

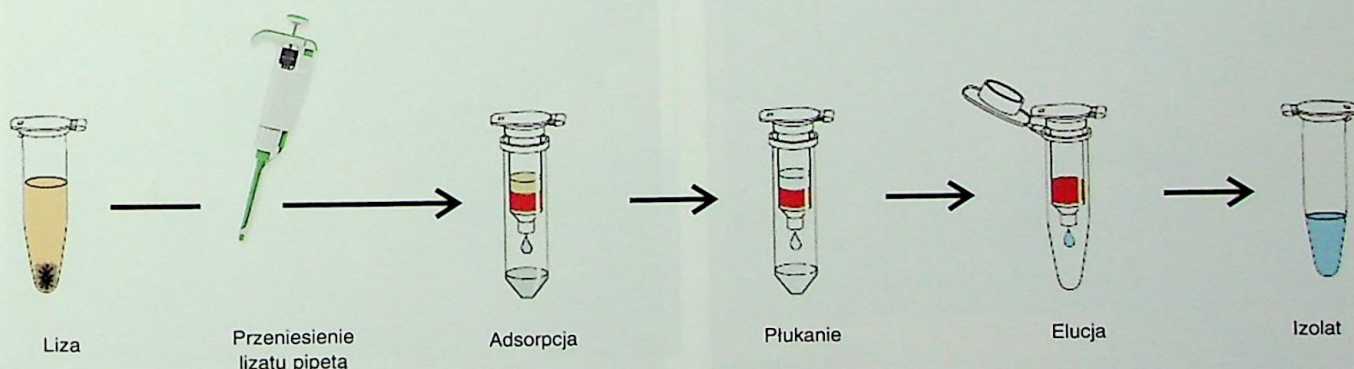
Izolacja genomowego DNA z plam krwawych metodą absorpcji-elucji

Wstęp i cel

Izolacja kwasu dezoksyrybonukleinowego ze śladów biologicznych zabezpieczonych na miejscu zdarzenia jest jednym z ważniejszych etapów badań w genetycznych badaniach kryminalistycznych. Otrzymanie pełnego profilu genetycznego sprawcy uzależnione jest między innymi od uzyskania odpowiedniego stężenia DNA w roztworze wolnym od inhibitorów reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Wybór odpowiedniej metody ekstrakcji DNA stanowi klucz do uzyskania prawidłowych wyników badań. Dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów dedykowanych do wyodrębniania ludzkiego DNA z różnego rodzaju materiału, z jakim można się spotkać w badaniach medyczno-sądowych. W numerze 264/2009 „Problemów Kryminalistyki” przedstawione zostały wyniki doświadczeń mających

którym znajdował się zabezpieczony ślad biologiczny, a następnie jego transfer na membranę silikonową wiążącą DNA. Od sposobu przeprowadzenia tego etapu zależy w dużej mierze wydajność całego procesu izolacji. Odzyskanie jak największej objętości lizatu ma bowiem bezpośredni wpływ na stężenie DNA w uzyskanym ekstrakcie. W praktyce laboratoryjnej lizat najczęściej odciąga się z próbki i przenosi na kolumnę silikonową za pomocą pipety (ryc. 1–3). Może to jednak powodować pozostawanie cennego materiału genetycznego na podłożu. Dzieje się tak szczególnie w przypadku podłoży chłonnych, np. tkanin, papieru.

Istnieje jednak alternatywna metoda, w której lizat wraz z podłożem umieszcza się w specjalnym filtrze, a następnie odwirowuje. Podłoże zostaje zatrzymane na siateczce o odpowiedniej strukturze, natomiast cały roztwór przechodzi do dolnej części próbki. Tak od-



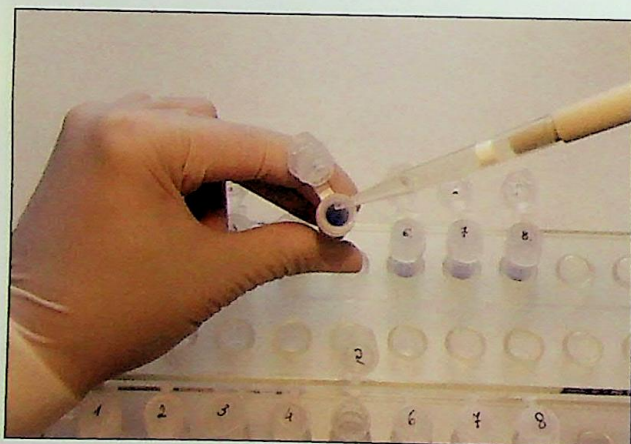
Ryc. 1. Schemat izolacji DNA metodą separacji na membranie silikonowej z przenoszeniem lizatu na kolumnę za pomocą pipety
Fig. 1. Scheme of DNA isolation using separation on silica membrane with transferring lysate onto the column by pipette

źródło (ryc. 1–9b): autorzy

na celu porównanie efektywności różnych metod izolacji genomowego DNA ze śladów biologicznych [1]. W artykule omówiono skuteczność czterech nowych zestawów przeznaczonych do izolacji DNA ze śladów biologicznych. Dwa z nich opierały się na technologii separacji magnetycznej, dwa pozostałe były to zestawy kolumnkowe wykorzystujące technologię separacji kwasu dezoksyrybonukleinowego na membranie silikonowej. W przypadku metod kolumnkowych jednym z etapów ekstrakcji jest oddzielenie lizatu od podłoża, na

dzielony lizat przenosi się w całości na kolumnę silikonową. Schemat procedury oczyszczania lizatu z użyciem filtra przedstawia rycina 4.

Na stężenie DNA w uzyskanym ekstrakcie wpływa również ilość RNA obecnego w lizacie. Złoże krzemionkowe wchodzące w skład kolumn stosowanych w izolacji metodą absorpcji-elucji przylacza zarówno kwas rybonukleinowy, jak również kwas dezoksyrybonukleinowy. Dodanie do buforu lizującego odpowiedniego odczynnika, tzw. nośnika RNA, zwiększa efektywność



Ryc. 2a–c. Przenoszenie lizatu na kolumnę za pomocą pipety (NucleoSpin®Tissue XS)

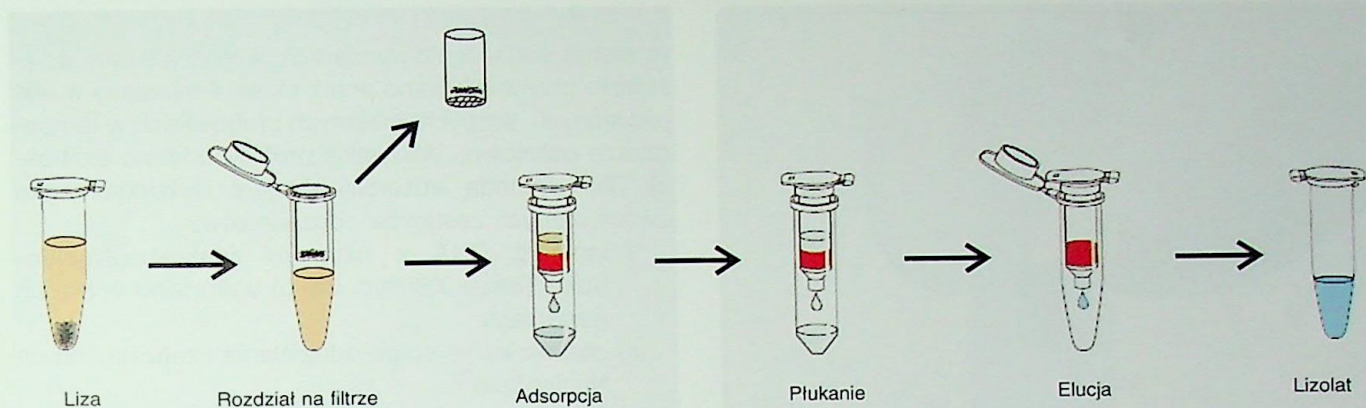
Fig. 2a–c. Transferring lysate onto the column by pipette (NucleoSpin®Tissue XS)

wiązania DNA do membrany silikonowej na kolumnie [2]. W przypadku izolacji DNA ze śladów kryminalistycznych, a także próbek zawierających małe ilości DNA zestawem QIAamp® DNA Micro zaleca się stosowanie nośnika RNA. Substancja ta, według producenta zestawu, stabilizuje DNA w próbkach o bardzo niskim stężeniu kwasów nukleinowych (ryc. 5–7).

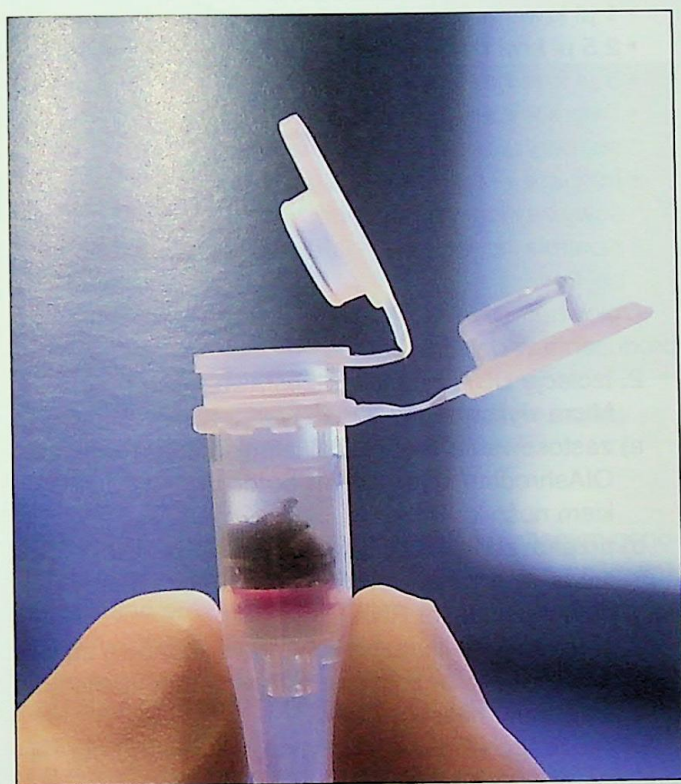


Ryc. 3a–b. Przenoszenie lizatu na kolumnę za pomocą pipety (QIAamp® DNA Micro)

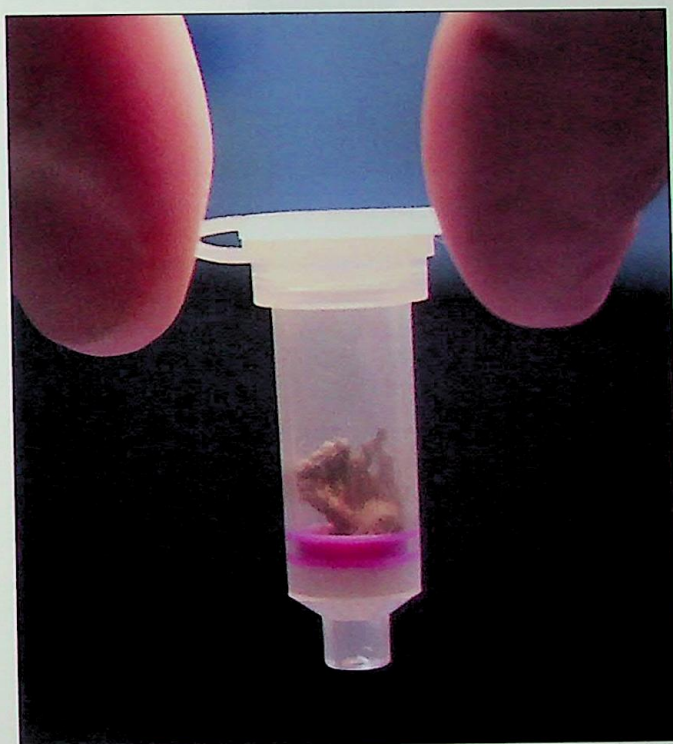
Fig. 3a–b. Transferring lysate onto the column by pipette (QIAamp® DNA Micro)



Ryc. 4. Schemat izolacji DNA metodą separacji na membranie silikonowej z użyciem filtra do oddzielenia lizatu od podłoża
 Fig. 4. Scheme of DNA isolation using separation based on silica membrane with lysate separation by means of filter unit



Ryc. 5a. Lizat wraz z podłożem na filtrze NucleoSpin (NucleoSpin®Tissue XS)
 Fig. 5a. Lysate with solid sample material on NucleoSpin filter unit (NucleoSpin®Tissue XS)



Ryc. 5b. Podłoże w filtrze NucleoSpin po odwirowaniu (NucleoSpin®Tissue XS)
 Fig. 5b. Solid sample material on NucleoSpin filter unit after centrifugation (NucleoSpin®Tissue XS)

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, w jaki sposób zastosowanie etapu oddzielania podłoża od lizatu za pomocą filtrów wpływa na efektywność izolacji DNA w zastosowanej metodzie. Testowano również wpływ obecności nośnika RNA w buforze lizującym na wydajność procesu ekstrakcji. Otrzymane wyniki zostały porównane pod kątem wydajności metody (porównanie uzyskanych stężeń DNA) oraz jakości uzyskanego DNA (porównanie uzyskanych profili genetycznych). Zwrócono również uwagę na ryzyko wy-

stąpienia kontaminacji na etapie oddzielania lizatu na filtrach.

Materiał i metody

Materiałem do badań były jak uprzednio [1] próbki krwi pobrane od ośmiu osób i umieszczone w probówkach z heparyną jako środkiem antykoagulacyjnym. Krew nanoszono na podłoże chłonne (jałowe płótno) oraz na podłoże chłonne zawierające inhibitor PCR



Ryc. 6. Podłoże na filtrze QIAshredder po zwirowaniu (QIAamp® DNA Micro)

Fig. 6. Solid sample material on QIAshredder filter unit after centrifugation (QIAamp® DNA Micro)



Ryc. 7. Nośnik RNA (QIAamp® DNA Micro)

Fig. 7. Carrier RNA (QIAamp® DNA Micro)

(materiał jeansowy) o wymiarach około 5 x 5 mm, a następnie przechowywano przez okres 4 miesięcy w wyjałowionych, suchych, otwartych probówkach w temperaturze pokojowej. Wszystkie próbki poddano ekstrakcji DNA metodą absorpcji-elucji z wykorzystaniem dwóch różnych zestawów odczynników:

1. Izolację DNA z użyciem zestawu NucleoSpin®Tissue XS (ryc. 8a–b) wykonano w dwóch wariantach:

- a) zastosowanie etapu oddzielania lizatu na filtrach NucleoSpin®,
- b) przenoszenie lizatu na kolumnę silikonową za pomocą pipety bez użycia filtrów.

Dla każdego wariantu wykonano osiem powtórzeń dla następujących przypadków:

- 1 µl krwi naniesionej na jałowe płótno.
- 2,5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno.
- 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno.
- Degradacja – 1 µl krwi naniesionej na jałowe płótno, degradowanej 30 min w temp. 150°C.
- Inhibicja – 1 µl krwi naniesionej na materiał jeansowy zawierający barwnik indygo.
- Kontrola negatywna – jałowe płótno bez naniesionej krwi.

Izolowane DNA zawieszano zgodnie z zaleceniami producenta w objętości 20 µl.

2. Izolację DNA z użyciem zestawu QIAamp® DNA Micro wykonano w trzech wariantach:

- a) zastosowanie etapu oddzielania lizatu na filtrach QIAshredder (ryc. 9a–b); bufor lizujący z dodatkiem nośnika RNA,
- b) przenoszenie lizatu na kolumnę silikonową za pomocą pipety bez użycia filtrów; bufor lizujący bez dodatku nośnika RNA,
- c) przenoszenie lizatu na kolumnę silikonową za pomocą pipety bez użycia filtrów; bufor lizujący z dodatkiem nośnika RNA.

Dla każdego wariantu ekstrakcję wykonano dla następujących przypadków:

- 1 µl krwi naniesionej na jałowe płótno (8 powtórzeń).
- 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno (6 powtórzeń).
- Inhibicja – 1 µl krwi naniesionej na materiał jeansowy zawierający barwnik indygo (8 powtórzeń).
- Kontrola negatywna – jałowe płótno bez naniesionej krwi (8 powtórzeń).

Izolowane DNA zawieszano zgodnie z zaleceniami producenta w objętości 20 µl.

Ekstrakcję DNA przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producentów, stosując protokoły dla śladów kryminalistycznych w postaci zaschniętych plam krwawych [2, 3]. Wszystkie badania przeprowadzono



Ryc. 8a. Zestaw filtrów NucleoSpin oraz kolumnenek silikonowych (NucleoSpin®Tissue XS)

Fig. 8a. *NucleoSpin filter units and silica membrane columns (NucleoSpin®Tissue XS)*



Ryc. 9a. Zestaw filtrów QIAshredder oraz kolumnenek silikonowych (QIAamp® DNA Micro)

Fig. 9a. *QIAshredder filter units and silica membrane columns (QIAamp® DNA Micro)*



Ryc. 8b. Kolumna z membraną silikonową (NucleoSpin®Tissue XS)

Fig. 8b. *Silica membrane column (NucleoSpin®Tissue XS)*



Ryc. 9b. Kolumna z membraną silikonową (QIAamp® DNA Micro)

Fig. 9b. *Silica membrane column (QIAamp® DNA Micro)*

w obecności kontroli pozytywnej (DNA o znanym genotypie) oraz kontroli negatywnej (próbna odczynnikowa), otrzymując prawidłowe dla nich wyniki.

Oznaczenie stężenia DNA w uzyskanych izolatach wykonano metodą „Real Time PCR” za pomocą aparatu ABI PRISM 7500 Sequence Detection System i oprogramowania 7500 System Detection Software v. 1.2.3 z zastosowaniem zestawu odczynników Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit. Otrzymane ekstrakty DNA amplifikowano z użyciem zestawu odczynników AmpFISTR® SGM Plus™ i aparatu GeneAmp PCR System 9700. Produkty reakcji PCR poddawano elektroforezie w sekwenatorze ABI PRISM® 3130 XL. Do analizy wyników używano oprogramowania GeneMapper® ID v.3.2.1 firmy Applied Biosystems.

Wyniki uzyskane z oznaczenia ilościowego stężeń DNA po izolacji zestawem NucleoSpin® Tissue XS opracowano przy użyciu testu t-studenta, natomiast zestawem QIAamp® DNA Micro przy użyciu analizy wariancji testem Tukeya. Do obliczeń statystycznych zastosowano wersję demo oprogramowania GraphPad Prism v. 5 (zgodnie z obowiązującą licencją producenta).

Wyniki

Testowane w doświadczeniu warianty oddzielania lizatu od podłoża, a także wpływ obecności nośnika RNA w buforze lizującym na efektywność izolacji analizowano w następujących aspektach:

- Wydajność metody (uzyskane stężenia DNA).
- Jakość uzyskanego DNA (obraz profili genetycznych).
- Ryzyko wystąpienia kontaminacji (obecność profili mieszanych).

Analiza ilościowa uzyskanego DNA

Izolacja DNA z użyciem zestawu NucleoSpin® Tissue XS

Zależność stężenia DNA w otrzymanych izolatach od wariantu oddzielania lizatu od podłoża dla metody NucleoSpin®Tissue XS przedstawiają tabele 1–5.

Tabela 1
Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą NucleoSpin®Tissue XS z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jałowe płótno
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 1 μl of blood taken from linen using NucleoSpin®Tissue XS method, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody NucleoSpin®Tissue XS [1 μl krwi naniesionej na płótno]	
	z filtrem	bez filtra
1	0,44	0,65
2	1,01	3,33
3	[1,98]	2,30
4	0,38	1,16
5	0,25	0,64
6	0,30	3,25
7	0,28	1,05
8	0,39	1,20
Średnia	0,44	1,70
S.D.	0,26	1,11

S.D. – odchylenie standardowe

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

źródło (tabele 1–9): opracowanie własne

Wyższe średnie stężenie DNA izolowanego z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na płótno uzyskano przy przenoszeniu lizatu na kolumnę NucleoSpin® za pomocą pipety. W przypadku zastosowania tego sposobu istnieje duża rozbieżność pomiędzy wynikami cząstkowymi, co potwierdza otrzymana wysoka wartość odchylenia standardowego. Przy zastosowaniu filtrów do oddzielania lizatu od podłoża w próbce nr 3 zanotowano wyższe stężenie DNA, znacznie odbiegające od innych wyników (1,98 ng/μl). Pomimo wyeliminowania tej wartości z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy otrzymanymi średnimi stężeniami DNA po izolacji z zastosowaniem filtrów i przy przenoszeniu lizatu na kolumnę za pomocą pipety.

Przy izolacji DNA z materiału stanowiącego 2,5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno, podobnie jak w przypadku 1 μl krwi, wyższe średnie stężenie DNA w ekstraktach uzyskano przy zastosowaniu wariantu z przenoszeniem lizatu na kolumnę za pomocą pipety. Stosując filtry do oddzielania lizatu od podłoża, otrzymano dużą rozbieżność wyników cząstkowych. Odchylenie standardowe przewyższyło wartość średnią obliczoną na podstawie wyników z pomiarów. W tym przypadku również nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy

Tabela 2
Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą NucleoSpin®Tissue XS z materiału stanowiącego 2,5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 2,5 μl of blood taken from linen using NucleoSpin®Tissue XS method, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody NucleoSpin®Tissue XS [2,5 μl krwi naniesionej na płótno]	
	z filtrem	bez filtra
1	0,88	3,14
2	6,03	5,44
3	3,58	3,45
4	0,47	3,89
5	0,22	1,66
6	0,61	4,96
7	0,38	1,74
8	0,53	3,17
Średnia	1,59	3,43
S.D.	2,10	1,35

S.D. – odchylenie standardowe

Tabela 3
Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą NucleoSpin®Tissue XS z materiału stanowiącego 5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 5 μl of blood taken from linen using NucleoSpin®Tissue XS method, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody NucleoSpin®Tissue XS [5 μl krwi naniesionej na płótno]	
	z filtrem	bez filtra
1	1,92	2,92
2	[8,95]	4,71
3	2,93	[10,87]
4	4,03	2,28
5	0,96	2,05
6	1,91	5,62
7	0,51	3,06
8	0,75	4,54
Średnia	1,86 ^a	3,60 ^b
S.D.	1,27	1,36

S.D. – odchylenie standardowe

Średnie stężenia DNA [ng/μl] oznaczone parami liter różnią się statystycznie: ab przy $p \leq 0,05$ [p – poziom istotności]

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

Tabela 4

Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą NucleoSpin®Tissue XS z materiału zdegradowanego stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jałowe płótno

Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 1 μl of degraded blood taken from linen using NucleoSpin®Tissue XS method, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody NucleoSpin®Tissue XS [materiał zdegradowany]	
	z filtrem	bez filtra
1	0,94	2,15
2	0,76	3,98
3	1,78	3,29
4	1,27	2,76
5	0,62	0,73
6	0,46	3,86
7	0,59	0,65
8	1,18	1,74
Średnia	0,95 ^a	2,40 ^b
S.D.	0,44	1,30

S.D. – odchylenie standardowe

Średnie stężenia DNA [ng/μl] oznaczone parami liter różnią się między sobą statystycznie: ab przy $p \leq 0,05$ [p – poziom istotności]

między średnimi stężeniami DNA uzyskanymi po izolacji przy zastosowaniu obu wariantów oddzielania lizatu od podłoża.

W przypadku ekstrakcji DNA z materiału stanowiącego 5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno stwierdzono statystycznie istotnie wyższe średnie stężenie DNA w izolatach uzyskanych po przeniesieniu lizatu na kolumny silikonowe za pomocą pipety ($p \leq 0,05$). W przypadku próbki nr 3 zmierzona wartość stężenia DNA znacznie przewyższała inne wyniki otrzymane tym sposobem (10,87 ng/μl). Wynik ten wyeliminowano z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku próbki nr 2 w opcji z zastosowaniem filtra.

W przypadku izolacji DNA z 1 μl krwi naniesionej na jałowe płótno i degradowanej w eksperymentalnie dobranych warunkach termicznych, zastosowanie filtrów do oddzielania lizatu od podłoża skutkowało obniżeniem średniego stężenia DNA w uzyskiwanych izolatach w stosunku do ekstraktów otrzymanych po zastosowaniu wariantu przenoszenia lizatu za pomocą pipety. Wynik ten został potwierdzony statystycznie ($p \leq 0,05$).

Przy izolacji DNA z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na podłoże zawierające inhibitor reakcji łańcuchowej polimeryzacji, wyższe średnie stężenie DNA w ekstraktach uzyskano, stosując filtry do oddzie-

Tabela 5

Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą NucleoSpin®Tissue XS z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jeans z barwnikiem indygo (podłoże z inhibitorem reakcji PCR)

Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 1 μl of blood taken from jeans (PCR inhibitor) using NucleoSpin®Tissue XS method, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody NucleoSpin®Tissue XS [1 μl krwi naniesionej na jeans]	
	z filtrem	bez filtra
1	0,56	0,23
2	0,53	0,38
3	[3,53]	0,58
4	0,33	0,07
5	0,18	0,18
6	0,99	0,51
7	0,25	0,12
8	0,42	0,42
Średnia	0,47	0,31
S.D.	0,27	0,19

S.D. – odchylenie standardowe

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

lania lizatu od podłoża. Jednak pomimo wyeliminowania z obliczeń wartości odbiegającej od pozostałych wyników (próbka nr 3 w opcji z zastosowaniem filtra), nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy otrzymanymi wynikami.

Izolacja DNA z użyciem zestawu QIAamp®DNA Micro

W tabelach 6–8 przedstawiono stężenia DNA w izolatach uzyskanych metodą QIAamp®DNA Micro z zastosowaniem różnych wariantów oddzielania lizatu od podłoża oraz w zależności od obecności nośnika RNA w buforze lizującym.

Przy izolacji DNA z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jałowe płótno stwierdzono niższe stężenie DNA w wariantcie oddzielania lizatu od podłoża z zastosowaniem filtrów QIAshredder. W opcji przenoszenia lizatu na kolumnę za pomocą pipety obecność nośnika RNA lub jego brak w buforze lizującym nie odgrywa większej roli. W obydwu przypadkach uzyskano podobne wartości średnich stężeń DNA w izolatach. Wyniki nie były istotne statystycznie.

Izolacja DNA z materiału stanowiącego 5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno wykazała wyższe średnie stężenie DNA w izolatach otrzymanych przy przeno-

Tabela 6

Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą QIAamp®DNA Micro z dodatkiem nośnika RNA oraz bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jałowe płótno
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 1 μl of blood taken from linen using QIAamp®DNA Micro method with or without carrier RNA present in lysis buffer, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody QIAamp®DNA Micro [1 μl krwi naniesionej na płótno]		
	z filtrem	bez filtra, bez nośnika RNA	bez filtra, z nośnikiem RNA
1	0,16	0,48	0,74
2	0,10	[1,42]	[2,08]
3	0,14	0,68	0,97
4	0,03	0,62	1,07
5	0,03	0,88	0,40
6	0,05	0,71	0,93
7	0,05	0,40	0,58
8	[0,55]	0,64	0,76
Średnia	0,08	0,63	0,78
S.D.	0,05	0,16	0,23

S.D. – odchylenie standardowe

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

Tabela 7

Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą QIAamp®DNA Micro z dodatkiem nośnika RNA oraz bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego z materiału stanowiącego 5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 5 μl of blood taken from linen using QIAamp®DNA Micro method with or without carrier RNA present in lysis buffer, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody QIAamp DNA Micro [5 μl krwi naniesionej na płótno]		
	z filtrem	bez filtra, bez nośnika RNA	bez filtra, z nośnikiem RNA
1	0,38	2,63	2,14
2	1,30	[7,54]	[8,25]
3	0,70	3,67	3,73
4	0,20	2,63	3,89
5	0,05	2,66	2,06
6	0,60	2,03	2,91
7	0,32	–	–
8	0,09	–	–
Średnia	0,46 ^A	2,72 ^B	2,95 ^B
S.D.	0,41	0,59	0,86

S.D. – odchylenie standardowe

Średnie stężenia DNA [ng/μl] oznaczone parami liter różnią się między sobą statystycznie:

AB przy $p \leq 0,01$ [p – poziom istotności]

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

Tabela 8

Stężenie DNA [ng/μl] uzyskane w zależności od zastosowanego wariantu oddzielania lizatu od podłoża przy izolacji DNA metodą QIAamp®DNA Micro z dodatkiem nośnika RNA oraz bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na jeans z barwnikiem indygo (podłoże z inhibitorem reakcji PCR)
Concentration of DNA [ng/μl] obtained from 1 μl of blood taken from jeans (PCR inhibitor) using QIAamp®DNA Micro method with or without carrier RNA present in lysis buffer, depending on the lysate separation variant

Numer próby	Stężenie DNA [ng/μl] z zastosowaniem metody QIAamp DNA Micro [1 μl krwi naniesionej na jeans]		
	z filtrem	bez filtra, bez nośnika RNA	bez filtra, z nośnikiem RNA
1	0,00	0,01	0,01
2	0,00	0,01	0,01
3	0,00	0,02	0,01
4	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,01	0,00
6	0,00	0,02	0,01
7	0,00	0,01	0,01
8	[0,01]	0,01	0,01
Średnia	0,00	0,01	0,01
S.D.	0,00	0,01	0,00

S.D. – odchylenie standardowe

[...] – wartość podana w nawiasie została wyeliminowana z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa

szeniu lizatu na kolumny silikonowe za pomocą pipety. Wynik ten był statystycznie istotny ($p \leq 0,01$). Po ekstrakcji z dodatkiem i bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego w obydwóch przypadkach uzyskano podobne średnie stężenia DNA. W opcji z zastosowaniem filtrów QIAshredder izolację wykonano w ośmiu powtórzeniach, natomiast przy przenoszeniu lizatu na kolumnę za pomocą pipety – w sześciu. Z obliczeń statystycznych wyeliminowano za pomocą testu Grubbsa wartości uzyskane dla próbek nr 2, które znacząco odbiegały od innych uzyskanych wyników w wariantach przenoszenia lizatu na kolumny silikonowe za pomocą pipety.

Z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na podłoże zawierające inhibitor PCR przy zastosowaniu do oddzielenia lizatu od podłoża filtrów QIAshredder nie udało się wyizolować DNA w ogóle. Tylko w jednym przypadku uzyskano stężenie DNA w badanym izolacie (0,01 ng/μl), jednak wynik ten, jako odbiegający od pozostałych, wyeliminowano z obliczeń statystycznych za pomocą testu Grubbsa. Średnie ze stężeń DNA w izolatach otrzymanych po izolacji z przenoszeniem lizatu na kolumny za pomocą pipety były jednakowe (0,01 ng/μl) dla procedur z zastosowaniem i bez zastosowania nośnika RNA w buforze lizującym. W żadnym z badanych przypadków nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy otrzymanymi wynikami.

Analiza jakościowa uzyskanego DNA

Charakterystykę jakości profili genetycznych uzyskanych z badanych próbek przedstawiono w tabeli 9.

Izolując DNA zestawem NucleoSpin® Tissue XS z materiału stanowiącego 1, 2,5 i 5 μl krwi naniesionej na jałowe płótno oraz w próbie kontrolnej, uzyskano pełne profile genetyczne we wszystkich badanych przypadkach bez względu na sposób oddzielania lizatu od podłoża. Przy zastosowaniu filtrów NucleoSpin® do izolacji DNA z materiału zdegradowanego uzyskano sześć profili częściowych, w których wypadnięciu uległy tylko allele w loci o wysokiej masie cząsteczkowej: D2S1338 i D18S51, w dwóch przypadkach dodatkowo D16S539 i D21S11 i w jednym przypadku locus FGA. Dla podłoża z inhibitorem otrzymano jeden pełny profil genetyczny, jeden częściowy (wypadły allele z układów D21S11, D18S51 oraz FGA), a w przypadku pozostałych sześciu próbek wynik genotypowania był negatywny. W wariantcie z przenoszeniem lizatu na kolumny ze złożem krzemionkowym za pomocą pipety dla materiału poddawanego degradacji termicznej uzyskano pełne profile genetyczne w siedmiu badanych przypadkach oraz jeden profil częściowy, gdzie wypadnięciu uległy wysokocząsteczkowe loci D21S11, D18S51 oraz FGA. Izolacja DNA z materiału stanowiącego 1 μl krwi naniesionej na podłoże z inhibitorem PCR skutkowała otrzymaniem trzech pełnych profili genetycznych

Tabela 9

Analiza uzyskanych profili genetycznych w zależności od zastosowanego wariantu izolacji

* zbadano 6 próbek

Analysis of the genetic profiles depending on the extraction's method variant

* six samples were examined

	Analiza jakości profili DNA				
	NucleoSpin® Tissue XS		QIAamp® DNA Micro		
	z filtrem	bez filtra	z filtrem, z nośnikiem RNA	bez filtra, bez nośnika RNA	bez filtra, z nośnikiem RNA
1 µl krwi na płótnie	8 FP	8 FP	4 FP/3 PP/ 1 NEG.	8 FP	7 FP/1 NEG.
2,5 µl krwi na płótnie	8 FP	8 FP	5 FP/3 PP	—	—
5 µl krwi na płótnie	8 FP	8 FP	6 FP/1 PP/ 1 NEG.	6 FP*	6 FP*
Próbka poddana degradacji	2 FP/6 PP	7 FP/1 PP	3 PP/5 NEG.	—	—
Próbka z inhibitorem reakcji PCR	1 FP/1 PP/ 6 NEG.	3 FP/2 PP/ 3 NEG.	8 NEG.	1 FP/4 PP/ 3 NEG.	3 FP/2 PP/ 3 NEG.
Próba kontrolna	8 FP	8 FP	5 FP/1 PP/ 2 NEG.	—	—

Zastosowane w tabeli oznaczenia:

FP – pełny profil (*full profile*)PP – częściowy profil (*partial profile*)

NEG. – brak profilu

oraz dwóch profili częściowych, w których wypadnięciu uległy następujące układy: D2S1338, D18S51 oraz FGA w jednej próbce, a także D3S1358, D16S539, D2S1338, D21S11, D18S51, TH01 oraz FGA w drugiej próbce. W pozostałych trzech przypadkach nie udało się uzyskać profili genetycznych.

Przy ekstrakcji DNA zestawem QIAamp® DNA Micro, oddzielając lizat od podłoża za pomocą pipety i bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego, uzyskano pełne profile genetyczne we wszystkich powtórzeniach dla 1 i 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno. Podobny wynik otrzymano dla wariantu z dodaniem nośnika RNA do buforu lizującego – sześć pełnych profili genetycznych (na sześć badanych) dla 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno i siedem profili genetycznych dla 1 µl krwi naniesionej na jałowe płótno. Tu jednak dla jednej próbki wynik genotypowania był negatywny. Przy zastosowaniu filtrów QIAshredder do izolacji DNA z 1 i 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno uzyskano częściowe profile genetyczne, w których wypadły układy: D18S51 w jednej próbce oraz D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D21S11, D18S51, D19S433, TH01 i FGA w kolejnych. Wraz ze wzrostem ilości materiału wyjściowego uzyskiwano więcej pełnych profili genetycznych – cztery dla 1 µl, pięć dla 2,5 µl oraz sześć dla 5 µl. Dla prób stanowiących 1 µl krwi naniesionej na jeans w ogóle nie uzyskano wyników genoty-

powania. Przenosząc lizat na kolumny za pomocą pipety, otrzymano jeden pełny i cztery częściowe profile genetyczne w wariacie bez dodatku nośnika RNA do buforu lizującego. We wszystkich przypadkach wypadnięciu uległy allele z loci D21S11, D18S51 oraz FGA, a dodatkowo TH01 w trzech próbkach, D3S1358 i D19S433 – w dwóch i vWA, D16S539 oraz D2S1338 – w jednej. Po dodaniu nośnika RNA do buforu lizującego otrzymano trzy pełne i dwa częściowe profile genetyczne z wygaszeniem sygnału w układach D16S539, D2S1338, D18S51 i FGA. Podobnie jak uprzednio, dla trzech próbek nie uzyskano wyników genotypowania. W próbie kontrolnej dla izolacji z zastosowaniem filtrów QIAshredder uzyskano pięć pełnych profili genetycznych oraz trzy częściowe, w których wypadnięciu uległy allele w układach D16S539, D2S1338, D18S51 i FGA.

W żadnym z analizowanych przypadków nie stwierdzono wystąpienia profilu mieszanego, co świadczy o braku kontaminacji próbek.

Podsumowanie

Większą efektywność izolacji genomowego DNA z materiału stanowiącego 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno przy użyciu zestawu NucleoSpin® Tissue XS obserwowano w przypadku oddzielania lizatu od pod-

łoża i jego przenoszenia na kolumny silikonowe za pomocą pipety. Analogiczne rezultaty uzyskano w przypadku materiału zdegradowanego. Podobnie wyższe średnie stężenia DNA przy zastosowaniu tego sposobu uzyskano w przypadku izolacji z materiału 1 oraz 2,5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno, jednakże wyniki te nie zostały potwierdzone statystycznie. Uzyskanie mniejszego stężenia DNA przy zastosowaniu filtrów NucleoSpin mogło wynikać z faktu zatrzymywania się części kwasów nukleinowych na membranie filtra. Oddzielanie lizatu od podłoża za pomocą filtrów NucleoSpin powoduje obniżenie stężenia DNA w otrzymywanych izolatach. Jedynie w przypadku analizy wyników uzyskanych po izolacji DNA z materiału stanowiącego 1 µl krwi naniesionej na podłoże z inhibitorem PCR uzyskano wyższe średnie stężenie DNA przy zastosowaniu filtrów NucleoSpin, ale wynik ten nie był statystycznie istotny.

Sposób oddzielania lizatu z próbek stanowiących 1, 2,5 i 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno oraz w przypadku próby kontrolnej nie miał wpływu na jakość genotypowania. Dla próbek poddanych degradacji oraz próbek na podłożu z inhibitorem PCR przy oddzielaniu lizatu od podłoża za pomocą pipety odsetek pełnych profili genetycznych był większy niż przy zastosowaniu filtrów.

W metodzie QIAamp® DNA Micro również wyższe stężenia DNA w izolatach uzyskiwano dla wariantu oddzielania lizatu od podłoża za pomocą pipety. Analogicznie, jak w poprzedniej metodzie, różnice były istotne statystycznie dla 5 µl krwi naniesionej na jałowe płótno. Z zastosowaniem filtrów QIAshredder wydajność procesu ekstrakcji znacząco spadała. To samo dotyczyło materiału stanowiącego 1 µl krwi naniesionej na podłoże z inhibitorem PCR. Miało to swoje odzwierciedlenie w jakości uzyskiwanych profili genetycznych. W opcji z zastosowaniem filtrów QIAshredder do oddzielenia lizatu od podłoża jakość genotypowania w rozpatrywanych przypadkach była znacznie niższa niż przy oddzielaniu lizatu od podłoża za pomocą pipety.

Nie zaobserwowano znaczącego wpływu obecności nośnika RNA w buforze lizującym ani na ilość, ani na jakość otrzymanych wyników.

BIBLIOGRAFIA

1. Dębska M., Drabik J.: Porównanie efektywności różnych metod izolacji genomowego DNA ze śladów biologicznych, „Problemy Kryminalistyki” 2009, 264, 11–25.
2. Qiagen QIAamp® DNA Micro Handbook, Germany 2003, 1–47.
3. Macherey–Nagel User Manual, NucleoSpin®Tissue XS – Genomic DNA from Tissue, Germany 2007, 1–29.

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, w jaki sposób zastosowanie etapu oddzielania podłoża od lizatu za pomocą filtrów wpływa na efektywność izolacji DNA przy zastosowaniu metody absorpcji-elucji zestawami NucleoSpin®Tissue XS oraz QIAamp® DNA Micro. Testowano również wpływ obecności nośnika RNA w buforze lizującym na wydajność procesu ekstrakcji. Materiał do badań stanowiła wysuszona krew na jałowym podłożu oraz na podłożu zawierającym inhibitor PCR, a także materiał zdegradowany. Większą efektywność izolacji genomowego DNA otrzymano w przypadku pominięcia etapu oczyszczania podłoża na filtrach zarówno w metodzie NucleoSpin®Tissue XS jak też QIAamp® DNA Micro. Różnice statystycznie istotne stwierdzono w przypadku izolacji DNA z 5 µl krwi na jałowym podłożu. Zastosowanie filtrów w metodzie NucleoSpin®Tissue XS w przypadku izolacji z 1, 2,5 oraz 5 µl krwi na jałowym płótnie oraz w próbie kontrolnej nie miało wpływu na jakość genotypowania. Natomiast dla próbek zdegradowanych oraz zawierających inhibitor PCR zanotowano większą ilość pełnych profili przy oddzielaniu lizatu od podłoża za pomocą pipety. W przypadku metody QIAamp® DNA Micro zastosowanie filtrów wpływało na uzyskanie mniejszej ilości pełnych profili genetycznych w rozpatrywanych przypadkach. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu obecności nośnika RNA ani na uzyskiwane stężenia DNA, ani na jakość otrzymanych profili genetycznych.

Słowa kluczowe: izolacja DNA, nośnik RNA, ślady biologiczne, kryminalistyczne badania DNA, metoda absorpcji-elucji.

Summary

The purpose of the research was to compare two methods of separation of the lysate from the solid sample material by the use of filter units and by pipette using different protocols for silica membrane based kits: NucleoSpin®Tissue XS and QIAamp® DNA Micro. The influence of carrier RNA addition to the lysis buffer on efficiency of DNA extraction was also tested. The material for the research consisted of dried blood spots on sterile linen as well as on jeans containing PCR inhibitor and also degraded DNA. As far as quantity aspect is concerned better results in both methods were obtained with no use of filter units. Statistical significance was observed in case of DNA extraction from 5 µl of blood on sterile linen. On the other hand the use of filter units had no influence on quality of DNA profiles in case of DNA extraction from 1, 2,5 and 5 µl of blood on sterile linen or from control samples. Better genotyping quality was obtained for degraded DNA and samples on jeans when the lysate was separated by pipette. The use of filter units in QIAamp® DNA Micro kit caused a decrease in genotyping quality. There was no significant influence on concentration of DNA or on genotyping quality when carrier RNA was added to the lysis buffer.

Keywords: DNA extraction, carrier RNA, forensic biology, absorption-elution method.