

Dorota Piasecka-Pazik, Zofia Szczerkowska

Wpływ stosowania albuminy wołowej i enzymu restrykcyjnego na jakość profili DNA tkanek wyizolowanych z bloczków parafinowych i z preparatów histologicznych

Influence of using bovine serum albumin and restriction enzyme on quality of DNA profile of tissues extracted from paraffin blocks and histological slides

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

Określano profile DNA tkanek utrwalonych i zatopionych w parafinie, oraz preparatów histologicznych. Analizowano wpływ wykorzystania albuminy wołowej (BSA) lub enzymu restrykcyjnego Hinf I na jakość DNA oczyszczanego tymi preparatami. Ich przydatność oceniano w oparciu o wyniki amplifikacji alleli locus VWA, a także przy użyciu kompleksowej reakcji PCR z zestawem AmpFfSTR® Identifiler™ (zawierającym 15 loci + locus amelogeniny) i zestawem AmpFSTR®SEfiler (zawierającym 11 loci + locus amelogeniny). Produkty PCR poddano rozdzielaniu na żelu poliakryloamidowym (VWA). Allele loci AmpFfSTR® Identifiler™ i AmpFSTR®SEfiler analizowano drogą elektroforez kapilarnej przy użyciu sekwenatora ABI Prism 310. Porównano wyniki uzyskane przy wykorzystaniu do oczyszczania DNA BSA lub Hinf I z wynikami bez stosowania tych preparatów. Wykazano pozytywny wpływ BSA i enzymów restrykcyjnych na jakość DNA. Otrzymane wyniki zweryfikowano w przypadku sprawy o ustalenie spornego ojcostwa z wykorzystaniem archiwalnego DNA oczyszczonego enzymem restrykcyjnym.

This paper reports the possibility of DNA profiling obtained from fixed and paraffin-embedded tissues or histological slides. The influence of using bovine serum albumin and restriction enzyme HinfI on quality of DNA was analysed. The usability of those Chemicals was estimated by examination of amplification results locus VWA, and multiplex PCR with the use of commercial kit AmpFfSTR® Identifiler™ (including 15 loci + amelogenine locus) and AmpFSTR®SEfiler kit (including 11 loci + amelogenine locus) Applied Biosystems. PCR products of VWA locus were separated by electrophoresis on polyacrylamide gels and visualized by silver staining. The products of loci of AmpFfSTR® Identifiler™ and AmpFSTR®SEfiler were analyzed by capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 sequencer. Results achieved with and without using bovine serum albumin and restriction enzyme HinfI were compared and positive influence of those substances on DNA quality was demonstrated. Obtained results of purification DNA with the use of

restriction enzyme were verified in paternity testing case.

Słowa kluczowe: albumina wołowa, enzym HinfI, bloczki parafinowe, preparaty histologiczne, VWA, AmpRSTR® Identifiler™, AmpRSTR®SEfiler

Key words: bovine serum albumin, enzyme HinfI, paraffin blocks, histological slides, VWA, AmpFSTR® Identifiler™, AmpFSTR®SEfiler

W ostatnich latach badania genetyczne na poziomie DNA zostały szeroko włączone do praktyki laboratoryjnej w medycynie sądowej (14). Badania te prowadzone są dwukierunkowo:

- w ustalaniu spokrewnienia i w dochodzeniu ojcostwa
- w analizie śladów biologicznych

W obu przypadkach niezbędne jest wykonanie analizy genetycznej na poziomie umożliwiającym jednoznaczne i prawidłowe wnioskowanie. W dochodzeniu ojcostwa należy określić taką liczbę markerów genetycznych, aby możliwe było wykluczenie ojcostwa niesłusznie pozwanego, lub jego potwierdzenie z prawdopodobieństwem co najmniej 99,999%.

Praktyka laboratoryjna dowodzi, że niejednokrotnie archiwalny materiał biologiczny np. w postaci tkanek utrwalonych i zatopionych w bloczkach parafinowych, czy preparatów histologicznych, może być jedynym dostępnym źródłem genomowego DNA (6, 7). Materiał genetyczny uzyskiwany z tego rodzaju tkanek jest zazwyczaj częściowo zdegradowany, może zawierać inhibitory utrudniające reakcję PCR (13), stąd konieczność stosowania dodatkowych zabiegów na etapie izolacji DNA pozwalających na otrzymanie matrycy dobrej jakości (10). Metody izolacji są bowiem kluczowym elementem każdej analizy genetycznej, warunkującym uzyskanie czytelnych profili DNA.

MATERIAŁ I METODY

Izolacja, oczyszczanie i pomiar stężenia DNA

Do izolacji genomowego DNA z tkanek w bloczkach parafinowych i z preparatów histologicznych zastosowano metodę fenolowo-chloroformową (11) oraz komercyjny zestaw QIAamp DNA Kit (GJagen) (8). DNA z krwi izolowano klasyczną metodą fenolowo-chloroformową.

Mając na uwadze rodzaj analizowanego materiału biologicznego, do oczyszczania DNA eksperymentalnie wykorzystano zmodyfikowaną metodę z zastosowaniem albuminy wołowej - BSA i enzymu restrykcyjnego wg Satoh'ya i wsp. (12).

Do buforu (50 mM Tris-HCl o pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 50 mM NaCl) dodawano 5 uL wyizolowanego DNA, oraz 2 uL HinfI (5 U/uL), lub BSA

(0,01%). Całość inkubowano w 37°C przez 60 min. Następnie próbkę w celu inaktywacji enzymu restrykcyjnego umieszczano w temp. 60°C na 15 min. DNA precypitowano 30 uL 100% etanolu, wirowano 5 min. (12000 obr./min.), odrzucano supernatant, a DNA rozpuszczano w 5 uL buforu TE o pH 8.0. Oczyszczony w ten sposób DNA wykorzystywano do reakcji PCR.

Stężenie DNA oznaczono metodą fluorymetryczną (Fluoroskan Ascent FL, ThermoLabsystems) z zastosowaniem odczynnika PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit f-my Molecular Probes.

Amplifikacja DNA, elektroforeza i detekcja alleli

Wyizolowany DNA poddano amplifikacji w pojedynczym locus VWA (1). Równolegle do amplifikacji zastosowano zestaw AmpFSTR® Identifiler™ f-my Applied Biosystems, który zawiera 15 polimorficznych loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA i locus amelogeniny) i zestaw AmpFSTR®SEfiler, który zawiera 11 loci (D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA, D21S11, D18S51 + locus amelogeniny) (2, 3). Do reakcji PCR używano termocyklera Mastercycler Gradient f-my Eppendorf. Porównawczo do amplifikacji stosowano zarówno DNA oczyszczony BSA lub enzymem Hinf I, jak i nie oczyszczany (o takim samym stężeniu), reakcja przebiegała w identycznych warunkach czasu i temperatury.

Produkty reakcji PCR rozdzielano na żelach poliakryloamidowych, barwiono metodą srebrną (VWA) (4), oraz z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310 f-my Applied Biosystems (zestawy AmpFIdentifiler i SEfiler).

WYNIKI I DYKUSJA

Kósel i wsp. (9) wskazywali na pozytywny wpływ dodania BSA lub enzymów restrykcyjnych do mieszaniny amplifikacyjnej. Z badań Satoh'a i wsp. (12) oraz z naszych obserwacji wynika, że substancje te wywierają pozytywny wpływ na jakość wyników po ich dodaniu na etapie oczyszczania DNA.

Na ryc. 1 przedstawiono profile VWA po dodaniu BSA do mieszaniny amplifikacyjnej.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że dodanie BSA do mieszaniny amplifikacyjnej nie miało pozytywnego wpływu na jakość produktu PCR.

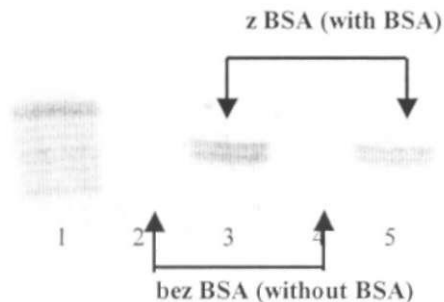
Eksperymentalnie oceniono wykorzystanie BSA na etapie oczyszczania DNA, a nie w reakcji amplifikacji. Wyniki przedstawiono na ryc. 2.

Badania wykazały, że w przypadku użycia jednakowych stężeń DNA oczyszczonego BSA i DNA bez stosowania albuminy, pozytywny produkt reakcji PCR uzyskiwano tam, gdzie matrycę stanowił DNA wcześniej traktowany albuminą wołową.



Ryc. 1. Obraz produktu reakcji PCR locus VWA z dodaniem do mieszaniny amplifikacyjnej albuminy wołowej (stężenie końcowe 0,05 mg/ul) oraz bez BSA. Ścieżki: 8 i 15 - drabina alleli locus VWA. Ścieżki: 7 i 14 - kontrolne DNA z krwi sekcijnej. Ścieżki: 1, 2, 3, 4, 5, 6 - DNA tkanek (wątroba, serce) utrwalanych przez 7 dni w 70% etanolu i 8% formalinie, BSA dodano do reakcji amplifikacji. Ścieżki: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 - DNA tkanek (wątroba, serce) utrwalanych przez 7 dni w 70% etanolu i 8% formalinie, BSA nie dodano do reakcji amplifikacji.

Fig. 1. Pattern of PCR products VWA locus with bovine serum albumin added to amplification (concentration 0.05 mg/ul) and without using BSA. Lanes: 8 and 15 - allelic ladder locus VWA. Lanes: 7 and 14 - DNA from blood (control). Lanes: 1, 2, 3, 4, 5, 6 - DNA of tissues (liver, heart) fixed 7 days in 70% ethanol and 8% formalin, with BSA added to amplification. Lanes: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 - DNA of tissues (liver, heart) fixed 7 days in 70% ethanol and 8% formalin, BSA no added to amplification.



Ryc. 2. Obraz produktu reakcji PCR locus VWA z DNA oczyszczonym BSA, oraz bez stosowania albuminy. Ścieżka 1 - drabina alleli locus VWA. Ścieżki: 2, 4 - DNA mózgu utrwalanego 3 dni w 70% etanolu i 8% formalinie izolowany metodą OIAamp DNA Kit (OiaGen), bez oczyszczania BSA. Ścieżki: 3, 5 - DNA mózgu utrwalanego 3 dni w 70% etanolu lub 8% formalinie izolowany metodą OIAamp DNA Kit (OiaGen), oczyszczany BSA.

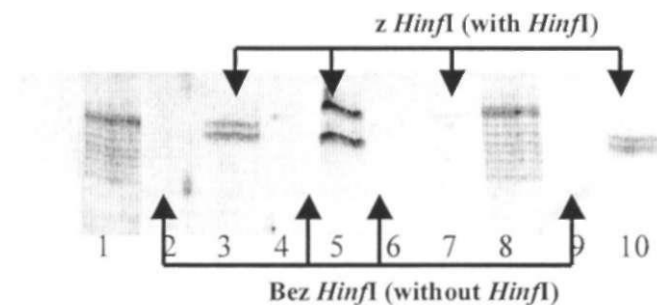
Fig. 2. Pattern of PCR products VWA locus with DNA treatment with BSA, and without using bovine serum albumin. Lane 1 - allelic ladder locus VWA. Lanes: 2, 4 - DNA of brain fixed 3 days in 70% ethanol or 8% formalin extracted by OIAamp DNA Kit method (OiaGen), no treatment with BSA. Lanes: 3, 5 - DNA of brain fixed 3 days in 70% ethanol or 8% formalin extracted by OIAamp DNA Kit method (OiaGen), treatment with BSA.

Podobnie korzystny efekt uzyskano również w przypadku zastosowania do oczyszczania DNA enzymu restrykcyjnego *HinfI*. Wyniki przedstawiono na ryc. 3.

Przydatność oczyszczania DNA sprawdzono również w oparciu o amplifikację metodą kompleksowego PCR (AmpFI Identifier). Porównawczo stosowano zarówno DNA oczyszczony enzymem *HinfI*, jak i bez tego enzymu. W obu przypadkach do amplifikacji stosowano DNA o takim samym stężeniu (0,8 ng/pL), reakcja przebiegała w identycznych warunkach czasu i temperatury. Wyniki przedstawiono na ryc. 4.

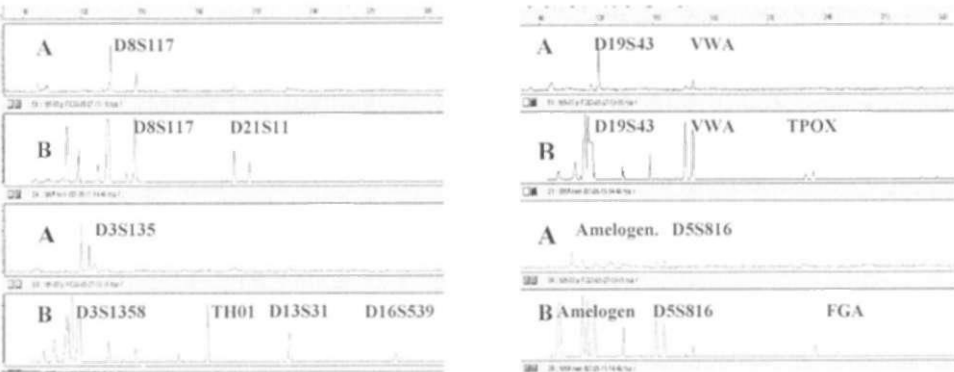
Zastosowanie w reakcji PCR DNA oczyszczanego albuminą wołową, czy enzymem restrykcyjnym, pozwala na uzyskanie pozytywnych sygnałów amplifikacji w większej liczbie analizowanych loci niż w przy braku BSA lub *HinfI* na tym etapie analizy.

Inkubowanie wyizolowanego DNA z albuminą wołową (BSA) lub enzymem restrykcyjnym *HinfI* powoduje usunięcie inhibitorów reakcji PCR, które mogą być obecne w materiale genetycznym uzyskiwanym z tkanek zatopionych w parafinie i preparatów histologicznych.



Ryc. 3. Rozdział produktów PCR locus VWA, DNA oczyszczany enzymem restrykcyjnym *HinfI*, oraz bez enzymu. Ścieżki: 1 i 8 - drabina alleli locus VWA. Ścieżki: 2, 4, 6, 9 - DNA serca i mózgu utrwalanego 7 dni w 70% etanolu i 4% formalinie, bez oczyszczania enzymem *HinfI*. Ścieżki: 3, 5, 7, 10 - DNA serca i mózgu utrwalanego 7 dni w 70% etanolu i 4% formalinie, oczyszczany enzymem *HinfI*.

Fig. 3. Electrophoresis of PCR products of locus VWA, DNA purified with restriction enzyme *HinfI* and without using this enzyme. Lanes: 1 and 8 - allelic ladder locus VWA. Lanes: 2, 4, 6, 9 - DNA of heart and liver fixed 7 days in 70% ethanol and 4% formalin, no treatment with *HinfI*. Lanes: 3, 5, 7, 10 - DNA of heart and liver fixed 7 days in 70% ethanol and 4% formalin, treatment with *HinfI*.



Ryc. 4. Obraz produktów reakcji PCR (AmpFI Identifiler). DNA serca (preparat histologiczny) bez oczyszczania i traktowany enzymem HinfI. Panel A - DNA nie oczyszczony enzymem Hinf I. Panel B - DNA oczyszczony enzymem restrykcyjnym Hinf I.

Fig. 4. Pattern of PCR products of AmpF ϕ STR $\circledR$ Identifiler. DNA of heart (histological slide) without purification and treatment with Hinf I. Panel A - DNA no treatment with Hinf I enzyme. Panel B - DNA treatment with Hinf I enzyme.

Wyniki badań z wykorzystaniem do oczyszczania DNA enzymu restrykcyjnego zweryfikowano w przypadku sprawy o ustalenie spornego ojcostwa. Do badań genetycznych wykorzystano DNA wyizolowany z tkanki mięśniowej (serce) pobranej od zmarłego w czasie sekcji zwłok, zabezpieczonej w postaci preparatu histologicznego. DNA od matki i dziecka izolowano z krwi. Archiwalny DNA pozwanego (2-letni preparat histologiczny) oczyszczano enzymem HinfI, a następnie poddano go amplifikacji przy użyciu dwóch komercyjnych zestawów AmpFIIdentifiler, oraz AmpFISEfiler, ze względu na częściową degradację DNA. Uzyskano pełny profil DNA, niezbędny do obliczenia szansy i prawdopodobieństwa ojcostwa. Na ryc. 5 przedstawiono profile DNA stron.

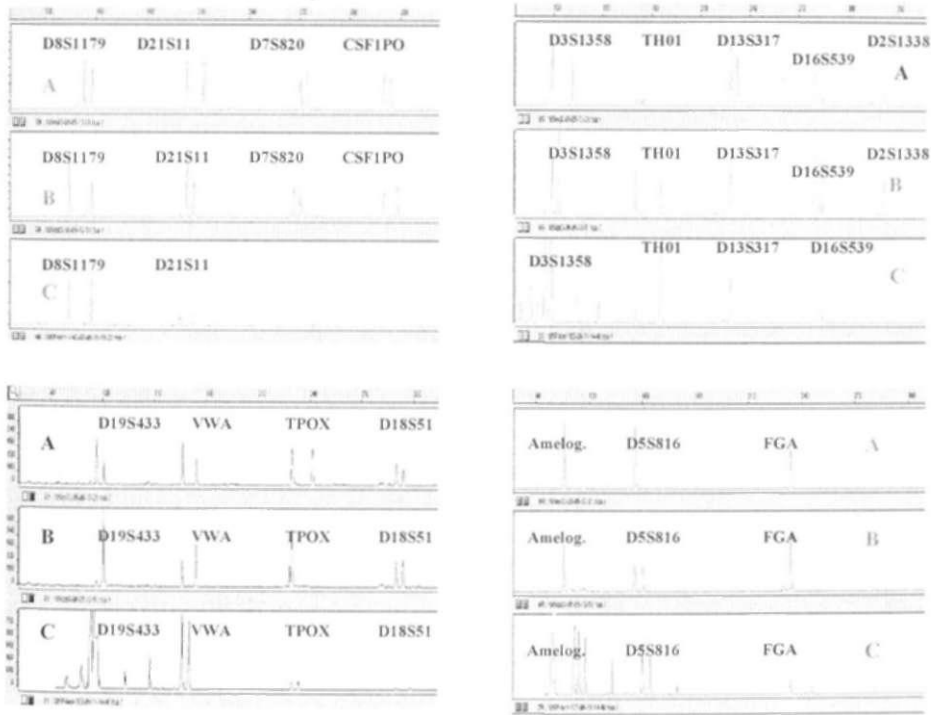
W tabeli I przedstawiono allele 16 loci matki, dziecka i pozwanego.

Tabela I. Allele 16 loci DNA stron w sprawie o ustalenie ojcostwa.
Table I. Allele of 16 DNA loci in paternity testing case.

Wybrane loci systemów AmpFISEfiler i AmpFI Identifiler Chooosen loci of AmpFISE- filer i AmpFI Identifiler	PROFIL DNA DNA Profile		
	MATKA Mother	DZIECKO Child	POZWANY Putative Father
D8S1179	13/14	11/14	11/14
D21S11	29/31.2	29/30	28/30
D7S820	10/11	9/10	9/12
CSF1PO	10/11	10/12	10/12

c. d. tabeli

D3S1358	14/17	14/15	14/15
TH01	6/7	6/9.3	9.3/9.3
D13S317	11/12	11/11	8/11
D16S539	12/13	12/13	13/13
D2S818	17/19	19/19	17/19
D19S433	13/14	14/14	14/14
VWA	14/16	14/16	14/15
TPOX	8/11	8/8	8/9
D18S51	14/15	14/15	14/16
D5S818	10/10	10/11	11/12
FGA	22/22	22/22	22/25
SE33	17/18	18/20	15/20



Ryc. 5. Profile DNA matki, dziecka i pozwanego (AmpFI Identifiler). Panel A - DNA z krwi matki. Panel B - DNA z krwi dziecka. Panel C - DNA z serca pozwanego (preparat histologiczny).

Fig. 5. DNA profile of mother, child and putative father (AmpFI Identifiler). Panel A - DNA of mother's blood. Panel B - DNA of child's blood. Panel C - DNA of putative father's heart (histological slide).

Analiza statystyczna wykonana w niniejszej sprawie i obliczenie szansy ojcostwa (PI) i prawdopodobieństwa ojcostwa (P) w oparciu o program komputerowy „Sero og” (5), pozwoliła na uzyskanie wyniku $P = 99,9999\%$. Ojcostwo zmarłego zostało więc praktycznie udowodnione.

wsadowym ustalaniu ojcostwa, 1998; Biblioteka Prawa Dowodowego, Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
ul. M. Curie-Skłodowskiej 3a
80-210 Gdańsk

PIŚMIENNICTWO

I. Allen R., Graves G., Budowle B.: Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 1989, 7, 736. - 2. AmpFISTR® SEfiler PCR Amplification Kit User's Manual. Applied Biosystems 2002; Foster City, CA, U.S.A. - 3. AmpFISTR® Identifiler PCR Amplification Kit User's Manual. Applied Biosystems 2002; Foster City, CA, U.S.A. - 4. Bassam B.J., Caetano-Andles G., Cresshof P.M.: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1991; 196:80-83. - 5. Berent J. Miścicka-Słiwka D. Algorytm do obliczeń prawdopodobieństwa ojcostwa dla układów dyskretnych i jego praktyczna realizacja. *Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1997, Tom III, 301-314. - 6. Dermengiu D., Barbarii L.: Parentage testing following an infanticide case using fetal DNA from archival fixed tissues. *Int. Congr. Ser.* 2003; 1239:613-616. - 7. Ehrig T., Abdulkadir S.A., Dintzis S.M., Milbrandt J., Watson M.A.: Quantitative Amplification of Genomic DNA from Histological Tissue Sections after Staining with Nuclear Dyes and Laser Capture Microdissection. *J Mol. Diagn.* 2003;3(1):22-25. - 8. Greenspoon S.A., Scarpetta M.A., Drayton M.L., Turek S.A.: OIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation for Forensic Casework. *J. Forensic Sci.* 1998;43(5):1024-1030. - 9. Kösel S., Grasbon-Frodl E.M., Arima K., Chimelli L., Hahn M., Hashizume Y.: Inter-laboratory comparison of DNA preservation in archival paraffin-embedded human brain tissue from participating centres on four continents. *Neurogenetics* 2001;2:163-170. - 10. Murase T., Inagaki H., Eimoto T.: Influence of Histochemical and Immunohistochemical Stains on Polymerase Chain Reaction. *Mod. Pathol.* 2000;13(2):147-151.

II. Sato Y., Sugie R., Tsuchiya B., Kameya T., Natori M., Mukai K.: Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Diagn. Mol. Pathol.* 2001;10(4):265-271 - 12. Satoh Y., Takasaka N., Hoshikawa Y., Osaki M., Ohfuji S., Ito H., et all.: Pretreatment with Restriction Enzyme or Bovine Serum Albumin for Effective PCR Amplification of Epstein-Barr Virus DNA Extracted from Paraffin-Embedded Gastric Carcinoma Tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1998;36(1):3423-3425. - 13. Scherczinger C.A., Ladd C, Bourke M.T., Adamowicz M.S., Johannes P.M., Scherczinger R.: A Systematic Analysis of PCR Contamination. *J. Forensic Sci.* 1999;44(5):1042-1045. -14. Szczerkowska, Z.: Badania biologiczne