

Adam Prośniak, Ewa Gloc, Jarosław Berent, Katarzyna Bąbol-Pokora, Renata Jacewicz, Stefan Szram

Ocena wydajności różnych metod izolacji DNA w plamach nasienia, krwi i śliny metodą QuantiBlot

Estimating the efficiency of DNA isolation methods in semen, blood and saliva stains using the QuantiBlot system

Z katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Łodzi
Kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. S. Szram

Praca przedstawia ocenę wydajności izolowania DNA w plamach krwi, śliny i nasienia. Próbki krwi przechowywane były przez miesiąc i rok, a próbki śliny oraz nasienia przez rok w temperaturze pokojowej w suchym i ciemnym miejscu. DNA izolowano wykorzystując: zestaw Fast DNA, ekstrakcję fenolową (wg Budowle'a), zestaw Sherlock (DNA II Gdańsk), zestaw DNeasy (Qiagen), zestaw Wizard Genomic Purification Kit (Promega), złoże Chelex 100 (Biorad), oczyszczanie DNA z odsalaniem białek – metoda solna (wg Słomskiego). Najwyższe stężenia DNA z krwi przechowywanej przez miesiąc i rok otrzymano wykorzystując metodę izolacji z odsalaniem białek, a także ekstrakcję fenolową. We krwi przechowywanej przez rok wydajny okazał się również zestaw Sherlock. W próbkach nasienia i śliny uzyskiwane stężenia DNA były bardzo niskie i mało powtarzalne.

The aim of this study was to compare and select the optimal method of DNA isolation from blood, semen and saliva stains, as well as to determine appropriate conditions for employing amplification kits for identification of individual persons. The materials analyzed in this study consisted of stains of blood, semen and saliva samples stored for a year, and stains of blood stored for a month. Seven various methods of isolation were compared: the Fast DNA kit (Qbiogene), phenol/chloroform extraction, Sherlock (DNA II Gdansk), Dneasy (Qiagen), Wizard Genomic Purification Kit (Promega), Chelex 100 (Biorad) and salting out proteins method. After the isolation, the quantity of DNA was measured with QuantiBlot. The highest DNA concentration in bloodstains stored for one year and one month was observed

employing the salting out proteins method. The phenol-chloroform extraction method was also found to produce reasonably good results. Isolation from blood and semen with salting-out method appeared to be the most effective. The phenol/chloroform method was dependent on the age and origin of the materials [brak w polskim tekście]. The Sherlock kit was proven to be effective in blood samples stored for one year. DNA concentration values obtained in semen and saliva samples were very low and characterized by a low repeatability.

WSTĘP

Izolowanie DNA jest kluczowym etapem analizy próbek biologicznych w genetyce sądowej. Jej głównym celem jest uzyskanie jak największej ilości niezdegradowanego, wysokocząsteczkowego DNA, zdatnego do wykorzystania jako matryca w reakcji PCR. Używane najczęściej protokoły izolowania zakładają użycie stosunkowo dużej ilości materiału do badań, najczęściej niemożliwej do uzyskania z materiałów archiwalnych i dowodowych. Poważnym problemem staje się również odpowiednie oczyszczenie próbek z różnego rodzaju inhibitorów reakcji PCR, takich jak barwniki organiczne, jony metali, itp., często uniemożliwiające dalszą analizę. W efekcie utrudnione staje się uzyskanie pełnego profilu genetycznego badanej osoby. Optymalizacja i uzyskanie wysokiej powtarzalności odzyskiwania DNA pozwalają na redukcję kosztów analizy, a także na pracę z bardzo małą ilością materiału,

rzędu kilkudziesięciu kopii matrycowego DNA. Najczęściej używane protokoły izolowania często nie uwzględniają specyfiki pracy na mocno zdegradowanym, „trudnym” materiale dowodowym. Dopracowanie własnego protokołu izolowania może przyczynić się do znacznej redukcji kosztów, zawyżanych często przez konieczność reamplifikacji źle wyizolowanej próby. Uzyskanie rzetelnych i powtarzalnych pomiarów stężeń DNA w próbkach umożliwia też późniejszą walidację wyników badań i ubieganie się o certyfikaty konieczne do prowadzenia badań DNA w zakresie identyfikacji osobniczej śladów biologicznych w praktyce sądowo-lekarskiej.

Celem pracy było określenie wydajności siedmiu różnych metod izolowania DNA, stosowanych rutynowo w praktyce genetyczno-sądowej, za pomocą komercyjnego zestawu QuantiBlot firmy Applied Biosystem.

MATERIAŁ I METODY

Próbki do izolowania DNA przygotowano wykorzystując wylane na bibułę i dokładnie wysuszone w temperaturze pokojowej plamy krwi ludzkiej, śliny i nasienia (po 10 ml). Preparaty podzielono na grupy i przechowywano w temperaturze pokojowej w suchym i ciemnym miejscu przez miesiąc i rok w przypadku krwi oraz przez rok w przypadku śliny i nasienia. Izolowano po pięć próbek z danego rodzaju materiału, każdą z siedmiu metod:

1. zestaw Fast DNA (Qbiogene) [4];
2. ekstrakcję fenolową (wg Budowle’a [1]);
3. zestaw Sherlock (DNA II Gdańsk);
4. zestaw DNeasy (Qiagen);
5. zestaw Wizard Genomic Purification Kit (Promega);

6. oczyszczanie DNA na złożu jonowymienным Chelex 100 (Biorad) [10, 5];

7. oczyszczanie DNA z odsalaniem białek – metoda solna (wg Słomskiego [9]).

Pomiaru stężeń uzyskanych po izolowaniu próbek DNA dokonano z zastosowaniem zestawu QuantiBlot (Applied Biosystem) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Porównanie stężeń i ilości otrzymanego DNA przeprowadzono z zastosowaniem analizy wariancji (ANOVA), z analizą „post-hoc” testem RIR Tukey’a (test rozsądnej informacji rozróżnienia).

WYNIKI

W próbkach izolowanych metodą solną oraz fenolową z krwi przechowywanej przez miesiąc uzyskano najwyższe stężenia DNA, odpowiednio 1,5 i 1,1 ng/μl (tabela 1). W przypadku krwi przechowywanej przez rok również te dwie metody dały najlepsze rezultaty – 0,7 i 0,22 ng/μl. W tej grupie porównywalne efekty otrzymano również podczas izolowania metodą Sherlock DNA II (0,25 ng/μl). W próbkach nasienia i śliny uzyskiwane po izolowaniu stężenia DNA były bardzo niskie i mało powtarzalne, a w niektórych próbkach nie wykryto obecności DNA (tabela 1). W tabeli 2 przedstawiono średnią całkowitą ilość DNA wyrażoną w ng, uzyskaną po izolowaniu DNA. Największy całkowity odzysk DNA z krwi przechowywanej przez miesiąc dawała metoda Qia DNeasy, niestety przy małym stężeniu. W czasie izolowania ze śliny i nasienia satysfakcjonujące wyniki zapewniała jedynie metoda solna oraz w mniejszym stopniu Promega Wizard i Sherlock DNA. Wydajność tych metod – ilość otrzymanego DNA była najbardziej zróżnicowana.

Tabela I. Średnie wartości stężeń DNA (ng/μl) (M), odchylenie standardowe (SD) i mediana (ME). Wartości mierzone z zastosowaniem metody QuantiBlot.

Table I. Mean values of DNA concentrations (ng/μl) (M), standard deviation (SD) and median (ME) measured by means of QuantiBlot.

Metoda	Krew (miesiąc)			Krew (rok)			Nasienie			Ślina		
	M	SD	ME	M	SD	ME	M	SD	ME	M	SD	ME
Fast DNA	0,113	0,090	0,125	0,022	0,014	0,031	-	-	-	-	-	-
Fenolowa	1,100	0,548	1,000	0,225	0,056	0,250	0,019	0,017	0,031	-	-	-
Chelex	0,250	0,000	0,250	0,200	0,068	0,250	-	-	-	-	-	-
Qia DNeasy	0,900	0,224	1,000	0,112	0,090	0,125	0,0250	0,014	0,031	-	-	-
Solna	1,500	0,707	2,000	0,700	0,274	0,500	0,112	0,028	0,125	0,025	0,056	0,000
Promega Wizard	0,081	0,041	0,062	0,044	0,017	0,031	0,062	0,038	0,062	0,012	0,017	0,000
Sherlock DNA II	0,900	0,224	1,000	0,250	0,000	0,250	0,056	0,040	0,031	0,069	0,034	0,062

Tabela II. Średnie ilości DNA (ng) (M) odchylenie standardowe (SD) i mediana (ME). Wartości mierzone z zastosowaniem metody QuantiBlot.

Table II. Mean amount of DNA (ng) (M), standard deviation (SD) and median (ME) measured by means of QuantiBlot.

Metoda	Krew (miesiąc)			Krew (rok)			Nasienie			Ślina		
	M	SD	ME	M	SD	ME	M	SD	ME	M	SD	ME
Fast DNA	11,25	9,00	12,50	2,19	1,40	3,12	-	-	-	-	-	-
Fenolowa	39,60	19,72	36,00	8,10	2,01	9,00	0,67	0,62	1,12	-	-	-
Chelex	50,00	0,00	50,00	40,00	13,69	50,00	-	-	-	-	-	-
Qia DNeasy	90,00	22,36	100,0	11,25	9,00	12,50	2,50	1,40	3,12	-	-	-
Solna	45,00	21,21	60,00	21,00	8,22	15,00	3,37	0,84	3,75	0,75	1,68	0,00
Promega Wizard	2,44	1,26	1,87	1,31	0,51	0,94	1,87	1,15	1,87	0,37	0,51	0,00
Sherlock DNA II	27,00	6,71	30,00	7,50	0,00	7,50	1,69	1,22	0,94	2,06	1,03	1,87

Tabela III. Analiza wariancji (ANOVA) z analizą „post-hoc” testem RIR Tukey’a.

Table III. Variance analysis (ANOVA) with „post-hoc” by the Tukey test.

	SS Efekt	df Efekt	MS Efekt	SS Błąd	df Błąd	MS Błąd	F	p
ng/μl								
krew (miesiąc)	9,05	6	1,508	3,639	28	0,1300	11,60467	0,000002
krew (rok)	1,57	6	0,261	0,366	28	0,0131	20,01168	0,000000
nasienie	0,05	6	0,008	0,018	28	0,0006	13,13981	0,000000
ślina	0,02	6	0,003	0,018	28	0,0007	4,95035	0,001446
ng								
krew (miesiąc)	25 003,71	6	4167,284	5865,747	28	209,4910	19,89243	0,000000
krew (rok)	5519,12	6	919,853	1369,289	28	48,9032	18,80968	0,000000
nasienie	49,26	6	8,209	23,397	28	0,8356	9,82444	0,000008
ślina	17,53	6	2,921	16,523	28	0,5901	4,95035	0,001446

Tabela IV. Różnice statystyczne stężeń DNA (ng/μl), po izolowaniu z krwi przechowywanej przez miesiąc (górna część tabeli) i przez rok (dolna część tabeli). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 Test RIR Tukey’a.

Table IV. Statistical differences between DNA concentrations (ng/μl) obtained from blood samples after 1 month (upper part) and 1 year (lower part) of storage.

Krew (miesiąc)	Fast DNA	Fenolowa	Qia DNeasy	Chelex	Solna	Promega Wizard	Sherlock DNA II
Fast DNA		**	*	ns	***	ns	*
Fenolowa	ns		ns	*	ns	**	ns
Qia DNeasy	ns	ns		ns	ns	*	ns
Chelex	ns	ns	ns		***	ns	ns
Solna	***	***	***	***		***	ns
Promega Wizard	ns	ns	ns	ns	***		*
Sherlock DNA II	ns	ns	ns	ns	***	ns	
Krew (rok)	Fast DNA	Fenolowa	Qia DNeasy	Chelex	Solna	Promega Wizard	Sherlock DNA II

wana statystycznie w wypadku izolowania z krwi przechowywanej przez miesiąc. W większości metody różniły się między sobą. Brak było istotnych różnic pomiędzy metodą Chelex a Fast DNA, Qia DNeasy, Promega Wizard, Sherlock DNA II. Nie było też różnic między Qia DNeasy i fenolową, solną, Sherlock DNA II (tabela 4). W badaniach izolatów

z krwi przechowywanej przez rok, największe różnice ujawniono pomiędzy metodą solną i resztą badanych metod. W przypadku izolowania z pozostałych materiałów tj. nasienia i śliny w większości nie stwierdzano różnic statystycznych, większość metod dawała negatywne wyniki izolacji. Wydajność w otrzymaniu całkowitej ilości DNA z badanej

Tabela V. Różnice statystyczne ilości DNA (ng), po izolowaniu z krwi przechowywanej przez miesiąc (górna część tabeli) i przez rok (dolna część tabeli).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Test RIR Tukey'a.

Table V. Statistical differences between amount of DNA (ng) obtained from blood samples after 1 month (upper part) and 1 year (lower part) of storage.

Krew (miesiąc)	Fast DNA	Fenolowa	Qia DNeasy	Chelex	Solna	Promega Wizard	Sherlock DNA II
Fast DNA		ns	***	**	*	ns	ns
Fenolowa	ns		***	ns	ns	**	ns
Qia DNeasy	ns	ns		**	***	***	***
Chelex	***	***	***		ns	***	ns
Solna	**	ns	ns	**		**	ns
Promega Wizard	ns	ns	ns	***	**		ns
Sherlock DNA II	ns	ns	ns	***	ns	ns	
Krew (rok)	Fast DNA	Fenolowa	Qia DNeasy	Chelex	Solna	Promega Wizard	Sherlock DNA II

próbki przy zastosowaniu tych metod w odniesieniu do plam krwi zarówno miesięcznej jak i rocznej była dość mocno zróżnicowana (Tabela 5). W badaniu plam nasienia i śliny w większości nie otrzymano wyników bądź były one nieistotne statystycznie. Istotność statystyczną stwierdzono w nasieniu pomiędzy metodą Fast DNA a Qia DNeasy i Promega Wizard, Chelex a Qia DNeasy, Promega Wizard i Fast DNA. Metodą wykazującą największe różnice w stosunku do pozostałych, była metoda solna. Wyniki analizy wariancji (ANOVA) z analizą „post-hoc” testem RIR Tukey'a przedstawia tabela 3.

DYSKUSJA

Badania zostały przeprowadzone przy zastosowaniu siedmiu różnych metod izolowania DNA, z materiału archiwalnego w postaci plam krwi przechowywanej przez różny czas oraz plam nasienia i śliny. Największe i powtarzalne stężenia DNA zapewniała metoda solna izolowania DNA. Jest to technika, w której od DNA oddzielane są białka poprzez ich wysalanie zbliżonymi do nasycenia stężeniami soli [6, 9]. Mimo jej dużej wydajności metoda ta nie jest zalecana w przypadku, gdy badana próbka ma być analizowana z zastosowaniem czułych metod automatycznych, z powodu możliwości wystąpienia zakłóceń spowodowanych złym oczyszczeniem. Stężenia uzyskane po izolowaniu metodą solną były najwyższe w przypadku plam krwi przechowywanej przez miesiąc, czyli praktycznie materiału świeżego, łatwo wyfukowalnego z podłoża. Z plam krwi wyizolowanych po roku uzyskano już o wiele mniejsze stężenia DNA. Również dość skuteczną metodą w stosunku do plam krwi okazała się klasyczna metoda fenolowa. Wyniki

uzyskane obydwoma wymienionymi metodami nie różniły się w sposób istotny statystycznie z większością zastosowanych metod, również ze sobą nawzajem w przypadku plam krwi przechowywanej przez miesiąc. Oznaczone stężenia DNA z plam krwi przechowywanych przez rok różniły się w mniejszym stopniu między sobą, co oznacza, że poszczególne metody mają w tym wypadku podobną wydajność, choć zaobserwowano znamiennej różnicę między metodą solną i fenolową. Natomiast dla próbek krwi najmniejszą wydajność zanotowano dla komercyjnych zestawów izolowania Fast DNA i Promega Wizard. W przypadku plam śliny i nasienia przechowywanych przez rok praktycznie wszystkie zastosowane metody izolowania okazały się równie mało skuteczne, zanotowano mało istotnych różnic w wartościach stężeń uzyskanych stosowanymi technikami przy pomiarach metodą Quanti-Blot. Większość metod dawała negatywne wyniki izolacji lub stężenia DNA niższe niż uzyskiwane z krwi.

W przypadku izolowania małych ilości i zdegradowanego materiału wyraźnie widać wyższość klasycznych metod izolowania, fenolowo-chloroformowej oraz solnej, nad komercyjnie dostępnymi zestawami. Izolacja gotowymi zestawami, mimo że krótsza i prostsza technicznie, w wielu przypadkach nie jest w stanie zapewnić właściwej ilości i jakości DNA. Również w innych pracach odzysk DNA przy użyciu komercyjnych zestawów i izolowania z 1 ml płynnej krwi, nie przekraczał 40 %, a często oscylował około 10 % ilości DNA w próbce [7]. Często trudno jest uzyskać odpowiednią powtarzalność jakości amplifikacji używając tych zestawów. Co więcej, najczęściej nie jest możliwa optymalizacja wydajności izolowania przy użyciu komercyjnie dostępnych metod, ze względu na ochronę patento-

wą i brak informacji o składzie i działaniu odczynników dostarczanych z gotowymi zestawami. Z drugiej jednak strony możliwa jest łatwiejsza automatyzacja takich metod, co być może w przyszłości zredukuje pojawiające się problemy z powtarzalnością wyników, czy też kontaminacją obcym DNA [8, 3]. Mimo sygnałów o małej przydatności metody solnej w automatycznym genotypowaniu [2], okazała się ona bardzo wygodna, tania i powtarzalna. Nie zaobserwowano niekorzystnych efektów wynikających ze złego odsolenia próbki i spowodowanej tym inhibicji polimerazy. Należy podkreślić również małą toksyczność stosowanych w metodzie solnej odczynników.

PIŚMIENNICTWO

1. Budowle B., Moretti T., Smith J.: DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis, Eaton Publishing 2000.
2. Devaney J. M., Marino M. A., Williams P. E., Weaver K. R., Del Rio S. A., Turner K. A., Belgrader P.: The evaluation of fast purification methods for preparing polymerase chain reaction (PCR) products for capillary electrophoresis analysis, *Theor. Electrophor.* 1996, 6, 11-4.
3. Gill P., Kimpton C. P., Urquhart A., Oldroyd N., Millican E. S., Watson S. K., Downes T. J.: Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future. *Electrophoresis.* 1995; 16, 1543-52.
4. <http://www.qbiogene.com/fastprep/Fast-PrepDB/index.shtml>.
5. Iwasa M., Koyama H., Tsuchimochi T., Maeno Y., Isobe I., Seko-Nakamura Y., Monma-Ohtaki J., Matsumoto T., Nagao M.: Y-chromosomal short tandem repeats haplotyping from vaginal swabs using a chelating resin-based DNA extraction method and a dual-round polymerase chain reaction. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 2003, 24, 303-5.
6. Laitinen J., Samarut J., Holtta E.: A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA., *Biotechniques* 1994, 17, 316-322.
7. Lebioda A., Świątek B., Dobosz T.: Preparacja DNA przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów, *Post. Biol. Molekul.* 2001, 239-241.
8. Moss D., Harbison S. A., Saul D. J.: An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase, *Int. J. Legal. Med.* 2003; 117, 340-9.
9. Słomski R.: Przykłady analiz DNA, *Post. Biol. Molekul. Poznań* 1999.
10. Walsh P. S., Metzger D. sA., Higuchi R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques.* 1991, 10, 506-13.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej UM w Łodzi
ul. Sędziowska 18a
91-304 Łódź