadku materiału zdegradowanego wyniki otrzymane metodą magnetyczną były porównywalne ze standardowo stosowaną w Zakładzie Biologii CLKP metodą ekstrakcji organicznej.
13. AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System umożliwia oszczędność materiałów eksploatacyjnych, skrócenie czasu ekstrakcji DNA, szybsze otrzymanie ekstraktów DNA w porównaniu ze stosowanymi w Zakładzie Biologii CLKP innymi metodami ekstrakcji DNA – organiczną i absorpcji-elucji, a także zapewnia lepszą ochronę pracownika laboratorium pod względem warunków pracy dzięki redukcji czasu przebywania w szkodliwych warunkach.

Walidacja AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System firmy Applied Biosystems służącego do

ekstrakcji DNA została zakończona wynikiem pozytywnym. System spełnia stawiane mu wymagania w założonych kryteriach akceptacji, umożliwia zautomatyzowaną i szybką ekstrakcję DNA pozwalającą uzyskać wysokiej czystości i jakości ekstrakt DNA. W związku z tym może być wdrożony i rutynowo wykorzystany do badań kryminalistycznych – ekstrakcji DNA ze śladów biologicznych.

BIBLIOGRAFIA

1. Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (2010).
2. „PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits User Guide”, Experiments and Results, 36–56.
3. Shaw A.M., Fitch T.I., O'Donnell P.T.: A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework, „J. Forensic Sci.” 2005, Vol. 50, No. 3, 1–9.

Streszczenie

Celem pracy było przeprowadzenie walidacji wewnętrznej magnetycznej metody izolacji DNA z zastosowaniem AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System i sprawdzenie, czy nowa metoda ekstrakcji może być wdrożona w Zakładzie Biologii CLKP i rutynowo wykorzystywana w badaniach kryminalistycznych obejmujących identyfikację ludzkiego DNA. Charakterystykę badanych parametrów przeprowadzono na podstawie rekomendacji ENFSI DNA Working Group zawartych w Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (2010). Podczas badań walidacyjnych testowano następujące parametry: czułość i liniowość, powtarzalność i odtwarzalność, badanie kontaminacji krzyżowej, badanie różnych typów biologicznych próbek kryminalistycznych analizowanych w laboratorium Zakładu Biologii CLKP oraz porównano efektywność metody magnetycznej z metodami ekstrakcji stosowanymi w Zakładzie Biologii CLKP (metodą organiczną oraz absorpcji-elucji). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System spełnia stawiane w założonych kryteriach akceptacji wymagania, umożliwia zautomatyzowaną i szybką ekstrakcję DNA pozwalającą uzyskać wysokiej czystości i jakości ekstrakt DNA. W związku z tym może być wdrożony i rutynowo wykorzystany do badań kryminalistycznych – ekstrakcji DNA ze śladów biologicznych.

Słowa kluczowe: walidacja, automatyzacja, robotyka, izolacja DNA, kulki magnetyczne

Summary

The aim of this study was to validate the magnetic method of DNA extraction using AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System and demonstrate that the instrument is appropriate and fit for human identification. The characteristics of tested parameters was based on recommendations of ENFSI DNA Working Group that are included in the Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process (2010). The following parameters were taken into consideration: test sensitivity and linearity, repeatability

and reproducibility, cross-contamination, examination of different types of forensic biological samples that are analysed in laboratory CFLP of the Department of Biology and results of comparing the effectiveness of magnetic methods with methods used in the CFLP (organic and absorption - elution). The system meets the relevant requirements in established acceptance criteria, enables automated and rapid extraction of DNA

to obtain high purity and quality of DNA extracts. In that respect, it may be implemented and routinely used for forensic research – DNA extraction from biological traces.

Keywords: validation, automation, robotics, extraction of DNA, paramagnetic beads