

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY  
ODDZIAŁ MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ

STUDIA JEDNOLITE MAGISTERSKIE  
KIERUNEK: Analityka medyczna

**SYLWIA MAJCHRZAK**

NR ALBUMU: 110299

„OCENA EFEKTYWNOŚCI WYBRANYCH METOD  
IZOLACJI DNA W GENETYCE SĄDOWEJ”

Praca magisterska napisana pod kierunkiem naukowym  
dr hab. n. med. Renaty Jacewicz  
Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej  
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

**Łódź, 2017**

*Podziękowanie za pomoc i okazane wsparcie  
dla dr hab. n. med. Renaty Jacewicz  
oraz dr n. med. Macieja Jędrzejczyka*

## Spis treści

I. Wstęp.....	4
1. Analiza DNA w genetyce sądowej.....	4
2. Etapy analizy DNA poprzedzające profilowanie DNA.....	6
3. Metody izolacji DNA w badaniach identyfikacyjnych.....	8
3.1. Metoda fenolowa.....	9
3.2. Metoda solna.....	10
3.3. Metoda magnetyczna.....	11
3.4. Metoda kolumnkowa.....	12
II. Cel pracy.....	13
III. Materiał i metodyka badań.....	14
1. Materiał.....	14
2. Metodyka badań.....	14
2.1. Sherlock AX.....	15
2.2. Genomic Mini AX BLOOD (SPIN).....	17
2.3. Genomic Micro Cell&Tissue.....	18
2.4. Genomic Micro AX BLOOD Gravity.....	19
3. Pomiar wyizolowanego DNA.....	21
4. Precyzja uzyskanych wyników.....	23
IV. Wyniki i omówienie.....	24
V. Wnioski.....	35
VI. Streszczenie.....	36
VII. Piśmiennictwo.....	37
VIII. Spis tabel i rycin.....	39
IX. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy.....	41

# I. Wstęp

## 1. Analiza DNA w genetyce sądowej.

Postęp dokonany w dziedzinie technik molekularnych na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat znacznie przyczynił się do rozwoju analiz DNA w genetyce sądowej. W spektrum badań z zakresu genetyki sądowej znajduje się identyfikacja zwłok i szczątków ludzkich, osób o nieznannej tożsamości, sprawców wypadków czy przestępstw [1]. Badania te umożliwiają identyfikację osób oraz ustalanie tożsamości ofiar katastrof, w tym masowych, gdy identyfikacja zwłok jest utrudniona bądź niemożliwa, w oparciu o dostępny materiał porównawczy stanowiący przedmioty codziennego użytku, takie jak: szczoteczka do zębów, grzebień, niewyprana bielizna. Mają zastosowanie podczas ustalania spornego ojcostwa (sporadycznie macierzyństwa) w sprawach alimentacyjnych oraz innych badaniach rodzinnych w sprawach spadkowych i imigracyjnych [2,3]. Bardzo istotne znaczenie odgrywają bazy profili DNA skazanych, które są niezwykle przydatne w walce z przestępczością.

Pierwsze analizy DNA dla celów sądowych opierały się na wykorzystaniu badań polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism* – RFLP) sekwencji powtórzonych 9 – 100 par zasad określanych mianem regionów minisatelitarnych. Odkrycie ich zawdzięczamy Jeffreysowi i współpracownikom [4,5]. Analizę tych regionów po raz pierwszy wykorzystano w sprawie o udowodnienie dwukrotnego morderstwa i gwałtu na piętnastoletnich dziewczynkach w brytyjskiej wiosce. Była to również pierwsza w historii badań DNA analiza, która pozwoliła na uwolnienie od zarzutów niesłusznie oskarżonego mężczyznę. Dzięki niepowtarzalnemu typowi wzoru VNTR dla każdego człowieka (z wyjątkiem bliźniąt jednojajowych), metoda ta nazywana jest analizą genetyczną odcisku palca (ang. *DNA Fingerprinting*).

Podstawą rozwoju metod stosowanych w badaniach genetycznych jest łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) opracowana przez

Kary Mullisa [6,7]. Bez niej niemożliwy byłby rozwój genetyki sądowej. Reakcja PCR umożliwia identyfikację osobniczą na podstawie śladowej ilości materiału (wystarczy 6 pg DNA zawarte w jednej komórce).

Badania identyfikacyjne opierają się obecnie na analizie tzw. sekwencji mikrosatelitarnych STR (ang. *Short Tandem Repeats*). W tych sekwencjach występuje powtarzający się w określonym miejscu genomu motyw 2-6 nukleotydowy (zwykle 4 nukleotydowy) średnio od kilku do kilkunastu razy tworząc cząsteczki w granicach 100 – 450 par zasad [8,9]. Fragmenty typu STR opisane zostały po raz pierwszy przez Edwardsa i współpracowników w 1991 roku [10].

Poznany dobrze mechanizm dziedziczenia markerów STR oraz zautomatyzowanie i optymalizacja technik analizy zapewniają krótki czas od pobrania materiału do uzyskania profilu DNA. Do powszechnego wykorzystywania markerów STR przyczyniała się ich łatwość amplifikacji, odporność na degradację, możliwość jednoczesnej amplifikacji oraz standaryzacja zakresów.

Uprzywilejowana do dnia dzisiejszego pozycja STR wiąże się między innymi z rozbudowanymi komputerowymi bazami danych zawierających profile genetyczne osób oskarżonych i skazanych. Pierwszą i obecnie największą na świecie jest utworzona w 1995 roku przez Forensic Science Service baza profili DNA w Wielkiej Brytanii. W roku 1997 roku FBI (ang. *Federal Bureau of Investigation*) wystandaryzowało zakres 13 loci STR, który stał się podstawą narodowej bazy danych DNA w USA, tzw. system CODIS (ang. *Combined DNA Index System*). W Europie kolejno po Wielkiej Brytanii stworzono bazy danych w Holandii, Austrii, Niemczech, Słowenii, Finlandii, Norwegii, Francji, Belgii, na Węgrzech. W Polsce baza danych profili DNA wykorzystywana do walki z przestępczością powstała w 2007.

W przypadku silnej degradacji DNA wykorzystuje się markery o mniejszych rozmiarach ampliconu. Są to markery typu mini-STR dające produkty o wielkości cząsteczki w zakresie 100-200 par zasad oraz markery typu SNP

(ang. *single nucleotide polymorphism*) o zmienności w obrębie pojedynczych nukleotydów [11].

## **2. Etapy analizy DNA poprzedzające profilowanie DNA.**

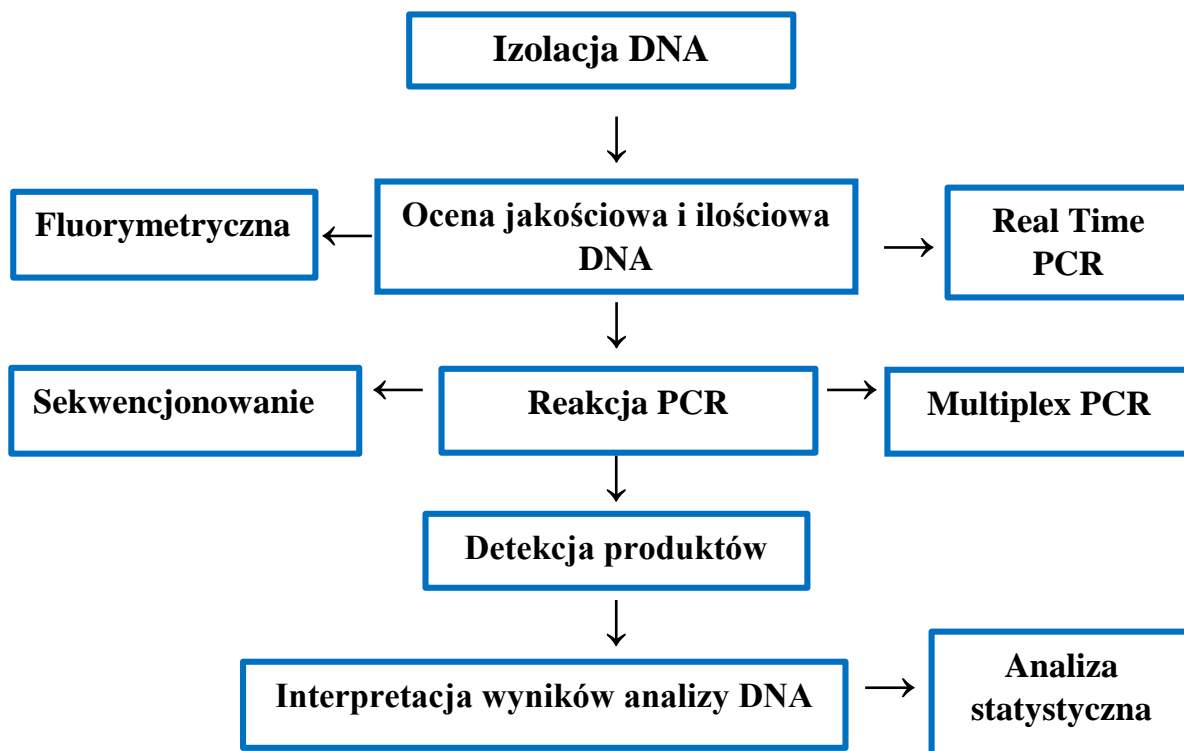
Pierwszym etapem poprzedzającym profilowanie DNA jest zabezpieczenie materiałów dowodowych, którymi mogą być: plamy krwi, spermy, śliny, paznokcie wraz z materiałem spod paznokci, niedopałki, odzież, przedmioty. Zależnie od rodzaju próbki trzeba zachować odpowiednie warunki jej przechowywania. Materiały suche pozostawia się w temperaturze pokojowej, z dostępem do powietrza, bez narażenia na UV i inne czynniki degradujące. Płyny ustrojowe oraz tkanki miękkie i kości przechowuje się w temperaturze od -20°C do -80°C. Krew pobiera się na antykoagulant EDTA i przechowuje w zamrożeniu, wylewa na bibułę, płótno czy karty FTA i przechowuje w temperaturze pokojowej. Ważnym aspektem jest takie zabezpieczenie materiału, aby nie doszło do jego skontaminowania obcym DNA nie pochodzącym z zabezpieczonego śladu. Przyczyną degradacji materiałów czy wymazów może być pozostawienie w nasłonecznionym miejscu, niedosuszenie, zabrudzenie detergentami, chemikaliami glebą (kwasy humusowe) czy też rdzą. Przechowywanie materiału dowodowego w szczelnie zamkniętych workach prowadzi do jego pleśnienia lub gnicia z powodu rozwoju grzybów lub bakterii beztlenowych.

Pobrany materiał poddawany jest testom jakościowym niespecyficznym oraz specyficznym dla krwi, śliny czy spermy. Tabela 1 zawiera zestawienie najczęściej wykonywanych testów jakościowych przed przystąpieniem do analizy DNA.

Tabela 1. Testy specyficzne i niespecyficzne

material \ testy	Specyficzne	niespecyficzne
<b>ślina</b>	-przeciwciała anty ludzkie alfa-amylaza	- płytkowy (agar+skrobia) - odciskowy Phadebas
<b>krew</b>	- przeciwciała anty ludzka Hb	- luminol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>sperma</b>	- przeciwciała anty ludzki Ag globuliny gruczołu krokowego (PSA)	-wizualizacja plemników -UV / Bluemaxx -kwaśna fosfataza (AP)

Kolejne standardowe etapy analizy DNA obejmują: izolację DNA, która szczegółowo została omówiona w podrozdziale 3, ocenę jakościową i ilościową uzyskanego DNA, reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR), detekcję produktów amplifikacji a następnie interpretację wyników oraz analizę statystyczną. Schemat przebiegu standardowej ekspertyzy w zakresie genetyki sądowej został przedstawiony na Rycinie 1.



Rycina 1. Etapy przebiegu standardowej ekspertyzy w zakresie genetyki sądowej

Do ustalenia profilu STR wykorzystuje się multipleksową reakcję PCR. Technika ta służy do amplifikowania wielu matryc podczas jednej reakcji [12]. Wykorzystuje się w niej wiele par primerów znakowanych różnymi fluorochromami. Jednoczesna detekcja markerów o tym samym zakresie wielkości jest bardzo istotna w sytuacji, gdy ilość DNA jest bardzo mała. Pozwala na uzyskanie w stosunkowo krótkim czasie i przy niskich kosztach oznaczeń o wysokiej wartości dowodowej [13].

Aktualnie złotym standardem w rozdziale produktów reakcji multiplex PCR jest elektroforeza kapilarna [14]. Ujemnie naładowane cząsteczki DNA migrują w kierunku elektrod o dodatnim ładunku w cienkich kwarcowych rurkach. Po dotarciu do okna detekcji poddawane są one działaniu światła lasera. Wzbudzany przez laser sygnał znakowanych fluoroscencyjnie cząsteczek odczytywany jest przez kamerę CCD. Intensywność świecenia zależy od uzyskanej ilości produktów amplifikacji. Jednocześnie rozdzielaniu i detekcji poddawane są fragmenty DNA o znanej wielkości i ilości tandemowych powtórzeń, pełniące rolę wzorca. Analiza komputerowa zebranych przez detektor sygnałów przeprowadzana jest z wykorzystaniem porównania do wzorca ilości par zasad oraz do drabiny allelicznej. Uzyskany pomiar wielkości cząsteczki i zawartej w niej ilości tandemowych powtórzeń pozwala na detekcję alleli wchodzących w skład badanego profilu genetycznego [14,15].

### **3. Metody izolacji DNA w badaniach identyfikacyjnych.**

Kluczowym etapem analizy próbek pochodzących z materiału biologicznego jest izolacja DNA. Głównym celem jest uzyskanie jak największej ilości jak najmniej zdegradowanego kwasu deoksyrybonukleinowego oraz uwolnienie go z zanieczyszczeń. Kluczowy aspekt stanowi jałowość pracy, gdyż od niego zależy dalszy prawidłowy przebieg analizy.



Metoda kolumnkowa, magnetyczna oraz organiczna są najczęściej stosowanymi metodami izolacji DNA w praktyce badawczej z zakresu genetyki sądowej. Alternatywną procedurą ekstrakcji DNA jest metoda Chelex, w której dodajemy żywicę chelatującą o wysokim powinowactwie do jonów metali wielowartościowych [16]. Żywica ta wiąże i usuwa jony metali podczas izolacji, co zapobiega uszkodzeniom DNA oraz redukuje inhibitory reakcji PCR. Może być dodawany bezpośrednio do próbki (stanowiącej krew lub plamę krwi czy też nasienie). Metoda ekstrakcji DNA typu Chelex jest niezwykle szybka i tania w porównaniu do innych metod. Z uwagi na brak wielu etapów jest mniej narażona na zanieczyszczenia materiału niż inne wieloetapowe metody. Ograniczeniem jej jest denaturacja podwójnej helisy DNA przez Chelex, przez co uzyskujemy jednoniciowe DNA, przydatne wyłącznie do reakcji PCR [12].

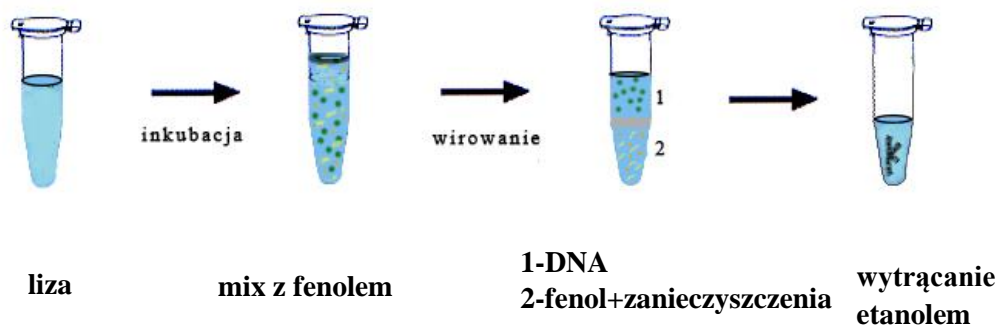
Szerokie zastosowanie w praktyce kryminalistycznej mają też karty FTA zawierające substancje chemiczne, które powodują lizę komórek, denaturację białek oraz zabezpieczają kwasy nukleinowe przed działaniem promieniowania UV, utleniaczy i nukleaz. W ich składzie jest także substancja zapobiegająca rozwojowi bakterii. Pobranie próbki poprzez jej naniesienie na kartę FTA, a następnie dokładne wysuszenie pozwala na jej archiwizowanie przez wiele lat w temperaturze pokojowej. Fragment karty wraz z pobranym materiałem, po przepłukaniu wielokrotnie buforem ekstrakcyjnym w celu usunięcia inhibitorów, stanowi materiał gotowy do reakcji PCR [14,15]. Metoda jest prosta i szybka jednak wiąże się ze stosunkowo wysokimi kosztami zakupu.

### **3.1. Metoda fenolowa**

Metoda fenolowa (organiczna) opiera się na ekstrakcji wodnych roztworów kwasów nukleinowych. Najczęściej wykorzystywanym rozpuszczalnikiem jest mieszanina fenol/chloroform. Próbkę poddajemy lizie z wykorzystaniem detergentu jonowego, np. SDS oraz proteiny K, które rozrywają błonę komórkową oraz trawią proteiny związane z DNA. Dodanie mieszaniny

fenol/chloroform pozwala na rozdzielenie frakcji DNA od frakcji białek i zanieczyszczeń. Chloroform przyczynia się do otrzymania dwóch faz: organicznej i wodnej [16].

W fazie organicznej (dolnej) znajduje się fenol z zanieczyszczeniami. W fazie wodnej (górnej) znajdują się kwasy nukleinowe. W następnym etapie kwasy nukleinowe zabrane wraz z roztworem górnej fazy wytrącamy 96% etanolem. Dzięki temu uzyskujemy DNA o wysokim stopniu odzysku i czystości. Wadą tej metody jest czasochłonność, narażenie na kontakt z toksycznymi substancjami organicznymi oraz konieczność przenoszenia materiału pomiędzy wieloma probówkami, co podnosi ryzyko zanieczyszczenia. Rycina 2 przedstawia schemat izolacji DNA metodą fenolową.

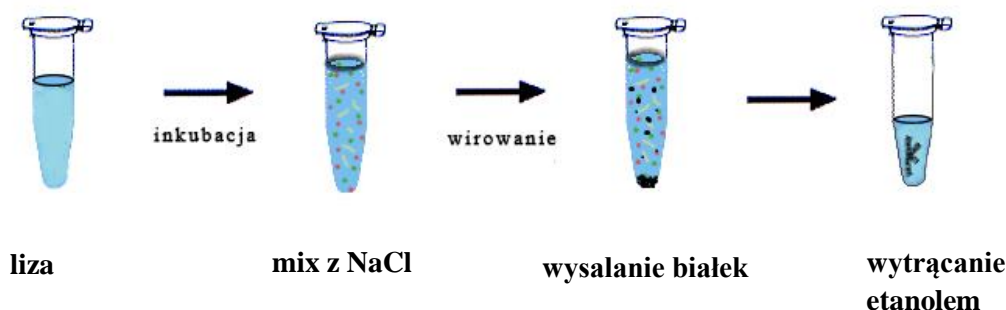


**Rycina 2.** Schemat izolacji kwasów nukleinowych metodą fenolową.

### 3.2. Metoda solna

Metoda solna jest rzadziej stosowana ze względu na znaczną czasochłonność, wieloetapowość oraz stosunkowo niską czystość uzyskanego w niej DNA. Zaletą tej metody jest brak narażenia na czynniki toksyczne oraz niskie koszty. Odbiałczanie DNA zachodzi na skutek wysalania białek komórkowych z użyciem nasyconego roztworu chlorku sodu następującego po etapie lizy komórek

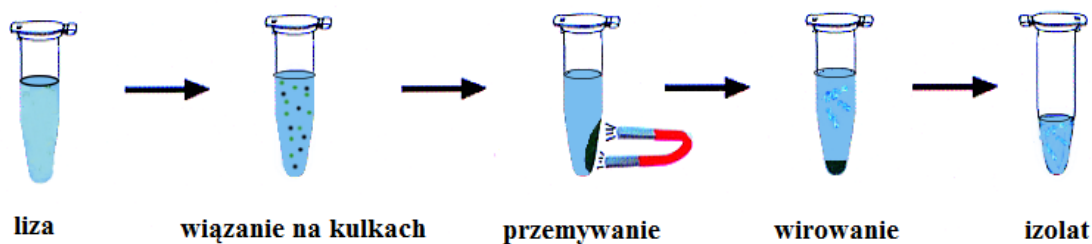
w obecności buforu ekstrakcyjnego, proteiny K oraz SDS. Próbkę poddajemy kilkugodzinnej inkubacji, po której dodajemy nasycony roztwór chlorku sodu. Po wirowaniu ściągamy górną fazę, do której dodajemy 96% etanol, aby DNA uległo wytrąceniu. Otrzymane w postaci osadu DNA przemywamy 70% etanolem i zawieszamy w odpowiednim buforze [12]. Zaletą tej metody jest niski koszt oraz możliwość uzyskania wysokocząsteczkowego DNA. Rycina 3 pokazuje schemat izolacji z wykorzystaniem metody solnej.



**Rycina 3.** Schemat izolacji kwasów nukleinowych metodą solną.

### 3.3. Metoda magnetyczna

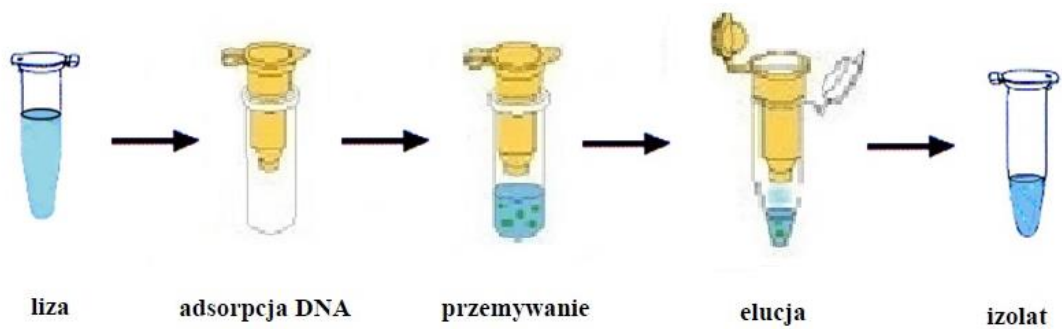
W metodzie magnetycznej wykorzystuje się powinowactwo cząsteczek DNA do ligandu związanego z kulkami magnetycznymi. Procedura rozpoczyna się od lizy komórek w obecności proteiny K oraz odpowiedniego buforu lizującego. Następnie dodaje się zawiesinę zawierającą kulki magnetyczne, do których wiążą się cząsteczki DNA. Kulki ze związanym materiałem poddajemy działaniu magnesu, który je unieruchamia. Za pomocą pipety usuwamy supernatant. Związane na kulkach kwasy nukleinowe przemywamy kilkakrotnie usuwając zanieczyszczenia. W ostatnim etapie odłączamy magnes, a DNA związane na kulkach odzyskujemy przy pomocy odpowiedniego buforu elucyjnego. Całość wirujemy aby pozbyć się kulek. Schemat procedury przedstawiony jest na Rycinie 4.



**Rycina 4.** Schemat izolacji kwasów nukleinowych metoda magnetyczną.

### 3.4. Metoda kolumnkowa

Metoda kolumnkowa charakteryzuje się krótkim czasem wykonania procedury, dobrze wystandardyzowanymi i łatwymi w wykonaniu etapami oraz dużą czystością uzyskiwanego materiału. Próbkę poddawana jest lizie w obecności proteinazy K, odpowiedniego buforu lizującego oraz soli chaotropowych. Te ostatnie rozrywają wiązania wodorowe istniejące pomiędzy makrocząsteczkami DNA a cząsteczkami wody. W obecność soli chaotropowych o wysokim stężeniu następuje absorpcja DNA do membran jonowo-wymiennych dzięki usunięciu „płaszczka wodnego” z jego powierzchni. Następnie przemywa się kolumny dwukrotnie za pomocą roztworów płuczających o niższej sile jonowej. Ma to na celu usunięcie inhibitorów reakcji PCR, białek i innych zanieczyszczeń. Ostatni etap postępowania to elucja DNA z membrany dzięki działaniu buforu o niskiej zawartości soli. DNA odrywa się od membrany i przechodzi do roztworu. Schemat procedury przedstawiono na Rycinie 5.



**Rycina 5.** Schemat izolacji DNA metoda kolumnkową.

## II. Cel pracy

Głównym aspektem badań było porównanie efektywności izolacji DNA w zakresie czterech niezależnych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych przy użyciu metody kolumnkowej, celem oceny stopnia ich przydatności w badaniach z zakresu genetyki sądowej.

Ponadto przeprowadzono analizy badanych metod izolacji w zakresie oceny ich powtarzalności oraz odtwarzalności, jako istotnych parametrów w procesie walidacji.

### **III. Materiał i metodyka badań**

#### **1. Materiał.**

Do izolacji każdej z prób wykorzystano po 100  $\mu$ l krwi, zdeponowanej w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, której dysponentem jest promotor pracy. **Na wykorzystanie wyżej wymienionej próby krwi do badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki nr RNN/263/16/KE z dnia 11 października 2016 roku.**

#### **2. Metodyka badań.**

Użyto po 100  $\mu$ l z tej samej próby krwi w każdej z dwudziestu kolejnych izolacji DNA przy użyciu czterech różnych metod z wykorzystaniem kolumnienek:

1. Sherlock AX,
2. Genomic Mini AX BLOOD (SPIN),
3. Genomic Micro Cell&Tissue,
4. Genomic Mini AX BLOOD Gravity.

Każdy zestaw składał się z gotowych do użycia kolumnienek (zależnie od metody zestawy różniły się ich liczbą) oraz zestawem buforów i roztworów.

Izolację przeprowadzono zgodnie z załączonymi instrukcjami w wielu etapach obejmujących kolejno:

1. inkubację krwi w obecności Proteinazy K oraz odpowiedniego buforu lizującego,
2. adsorpcję na membranie jonowymiennej,
3. przemywanie kwasów nukleinowych za pomocą odpowiednich buforów,
4. uwalnianie DNA z membrany.

Pierwszego dnia wybraną metodą przeprowadzono dziesięć izolacji wykorzystując każdorazowo po 100  $\mu\text{l}$  badanej krwi. Uzyskany izolat zawieszano każdorazowo w 30  $\mu\text{l}$  wody destylowanej. Po skończonej izolacji dokonywano pomiaru stężenia DNA wytrąconego bezpośrednio z roztworu po zakończeniu izolacji (metoda 2, 3 oraz 4) lub też po etapie rozpuszczenia uprzednio wytrąconego DNA w osadzie (metoda 1). Drugiego dnia izolacji wybraną metodą przeprowadzono dziesięć kolejnych izolacji DNA, wykorzystując jak pierwszego dnia, każdorazowo po 100  $\mu\text{l}$  badanej krwi oraz zawieszając izolat w 30  $\mu\text{l}$ . Pomiaru stężenia wyizolowanego DNA zarówno po pierwszym jak i po drugim dniu izolacji dokonywano dwukrotnie (seria „a” i seria „b”). Szczegółowe procedury izolacji przeprowadzane w oparciu o 4 kolejne metody w odniesieniu do każdego z kolejnych zestawów zawarto w punktach 2.1-2.4.

## **2.1. Sherlock AX**

Zestaw wykorzystuje unikalne membrany jonowymienne wiążące efektywnie DNA. Pozwala on na wykonanie 100 izolacji. Po lizie komórek lub tkanek próbki są filtrowane aby oddzielić zanieczyszczenia pochodzące z podłoża. Następnie nanoszone są na gotowe kolumny z membranami jonowymiennymi, na których zatrzymuje się DNA, podczas gdy zdecydowana większość zanieczyszczeń przechodzi nie wiążąc się. Wypłukuje się w ten sposób resztę zanieczyszczeń, a następnie wymywa DNA z membran roztworem soli o wysokiej sile jonowej. Kwasy nukleinowe odsala się i zagęszcza przez precypitację alkoholową z niebieskim wzmacniaczem precypitacji, który zwiększa wydajność procesu oraz wyklucza możliwość przypadkowej utraty osadu. Po tej procedurze uzyskuje się DNA o najwyższym stopniu oczyszczenia, które można zawiesić w dowolnej objętości wody lub odpowiedniego buforu [17].

Kolejno przeprowadzono czynności:

- 2.1.1. Rozmrożoną krew poddano zworteksowaniu i odpipetowano do probówki eppendorfa 100  $\mu$ l, a następnie dodano 200  $\mu$ l wody, 300  $\mu$ l buforu L1.4 oraz 20  $\mu$ l Proteiny K. Całość wymieszano i inkubowano w 50°C przez 10 minut od czasu do czasu worticując.
- 2.1.2. Po inkubacji naniesiono próbkę na kolumnę z żółtym kółkiem (Filtr 1), a następnie całość wirowano 1 minutę przy 8 000 obr./min.
- 2.1.3. Usunięto kolumny filtracyjne Filtr 1. Przesącz z DNA naniesiono na kolumny oczyszczające Spin 10 AX (z niebieskim kółkiem). Wirowano 1 minutę przy 8 000 obr./min.
- 2.1.4. Wylano przesącz i ponownie umieszczono kolumny Spin 10 AX w tych samych probówkach. Naniesiono po 600  $\mu$ l roztworu płuczącego K2, a następnie wirowano 1 minutę przy 8 000 obr./min.
- 2.1.5. Powtórzono punkt 2.1.4.
- 2.1.6. Przesącz wylano, a kolumny Spin 10 AX przeniesiono do nowych 2 ml probówek typu eppendorf, a następnie dodano 350  $\mu$ l roztworu elucyjnego K3. Pozostawiono na 2 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 1 minutę przy 8 000 obr./min.
- 2.1.6. Dodano 350  $\mu$ l roztworu elucyjnego K3, po 1 minucie wirowano przez 1 minutę przy 8 000 obr./min.
- 2.1.7. Usunięto kolumnę, a eluat z DNA przeniesiono pipetą do probówki o objętości 1,5 ml i dodano 5  $\mu$ l wzmacniacza precypitacji oraz 600  $\mu$ l izopropanolu. Całość wymieszano i wirowano 10 min przy minimum 10 000 obr./min.
- 2.1.8. Po odwirowaniu zlano supernatant zachowując ostrożność aby nie usunąć niebiesko zabarwionego osadu DNA. Dodano 500  $\mu$ l 70 % etanolu, wymieszano próbkę i wirowano 5 minut przy 10 000 obr./min.



2.1.9. Po wirowaniu zlano supernatant i odwrócono probówki a następnie pozostawiono na 10 minut w temperaturze pokojowej.

2.1.10. Usunięto resztki alkoholu ze ścianek a osad zawieszono w 200 µl wody.

## **2.2. Genomic Mini AX BLOOD (SPIN)**

W metodzie tej wykorzystuje się podobnie jak w metodzie Sherlock AX membrany jonowymienne, które wiążą ujemnie naładowane cząsteczki DNA. Membrany są umieszczane w specjalnych kolumnkach. Przepływ roztworów przez kolumnkę zachodzi pod wpływem siły odśrodkowej w trakcie krótkiego wirowania kolumnki osadzonej w probówce typu eppendorf. Większość zanieczyszczeń przechodzi natomiast nie wiążąc się z membraną i dzięki temu jest usuwana. Zestaw pozwala na wykonanie 50 izolacji [18].

Kolejno przeprowadzono czynności:

2.2.1. Rozmrożoną krew poddano zworteksowaniu i odpipetowano 100 µl do probówki eppendorfa, dodano 100 µl buforu lizującego L1.4 oraz 20 µl Proteinazy K, całość zworteksowano przez 5 sekund i inkubowano w 50<sup>0</sup>C przez 10 minut. Po 5 minutach ponownie całość zworteksowano przez 5 sekund. Czynność powtórzono po upływie 7,5 minut.

2.2.2. Po okresie inkubacji próbkę intensywnie zworteksowano przez 20 sekund (kluczowy etap dla wydajności izolacji DNA).

2.2.3. Wirowano probówki przy prędkości około 10 000 obr./min przez 10 sekund aby usunąć zlizowany materiał z przykrywek probówek eppendorfa.

2.2.4. Przeniesiono próbę na kolumnę Mini AX Spin, która znajdowała się w 2 ml probówce. Wirowano probówki przy prędkości 10 000 obr./min przez 60 sekund.

- 2.2.5. Usunięto próbkę wraz z przesączem i umieszczono kolumnę Mini AX Spin w nowej 2 ml próbce (w zestawie). Naniesiono 600  $\mu$ l buforu płuczącego W1. Całość zwirowano przy prędkości 10 000 obr./min przez 60 sekund.
- 2.2.6. Usunięto próbkę wraz z przesączem i umieszczono kolumnę Mini AX Spin w nowej 2 ml próbce (w zestawie). Naniesiono 500  $\mu$ l buforu płuczącego W2. Całość zwirowano przy prędkości około 10 000 obr./min przez 60 sekund.
- 2.2.7. Podczas wirowania przygotowano próbki elucyjne i dodano na ich dno po 5  $\mu$ l buforu zobojętniającego.
- 2.2.8. Po wirowaniu usunięto wraz z przesączem próbkę i umieszczono kolumnę Mini AX Spin w próbce do elucji. Naniesiono 75  $\mu$ l buforu elucyjnego E i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- 2.2.9. Wirowano próbkę przez 60 sekund przy 10 000 obr./min.
- 2.2.10. Ponownie naniesiono na kolumny Mini AX Spin po 75  $\mu$ l buforu elucyjnego E.
- 2.2.11. Powtórzono punkt 2.2.9.
- 2.2.12. Usunięto kolumny Mini AX Spin. Probówki zawierające DNA zamknięto.

### **2.3. Genomic Micro Cell&Tissue**

Metoda ta służy on do izolacji DNA, gdy mamy małą ilość materiału. Zestaw pozwala na wykonanie 50 izolacji. Metoda ta wykorzystuje mikrokolumny z membranami jonowymiennymi [19].

Kolejno przeprowadzono czynności:

- 2.3.1. Rozmrożoną krew poddano zworteksowaniu i odpipetowano 100  $\mu$ l do probówki eppendorfa, dodano 100  $\mu$ l buforu lizującego A oraz 10  $\mu$ l Proteiny K, całość wymieszano i inkubowano w temp. 50°C do całkowitego strawienia tkanek.
- 2.3.2. Termoblok ustawiono na 70°C i umieszczono w nim probówki z buforem elucyjnym Tris, który wykorzystano w kolejnych etapach.
- 2.3.3. Dodano 200  $\mu$ l roztworu wiążącego B, całość wymieszano i naniesiono na mikrokolumny. Probówki wirowano 60 sekund przy 12 000 obr./min.
- 2.3.4. Na kolumny naniesiono 400  $\mu$ l roztworu płuczącego C. Następnie wirowano 60 sekund przy 12 000 obr./min.
- 2.3.5. Przeniesiono mikrokolumny do nowych probówek 2 ml. Dodano 400  $\mu$ l roztworu płuczącego C. Wirowano 2 minuty przy 12 000 obr./min.
- 2.3.6. Mikrokolumny przeniesiono do nowych probówek elucyjnych o objętości 1,5 ml.
- 2.3.7. Na dno probówek dodano po 25  $\mu$ l ogrzanego do 70°C roztworu Tris.
- 2.3.8. Poddano je inkubacji przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- 2.3.9. Probówki wirowano 60 sekund przy 12 000 obr./min.
- 2.3.10. Powtórzono punkt 2.3.7. oraz 2.3.9.
- 2.3.11. Mikrokolumny usunięto, a oczyszczone DNA z przesączu poddano dalszej analizie.

## **2.4. Genomic Micro AX BLOOD Gravity**

Jest to zestaw kolumnkowy, który nie wymaga użycia wirówki, pozwalający na wykonanie 100 izolacji. Proces izolacji DNA z krwi zachodzi pod wpływem siły

grawitacji, która powoduje przejście lizatu przez kolumny Micro AXD, dlatego metoda jest bardziej czasochłonna. Gotowe kolumny, próbki odbieralnikowe oraz niezbędne roztwory zawarte są w zestawie. Kluczowym etapem mającym wpływ na wydajność izolacji DNA jest intensywne worteksowanie po etapie inkubacji [20].

Kolejno przeprowadzono czynności:

- 2.4.1. Rozmrożoną krew poddano zworteksowaniu i odpipetowano 100  $\mu$ l do próbki eppendorfa, dodano 400  $\mu$ l buforu lizującego LSU oraz 20  $\mu$ l Proteiny K, całość zworteksowano przez 5 sekund i inkubowano w temp. 50°C przez 10 minut. Podczas inkubacji worteksowano co 2 minuty przez 5 sekund.
- 2.4.2. Kolumny Micro AXD dokładnie zamocowano do próbek odbieralnikowych i umieszczono w pozycji pionowej w statywie. Następnie na kolumny naniesiono po 500  $\mu$ l roztworu równoważącego K1. Tak, aby uniknąć zablokowania przepływu przez bąbelki powietrza.
- 2.4.3. Po inkubacji intensywnie zworteksowano przez 2 minuty (kluczowy etap dla wydajności izolacji DNA).
- 2.4.4. Próbki wirowano przez 10 sekund przy około 8 000 obr./min aby usunąć resztki materiału z wieczek próbek.
- 2.4.5. Po wirowaniu naniesiono próbki na zrównoważone uprzednio kolumny Micro AXD. Oczekano około 10 minut aż lizat przejdzie przez kolumny pod wpływem sił grawitacji.
- 2.4.6. Na kolumny naniesiono po 600  $\mu$ l pierwszego roztworu płuczącego W1G. Poczekano aż roztwór wypłynie z kolumn Micro AXD.
- 2.4.7. Dodano po 500  $\mu$ l drugiego roztworu płuczącego W2, następnie poczekano aż wypłynie z kolumn.

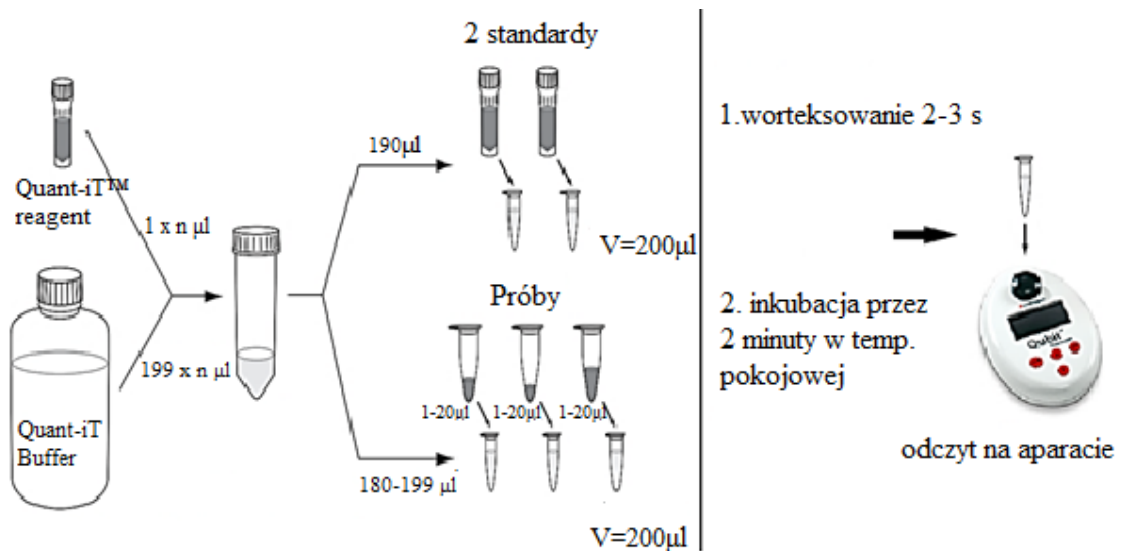
- 2.4.8. Dodano do kolumn po 60  $\mu\text{l}$  roztworu elucyjnego E i odczekano 5 minut.
- 2.4.9. Przygotowano próbki elucyjne, na ich dno naniesiono po 5  $\mu\text{l}$  buforu zobojętniającego N.
- 2.4.10. Kolumny Micro AXD przeniesiono do przygotowanych próbek elucyjnych.
- 2.4.11. Na kolumny naniesiono po 120  $\mu\text{l}$  roztworu elucyjnego E. Odczekano 10 minut, aż roztwór całkowicie wypłynie z kolumn.
- 2.4.12. Usunięto kolumny i zamknięto próbki elucyjne z roztworem zawierającym DNA.

### **3. Pomiar wyizolowanego DNA.**

Do pomiaru stężenia DNA w próbach użyto fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS DNA Kit w oparciu o metodę fluorymetryczną (Rycina 6). Do oznaczeń użyto po 5  $\mu\text{l}$  badanych prób. W przypadku uzyskania wyniku powyżej zakresu pomiarowego aparatu ( $>100$  ng/  $\mu\text{l}$ ) wykonano pomiary ponownie po zmodyfikowaniu procedury badawczej, z wykorzystaniem dziesięciokrotnie mniejszej objętości próby. Modyfikację procedury zastosowano w próbach 1.8a oraz 1.10a w metodzie Sherlock AX. Do próbek dodano odpowiednią objętość buforu zawierającego fluoroforowy reagent tak, by całkowita końcowa objętość mieszaniny wynosiła 200  $\mu\text{l}$ . Schemat postępowania pomiarowego przedstawiono na Rycinie 7.



**Rycina 6.** Fluorymetr Qubit służący do pomiaru stężenia wyizolowanego DNA.



**Rycina 7.** Schemat postępowania pomiarowego z użyciem zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit [21].

Pomiary dokonano w oparciu o dwa wzorce zawarte w zestawie, o stężeniach odpowiednio 0 ng/µl i 10 ng/µl. Do obliczenia stężenia DNA w badanych próbach wykorzystano wzór:

$$\text{Stężenie DNA [ng/}\mu\text{l]} = \text{odczyt pomiaru [ng/}\mu\text{l]} \times \frac{200 [\mu\text{l}]}{\text{objętość badanej próby [\mu\text{l}]}}$$

#### 4. Precyzja uzyskanych wyników.

Na podstawie uzyskanych wyników oceniono istotny parametr statystyczny, który charakteryzuje metodę, tj. **precyzję metody**. Jest to stopień zgodności między niezależnymi wynikami uzyskanymi w serii oznaczeń w trakcie analizy danej próbki. Składają się na nią powtarzalność i odtwarzalność, których analizę przeprowadzono w zakresie wykonanych oznaczeń. Odtwarzalność oceniono zestawiając wyniki uzyskane w I dniu pomiarowym z wynikami uzyskanymi w II dniu pomiarowym. Ocenę powtarzalności dokonano w oparciu o obliczenie wartości odchylenia standardowego (SD) oraz standardowego błędu średniej (SE). SD jest miarą rozrzutu wyników pomiarów wokół wartości średniej. Natomiast wartość SE oblicza się na podstawie wartości SD po podstawieniu do wzoru:

Standardowy błąd średniej (SE) obliczono według wzoru:

$$SE = SD / \sqrt{N}$$

gdzie, SD- odchylenie standardowe

N- liczba pomiarów

Przyjęto, że graniczna wartość parametru SD, przy jakiej pomiary uznać można za powtarzalne wynosi 0,2, natomiast graniczna wartość standardowego błędu średniej wynosi 0,1. Wartości SD powyżej 0,2 oraz SE powyżej 0,1 wskazywały na znaczny rozrzut wyników wokół średniej i tym samym na ich mniejszy stopień powtarzalności [22].

## IV. Wyniki i omówienie.

Wyniki oznaczeń stężeń DNA z próby krwi o objętości 100  $\mu$ l po izolacji przeprowadzonej w oparciu o cztery niezależne metody zestawiono w tabelach 2-5. Dla każdej metody zestawiono pomiary w dwóch kolejnych tabelach. Pierwsza zawierała wyniki pomiarów stężeń uzyskanych w I dniu pomiarowym, tzn. wykonywanych zaraz po skończonej procedurze izolacji. Wykonano w tym dniu pomiary w dwóch powtórzeniach oznaczone kolejno jako seria 1 i 2. Druga natomiast zawiera wyniki uzyskane w II dniu pomiarowym, tj. po kilkudniowym zamrożeniu i ponownym rozmrożeniu prób. Pomiary z tego dnia przeprowadzone w dwóch powtórzeniach oznaczone zostały jako serie 3 i 4. Tabele zestawiają również wartości wyliczonej średniej zmierzonych stężeń i parametry mierzące rozrzut wyników wokół średniej, tj. odchylenie standardowe (SD) oraz standardowy błąd średniej (SE).

W pierwszym etapie analizy oceniono precyzję przeprowadzonego procesu izolacji DNA, dla każdej z badanych 4 metod. Do tego celu przeprowadzono analizę jej powtarzalności i odtwarzalności.

Powtarzalność określa precyzję wyników uzyskanych z pomiarów przeprowadzonych przez tę samą osobę w tych samych warunkach pomiarowych (określone laboratorium, analityk, przyrząd pomiarowy, odczynniki). Może być charakteryzowana ona za pomocą odchylenia standardowego, wariancji, względnego odchylenia standardowego lub współczynnika zmienności. W przeprowadzonych badaniach oceniono na podstawie dwu serii pomiarowych wykonanych w I dniu pomiarowym oraz niezależnie na podstawie dwu serii pomiarowych wykonanych w II dniu pomiarowym.

Do pomiaru stężeń użyto zestawu Quant-iT HS dsDNA, gdyż jest wysoce selektywny, ma dużą tolerancję na wszelkie zanieczyszczenia, jest szybki i łatwy w obsłudze oraz można w nim użyć małych objętości próby. Jest dzięki temu



częściej stosowany niż metoda spektrofotometryczna, oparta o pomiar absorbancji UV, dla której wyniki są mniej dokładne i mniej precyzyjne [23].

Czerwonym kolorem zaznaczono wyniki przekraczające przyjętą graniczną wartość parametrów istotnych do oceny powtarzalności, tj.  $>0,2$  dla wartości odchylenia standardowego (SD) oraz  $>0,1$  dla standardowego błędu średniej (SE). Pomiary wykonane w I dniu pomiarowym oznaczono literą „a”, natomiast przeprowadzone po kilkudniowym zamrożeniu i rozmrożeniu w II dniu pomiarowym oznaczono literą „b”.

Analiza parametrów zestawionych w tabelach 2-3 pozwoliła na ocenę powtarzalności metody Sherlock AX kolejno w I i II dniu pomiaru.

Analiza parametrów zestawionych w tabelach 4-5 pozwoliła na ocenę powtarzalności metody Genomic Mini AX BLOOD kolejno w I i II dniu pomiaru.

Analiza parametrów zestawionych w tabelach 6-7 pozwoliła na ocenę powtarzalności metody Genomic Micro Cell&Tissue kolejno w I i II dniu pomiaru.

Analiza parametrów zestawionych w tabelach 8-9 pozwoliła na ocenę powtarzalności metody Mini AX BLOOD Gravity kolejno w I i II dniu pomiaru.

Tabela 2a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Sherlock AX w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).

		I dzień pomiaru			
Metoda	Próba	1 pomiar st. DNA [ng/ul]	2 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Sherlock AX	1.1a	22,80	22,80	0,000	0,000
	1.2a	16,04	16,10	0,042	0,030
	1.3a	21,60	22,00	0,283	0,200
	1.4a	19,20	19,00	0,141	0,100
	1.5a	16,20	16,90	0,495	0,350
	1.6a	17,24	17,36	0,085	0,060
	1.7a	18,08	18,36	0,198	0,140
	1.8a	19,60	22,00	1,697	1,200
	1.9a	19,20	19,80	0,424	0,300
	1.10a	19,20	21,40	1,556	1,100
średnia		18,92	19,57	0,490	0,350

Tabela 2b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Sherlock AX w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).

		II dzień pomiaru			
Metoda	Próba	3 pomiar st. DNA [ng/ul]	4 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Sherlock AX	1.1b	21,40	21,20	0,141	0,100
	1.2b	15,83	15,60	0,163	0,115
	1.3b	20,80	21,00	0,141	0,100
	1.4b	18,54	18,50	0,028	0,020
	1.5b	16,10	16,10	0,000	0,000
	1.6b	16,84	16,99	0,106	0,075
	1.7b	17,10	16,70	0,283	0,200
	1.8b	17,90	17,76	0,099	0,070
	1.9b	18,32	18,90	0,410	0,290
	1.10b	18,30	19,00	0,495	0,350
średnia		18,11	18,18	0,187	0,132

Tabela 3a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Mini AX BLOOD w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).

		I dzień pomiaru			
Metoda	Próba	1 pomiar st. DNA [ng/ul]	2 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Genomic Mini AX BLOOD	2.1a	18,50	18,70	0,141	0,100
	2.2a	18,40	18,80	0,283	0,200
	2.3a	18,60	18,70	0,071	0,050
	2.4a	13,00	13,20	0,141	0,100
	2.5a	18,40	18,20	0,141	0,100
	2.6a	19,90	20,00	0,071	0,050
	2.7a	16,30	16,40	0,071	0,050
	2.8a	15,80	15,90	0,071	0,050
	2.9a	18,90	18,90	0,000	0,000
	2.10a	21,00	21,00	0,000	0,000
średnia		17,88	17,98	0,100	0,070

Tabela 3b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Mini AX BLOOD w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).

		II dzień pomiaru			
Metoda	Próba	3 pomiar st. DNA [ng/ul]	4 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Genomic Mini AX BLOOD	2.1b	17,30	17,96	0,467	0,330
	2.2b	17,04	17,43	0,276	0,195
	2.3b	18,03	18,30	0,191	0,135
	2.4b	11,90	12,30	0,283	0,200
	2.5b	17,30	17,36	0,042	0,030
	2.6b	18,85	18,98	0,092	0,065
	2.7b	16,30	15,42	0,622	0,440
	2.8b	15,71	15,24	0,332	0,235
	2.9b	18,34	18,10	0,170	0,120
	2.10b	20,70	20,59	0,078	0,055
średnia		17,15	17,17	0,260	0,180

Tabela 4a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Micro Cell&Tissue w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).

		I dzień pomiaru			
Metoda	Próba	1 pomiar st. DNA [ng/ul]	2 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Genomic Micro Cell&Tissue	3.1a	6,23	6,26	0,021	0,015
	3.2a	10,20	10,10	0,071	0,050
	3.3a	11,80	11,80	0,000	0,000
	3.4a	14,40	14,20	0,141	0,100
	3.5a	5,79	5,82	0,021	0,015
	3.6a	15,40	15,30	0,071	0,050
	3.7a	12,10	12,20	0,071	0,050
	3.8a	9,55	9,73	0,127	0,090
	3.9a	11,30	11,50	0,141	0,100
	3.10a	12,10	12,30	0,141	0,100
średnia		10,89	10,92	0,080	0,060

Tabela 4b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Micro Cell&Tissue w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).

		II dzień pomiaru			
Metoda	Próba	3 pomiar st. DNA [ng/ul]	4 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Genomic Micro Cell&Tissue	3.1b	6,08	6,11	0,021	0,015
	3.2b	9,58	9,66	0,057	0,040
	3.3b	11,02	11,20	0,127	0,090
	3.4b	13,36	14,10	0,523	0,370
	3.5b	6,07	5,41	0,467	0,330
	3.6b	14,84	15,12	0,198	0,140
	3.7b	12,10	11,58	0,368	0,260
	3.8b	9,33	9,47	0,099	0,070
	3.9b	10,59	10,67	0,057	0,040
	3.10b	12,03	12,14	0,078	0,055
średnia		10,50	10,55	0,200	0,140

Tabela 5a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Mini AX BLOOD Gravity w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).

		I dzień pomiaru			
Metoda	Próba	1 pomiar st. DNA [ng/ul]	2 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Mini AX BLOOD Gravity	4.1a	19,30	19,40	0,071	0,050
	4.2a	19,20	19,30	0,071	0,050
	4.3a	19,40	19,50	0,071	0,050
	4.4a	21,00	21,00	0,000	0,000
	4.5a	23,00	23,00	0,000	0,000
	4.6a	21,00	21,20	0,141	0,100
	4.7a	22,00	22,00	0,000	0,000
	4.8a	17,90	17,80	0,071	0,050
	4.9a	18,50	18,70	0,141	0,100
	4.10a	23,00	23,00	0,000	0,000
średnia		20,43	20,49	0,060	0,040

Tabela 5b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Mini AX BLOOD Gravity w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).

		II dzień pomiaru			
Metoda	Próba	3 pomiar st. DNA [ng/ul]	4 pomiar st. DNA [ng/ul]	SD	SE
Mini AX BLOOD Gravity	4.1b	19,01	19,21	0,141	0,100
	4.2b	18,95	19,02	0,049	0,035
	4.3b	19,00	18,78	0,156	0,110
	4.4b	20,62	20,74	0,085	0,060
	4.5b	22,84	22,46	0,269	0,190
	4.6b	20,69	20,81	0,085	0,060
	4.7b	21,89	21,85	0,028	0,020
	4.8b	17,80	17,63	0,120	0,085
	4.9b	18,36	18,40	0,028	0,020
	4.10b	22,88	22,80	0,057	0,040
średnia		20,20	20,17	0,100	0,070

W metodzie Sherlock AX aż w 5 próbach z I dnia pomiaru wartość odchylenia standardowego była powyżej granicznej wartości. W II dniu pomiarowym w 3 próbach także przekroczono tę wartość. W 5 próbach w I dniu pomiarowym oraz w 4 próbach w II dniu pomiaru przekroczono także graniczną wartość standardowego błędu średniej. Świadczy to o niskiej powtarzalności uzyskanej w oparciu o metodę Sherlock AX.

W metodzie Genomic Mini AX BLOOD w I dniu tylko w jednej próbie przekroczona została graniczna wartość SD. Natomiast w II dniu pomiarowym było najwięcej wartości przekraczających graniczną wartość odchylenia standardowego oraz standardowego błędu średniej. Świadczy to o negatywnym wpływie kilkudniowego zamrożenia próbki na uzyskany wynik i związanego z tym faktem istotnego spadku powtarzalności.

Kolejna wykorzystana do izolacji metoda, tj. Genomic Micro Cell&Tissue daje jeszcze lepszą niż poprzednia metoda powtarzalność. W I dniu pomiarowym uzyskano 100% wartości SD i SE poniżej poziomów granicznych co świadczy o niskim rozrzucie wyników. Istotny spadek powtarzalności uzyskano natomiast w II dniu pomiarowym, po rozmrożeniu prób. Metodę tę cechuje kilkakrotne wirowanie przy 12 000 obr./min., co skutkowało uzyskaniem najmniejszej ilości DNA w zestawieniu z pozostałymi metodami. Odznacza się ona tym samym najmniejszą efektywnością izolacji DNA.

W metodzie Mini AX BLOOD Gravity, czyli w której podczas procedury izolacji DNA nie stosuje się wirowania, uzyskano zerowe wartości odchylenia standardowego oraz standardowego błędu średniej lub ich niskie wartości, odpowiednio  $<0,2$  (SD) i  $<0,1$  (SE). Wskazuje to na bardzo wysoką powtarzalność przeprowadzonych pomiarów. Tylko w 1 próbie w II dniu pomiarowym uzyskano wartość powyżej wartości granicznej oraz w 2 próbach z II dnia po zamrożeniu i rozmrożeniu wartości standardowego błędu średniej wynosiły  $>0,1$ . Pomimo tego metoda ta daje najwyższe wskaźniki powtarzalności w zestawieniu z innymi badanymi.

W świetle uzyskanych wyników kolejno powtarzalność jest coraz niższa dla: Mini AX BLOOD Gravity, Genomic Micro Cell&Tissue, Genomic Mini AX BLOOD i na końcu dla Sherlock AX. We wszystkich metodach powtarzalność spada w II dniu pomiarów, tzn. po rozmrożeniu prób.

Odtwarzalność opisuje precyzję wyników uzyskanych przez różnych analityków lub w pewnym odstępie czasowym z zastosowaniem danej metody pomiarowej. W tym przypadku poddano ocenie wyniki z pierwszego dnia pomiaru w odniesieniu do wyników z drugiego dnia pomiaru.

W tabelach 6-9 zestawiono sumę odchyłeń standardowych dla każdej z 4 badanych metod. Kolorem żółtym zaznaczone są zsumowane wartości SD po I dniu pomiaru oraz II dniu pomiaru, natomiast kolorem fioletowym zaznaczona jest ich wartość średnia.

Analiza tabel 6-9 pozwoliła na ocenę odtwarzalności przeprowadzanych badań. Na podstawie uzyskanych wyników zauważamy, iż większy rozrzut w pomiarach jest w II dniu pomiarowym. Wyjątek stanowi metoda Sherlock AX, gdzie w II dniu otrzymaliśmy mniejszy rozrzut wyników, co może być związane z lepszym rozpuszczeniem DNA po dłuższym czasie od momentu izolacji pozwalającym na uzyskanie lepszej homogenizacji prób DNA.

Do oceny efektywności wybranych metod izolacji DNA zestawiono średnie stężenie DNA uzyskane na podstawie pomiaru wyizolowanego DNA czterema różnymi metodami kolejno: w I dniu pomiarowym, w II dniu pomiarowym, w I i II dniu pomiarowym.

Tabela 6. Odchylenia standardowe w metodzie Sherlock AX.

Sherlock AX	
I dzień pomiaru	II dzień pomiaru
suma średnich SD po 1 i 2 pomiarze	suma średnich SD po 3 i 4 pomiarze
0,492	<b>0,187</b>
0,339	

Tabela 7. Odchylenia standardowe w metodzie Genomic Mini AX BLOOD.

Genomic Mini AX BLOOD	
I dzień pomiaru	II dzień pomiaru
suma średnich SD po 1 i 2 pomiarze	suma średnich SD po 3 i 4 pomiarze
0,099	0,255
0,177	

Tabela 8. Odchylenia standardowe w metodzie Genomic Micro Cell&Tissue.

Genomic Micro Cell&Tissue	
I dzień pomiaru	II dzień pomiaru
suma średnich SD po 1 i 2 pomiarze	suma średnich SD po 3 i 4 pomiarze
0,081	0,199
0,140	

Tabela 9. Odchylenia standardowe w metodzie Mini AX BLOOD Gravity.

Mini AX BLOOD Gravity	
I dzień pomiaru	II dzień pomiaru
suma średnich SD po 1 i 2 pomiarze	suma średnich SD po 3 i 4 pomiarze
0,057	0,139
0,098	



Tabela 10. Zestawienie średnich stężeń wyizolowanego ludzkiego jądrowego DNA z wykorzystaniem 4 badanych metod.

Metoda	I dzień pomiarowy		II dzień pomiarowy	
	st. DNA 1 pomiaru [ng/ul]	st. DNA 2 pomiaru [ng/ul]	st. DNA 3 pomiaru [ng/ul]	st. DNA 4 pomiaru [ng/ul]
Sherlock AX	18,92	19,57	18,11	18,18
średnie stężenie	19,24		18,14	
średnie stężenie	18,69 ng/ul			
spadek st. DNA I vs II dzień pomiarowy	5,72 %			
Genomic Mini AX BLOOD	17,88	17,98	17,15	17,17
średnie stężenie	17,93		17,16	
średnie stężenie	17,54 ng/ul			
spadek st. DNA I vs II dzień pomiarowy	4,31 %			
Genomic Micro Cell&Tissue	10,89	10,92	10,50	10,55
średnie stężenie	10,90		10,52	
średnie stężenie	10,71 ng/ul			
spadek st. DNA I vs II dzień pomiarowy	3,49 %			
Mini AX BLOOD Gravity	20,43	20,49	20,20	20,17
średnie stężenie	20,46		20,19	
średnie stężenie	20,32 ng/ul			
spadek st. DNA I vs II dzień pomiarowy	1,33 %			

Analiza średnich zestawionych w tabeli 10 wskazuje na to, iż metodą o najniższej efektywności izolacji DNA jest Genomic Micro Cell&Tissue. Średnia wyizolowanego ludzkiego jądrowego DNA dla dziesięciu prób wynosi zaledwie 10,71 ng/ $\mu$ l. Istotnymi etapami tej metody są liczniejsze niż w przypadku innych metod, etapy wirowania przy wysokich obrotach, co wskazuje na związek wirowania wysokoobrotowego ze spadkiem ilości uzyskanego DNA.

O tym, iż wirowanie zmniejsza wydajność procesu izolacji DNA świadczy fakt iż, metodą o najwyższej wydajności jest Mini AX BLOOD Gravity. W tej metodzie nie stosuje się wirowania. Uzyskano tu średnie stężenie wyizolowanego DNA 20,32 ng/ $\mu$ l, tj. niemal dwukrotnie więcej niż w metodzie Genomic Micro Cell&Tissue, z zastosowaniem wysokoobrotowego wirowania.

Drugą metodą pod względem stopnia najwyższej efektywności izolacji DNA jest Sherlock AX. W tej metodzie uzyskaliśmy DNA o średnim stężeniu 18,69 ng/ $\mu$ l. Co prawda w metodzie tej dwukrotnie wiruje się przy najwyższych obrotach, ale z kolei etap wytrącania, który nie występuje w innych metodach, znacząco wpływa na lepszy odzysk DNA.

Trzecią metodą pod względem efektywności izolacji DNA jest Genomic Mini AX BLOOD. W tym przypadku średnio uzyskaliśmy 17,54 ng/ $\mu$ l ludzkiego jądrowego DNA.

Jak wynika z zestawienia średnich wartości stężeń uzyskanych w I i II dnia pomiarowym zamrażanie prób oraz ich ponowne rozmrażenie wpływa na uzyskany wynik. Średnio odnotowano 3,5% spadek stężenia DNA na skutek tego biorąc pod uwagę wszystkie 4 badane metody. Największy spadek był obserwowany dla metody Sherlock AX, a następnie Genomic Mini AX BLOOD, Genomic Micro Cell&Tissue. Najmniejszy spadek zanotowano dla metody Mini AX BLOOD Gravity, co świadczy o najmniejszym wpływie zamrożenia i odmrożenia na degradację DNA uzyskanego w oparciu o tę metodę.

## V. Wnioski

W oparciu o przeprowadzone wyniki badań, których celem była ocena efektywności czterech niezależnych metod izolacji DNA w badaniach genetyczno-sądowych, można wywnioskować, że:

1. Metodą o najwyższej powtarzalności jest metoda Mini AX BLOOD Gravity, potem kolejno Genomic Micro Cell&Tissue, Genomic Mini AX BLOOD i na końcu Sherlock AX. W tej ostatniej metodzie niski poziom powtarzalności należy wiązać z niepełnym rozpuszczeniem DNA, który został wcześniej wytrącony z roztworu. Jest to etap końcowy stosowany wyłącznie w tej metodzie izolacji w odróżnieniu od 3 pozostałych metod, gdzie DNA przechodzi bezpośrednio do roztworu.
2. Metodą o najwyższej precyzji odtwarzalności jest także metoda Mini AX BLOOD Gravity, potem kolejno Genomic Micro Cell&Tissue, Genomic Mini AX BLOOD i na końcu Sherlock AX.
3. Pod względem efektywności izolacji można uszeregować kolejno metody od dającej największą ilość DNA, tj. Genomic Micro AX Blood Gravity, poprzez metodę Sherlock AX, Genomic Mini AX BLOOD, do metody Genomic Micro Cell&Tissue o najniższym odzysku DNA.
4. Proces wysokoobrotowego wirowania w znacznym stopniu obniża efektywność izolacji, co skutkuje niższą ilością DNA przydatnego w dalszych etapach analizy genetyczno-sądowej.
5. Proces zamrożenia i rozmrożenia wpływa również na obniżenie stężenia uzyskanego DNA, co jest spowodowane jego stopniową degradacją. W związku z tym śladowe ilości DNA należy poddawać procesowi amplifikacji niezwłocznie po etapie izolacji.

## VI. Streszczenie

Proces izolacji DNA jest kluczowym etapem w toku analizy materiału genetycznego przeprowadzanej podczas badań z zakresu genetyki sądowej. Zastosowana metoda izolacji wpływa na uzyskane stężenia kwasów nukleinowych. Do oceny efektywności metody konieczna jest jej walidacja oraz standaryzacja.

W niniejszej pracy określano, która z czterech niezależnych metod izolacji DNA z wykorzystaniem kolumnienek charakteryzuje się najwyższą powtarzalnością, odtwarzalnością oraz efektywnością w procesie izolacji DNA. Do oceny powtarzalności posłużono się wynikami pomiarów stężeń z 1 i 2 serii pomiarów oraz z 3 i 4 serii pomiarów. Odtwarzalność oceniono poprzez zestawienie wyników z I dnia pomiarowego z wynikami uzyskanymi z II dnia pomiarowego. Natomiast przy ocenie efektywności metod posłużono się porównaniem średnich stężeń w oparciu uzyskanych w oparciu o cztery badane metody.

Z przeprowadzonych badań wynika, że metodą o najwyższej powtarzalności i odtwarzalności, a także efektywności jest Mini AX BLOOD Gravity. Całkowity brak wirowania pozwolił na uzyskanie wyższego stężenia DNA, niż w przypadku pozostałych 3 metod z wielokrotnymi etapami wirowania.

Zestawienie wyników z I i II dnia pomiarowego wskazuje na to, że zamrażanie i rozmrażanie zmniejsza ilość uzyskanego DNA w każdej z czterech badanych metod. W przypadku śladowej ilości DNA wskazane jest zatem poddawanie dalszym etapom analizy genetyczno-sądowej badanych prób w krótkim czasie od zakończenia procesu izolacji, bez etapu dłuższego ich przechowywania.

## VII. Piśmiennictwo

1. Bond J.W.: Value of DNA evidence in detecting crime. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 128-136
2. Basgalupp S.P., Rodenbusch R., Schumacher S., Gastaldo A.Z., Silva D., Alho C.S.: Investigation of paternity with alleged father deceased or missing: Analysis of success at the end of the report. *Forensic Sci. Int.Genet.* 2014, 12, 120-121
3. El-Alfy S.H., El-Hafez Abd A.F.: Paternity testing and forensic typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. *J. Genetic Engineering and Biotechnology* 2012, 10, 101-112
4. Jeffreys A., Wilson V. Thein, S.: Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* 1985, 314 (6006): 67–73.
5. Jeffreys A., Wilson V., Thein, S., Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 1985, 316 (6023): 76–79.
6. Mullis K.F., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986, 51, 263–273.
7. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987, 155, 335-350.
8. Butler J.M.: Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. *J. Forensic Science.* 2006, 51, 253-265
9. Ruitberg Ch.M., Reeder D.J., Butler J.M.: STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *N. Acids Research* 2001, 29, 320-322.
10. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.: DNA typing and geneticmapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *The American J. of Human Genetics* 1991, 49, 746-756.

11. Senge T., Madea B., Junge A., Rothschild M.A., Schneider P.M.: STRs, mini STRs and SNPs- A comparative study for typing degraded DNA. *Legal Med.* 2011, 13, 68-74
12. Butler M. J.: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.* Academic Press 2009
13. Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. *Metody analizy danych. Biotechnologia* 2008, 1, 86-96.
14. Pasternak K., Brzezińska J., Kurzyńska-Kokorniak A., Wojciech T. Markiewicz, Chmielewski M.: Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w badaniu kwasów nukleinowych. *Instytut Chemii Bioorganicznej PAN*
15. Branicki W., Kupiec T., Wolańska-Nowak P.: *Badania DNA dla celów sądowych.* Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych 2008.
16. Kłyszewko-Stefanowicz L.: *Ćwiczenia z biochemii.* Wydawnictwo Naukowe PWN 2003, 366-381.
17. A&A Biotechnology: Sherlock AX. Uniwersalny zestaw do izolacji DNA ze śladów biologicznych oraz trudnych prób, Nr kat. 095-25, 095-100.
18. A&A Biotechnology: Genomic Mini AX BLOOD (SPIN). Zestaw do izolacji genomowego DNA, Nr kat. 052-100S03.
19. A&A Biotechnology: Genomic Micro Cell&Tissue. Zestaw do izolacji DNA z małych próbek, Nr kat. 090-50.
20. A&A Biotechnology: Genomic Micro AX Blood Gravity. Zestaw do izolacji DNA z krwi, Nr kat. 101-100
21. Life Technologies: Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. *Instruction Manual* 2015.
22. Rajda A.: Proces walidacji metody pomiarowej jako przykład zastosowania statystycznej kontroli jakości z zastosowaniem pakietu Statistica. *Zastosowania metod statystycznych w badaniach naukowych IV.* StatSoft Polska 2012.
23. Life Technologies: Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements Qubit™ Quantitation Platform vs. Spectrophotometer. *Technical Note* 2010

## VII. Spis tabel i rycin

### Spis rycin:

Rycina 1. Etapy przebiegu standardowej ekspertyzy w zakresie genetyki sądowej.	7
Rycina 2. Schemat izolacji kwasów nukleinowych metodą fenolową.....	10
Rycina 3. Schemat izolacji kwasów nukleinowych metodą solną.....	11
Rycina 4. Schemat izolacji kwasów nukleinowych metoda magnetyczną.....	12
Rycina 5. Schemat izolacji DNA metoda kolumnkową.....	12
Rycina 6. Fluorymetr Qubit służący do pomiaru stężenia wyizolowanego DNA..	22
Rycina 7. Schemat postępowania pomiarowego z użyciem zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit.....	22

### Spis tabel:

Tabela 1. Testy specyficzne i niespecyficzne dla różnych śladów biologicznych.....	7
Tabela 2a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Sherlock AX w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).....	26
Tabela 2b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Sherlock AX w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).....	26
Tabela 3a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Mini AX BLOOD w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).....	27
Tabela 3b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Mini AX BLOOD w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).....	27
Tabela 4a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Micro Cell&Tissue w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).....	28

Tabela 4b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Genomic Micro Cell&Tissue w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).....	28
Tabela 5a. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Mini AX BLOOD Gravity w I dniu pomiaru (seria „a” pomiarów).....	29
Tabela 5b. Zestawienie wyników dwukrotnie powtórzonych pomiarów stężeń DNA wyizolowanego metodą Mini AX BLOOD Gravity w II dniu pomiaru (seria „b” pomiarów).....	29
Tabela 6. Odchylenia standardowe w metodzie Sherlock AX.....	32
Tabela 7. Odchylenia standardowe w metodzie Genomic Mini AX BLOOD.....	32
Tabela 8. Odchylenia standardowe w metodzie Genomic Micro Cell&Tissue.....	32
Tabela 9. Odchylenia standardowe w metodzie Mini AX BLOOD Gravity.....	32
Tabela 10. Zestawienie średnich stężeń wyizolowanego ludzkiego jądrowego DNA z wykorzystaniem 4 badanych metod.....	33



## IX. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy

CCD	(ang. <i>Charge Coupled Device</i> ) – kamera CCD
CODIS	(ang. <i>Combined DNA Index System</i> ) – system CODIS
DNA	(ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> ) – kwas deoksyrybonukleinowy
FBI	(ang. <i>Federal Bureau of Investigation</i> ) – Federalne Biuro Śledcze
PCR	(ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) – łańcuchowa reakcja Polimerazy
RFLP	(ang. <i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> ) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
SNP	(ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ) – polimorfizm pojedynczych nukleotydów
STR	(ang. <i>Short Tandem Repeats</i> ) – krótkie sekwencje tandemowych powtórzeń
SD	(ang. <i>Standard Deviation</i> ) – odchylenie standardowe
VNTR	(ang. <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> ) – zmienna liczba tandemowych powtórzeń

# O Ś W I A D C Z E N I E

Ja niżej podpisana

**Sylwia Majchrzak**

**studentka Wydziału Farmaceutycznego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**oświadczam, że przedkładaną pracę magisterską pt.**

**„OCENA EFEKTYWNOŚCI WYBRANYCH METOD IZOLACJI DNA W  
GENETYCE SĄDOWEJ”**

**przygotowaną pod kierunkiem dr hab. n. med. Renaty Jacewicz**

**napisałam samodzielnie.**

*Oznacza to, że przy pisaniu pracy, poza niezbędnymi konsultacjami, nie korzystałam/am z pomocy innych osób, a w szczególności nie zlecałam/am opracowania rozprawy lub jej istotnych części innym osobom, ani też nie odpisywałam/am tej rozprawy lub jej istotnych części od innych osób.*

Pracę opracowano zgodnie z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych  
(t.j. Dz.U. 2006 nr 90 poz. 631 ze zm.)

*Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.*

**Łódź, dnia 31.01.2017**

.....

**Podpis magistranta**