

Procjena djelotvornosti dvaju protokola za izolaciju DNA iz krvi i bukalne sluznice primjenom Qubit fluorometra i qPCR uređaja

Jakšić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:055072>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Jelena Jakšić

**PROCJENA DJELOTVORNOSTI
DVAJU PROTOKOLA ZA IZOLACIJU
DNA IZ KRVI I BUKALNE SLUZNICE
PRIMJENOM QUBIT FLUOROMETRA
I QPCR UREĐAJA**

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Jelena Jakšić

**PROCJENA DJELOTVORNOSTI
DVAJU PROTOKOLA ZA IZOLACIJU
DNA IZ KRVI I BUKALNE SLUZNICE
PRIMJENOM QUBIT FLUOROMETRA
I QPCR UREĐAJA**

Završni rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Stana Tokić.

Rad ima 28 listova, 2 tablice i 7 slika.

Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na ogromnoj pomoći i strpljenju pri izradi ovog rada.

Zahvale Ivani Jelavić na pomoći tijekom rada u laboratoriju.

Također, zahvale obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. DNA molekula	1
1.2. Analiza DNA	2
1.2.1. Izolacija DNA	2
1.2.2. Mjerenje koncentracije DNA	3
1.2.3. Poteškoće pri analizi	6
2. CILJEVI	8
3. MATERIJAL I METODE	9
3.1. Ispitanici	9
3.2. Metode	11
3.2.1. InstaGene™ Matrix	11
3.2.2. QIAamp Mini Kit	11
3.2.3. Mjerenje koncentracije DNA s pomoću komercijalnog kompleta „Qubit HighSensitivity DNA“	12
3.2.4. Mjerenje koncentracije DNA s pomoću komercijalnog kompleta „Quantifiler Human Quantification DNA Kit“	13
3.2.5. Statističke metode	15
4. REZULTATI	16
4.1. Analiza prinosa DNA QUBIT fluorometrom ovisno o uzorku i izboru metode izolacije	16
4.2. Analiza prinosa DNA na QuantStudio 5 PCR uređaju ovisno o uzorku i izboru metode izolacije	17
4.3. Analiza podudarnosti mjerenja koncentracije DNA na QUBIT fluorometru i uređaju QuantStudio 5 PCR	18
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČAK	24
7. SAŽETAK	25

8. SUMMARY	26
9. LITERATURA.....	27
10. ŽIVOTOPIS	29

POPIS KRATICA

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dsDNA – dvolančana DNA (engl. *double stranded DNA*)

dNTP – deoksiribonukleozidni trifosfati

STR – kratka tandemski ponavljanja (engl. *short tandem repeats*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

qPCR – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*)

BI – bris usne sluznice InstaGene Matrix komercijalni kit

BQ – bris usne sluznice Qiagen QIAamp Blood mini komercijalni kit

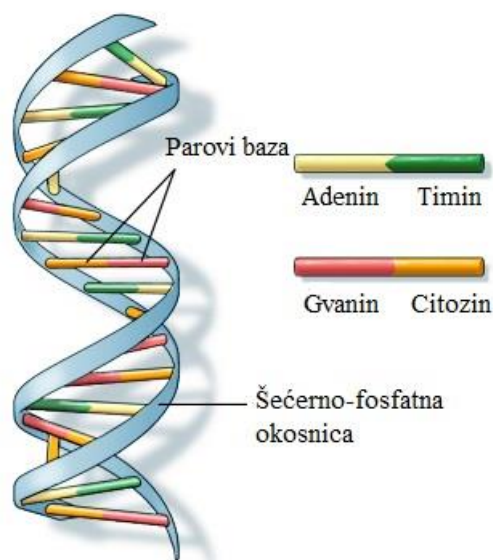
PI – „Punch“ FTA kartice InstaGene Matrix komercijalni kit

PQ – „Punch“ FTA kartice Qiagen QIAamp Blood mini komercijalni kit

1. UVOD

1.1.DNA molekula

Deoksiribonukleinska kiselina jest molekula nasljeđa, dvostruka uzvojnica sastavljena od dvaju antiparalelnih nukleotidnih lanaca u kojima su nasuprotne baze vezane vodikovim vezama (1). Šećerno-fosfatna okosnica nalazi se na vanjskoj strani molekule, a baze su smještene u unutrašnjosti i orijentirane tako da se omogućuje stvaranje vodikovih veza između nasuprotnih pirimidina i purina. Purinske (adenin A, gvanin G) i pirimidinske baze (timin T, citozin C) nose genetičku informaciju, a strukturnu ulogu imaju fosfati i šećeri (2,3). Model dvolančane DNA postavili su Watson, Crick i Wilkins 50-ih godina prošlog stoljeća (Slika 1.). Stabilnost dvostruke uzvojnice osiguravaju vodikove veze, van der Waalsova i hidrofobna privlačenja između komplementarnih nukleotidnih parova, A-T i G-C nukleotidnih baza vezanih dvostrukom, odnosno trostrukom vodikovom vezom. Svaki lanac ima svoju polarnost, pri čemu na 3' kraju DNA lanca nalazimo slobodnu, a na 5' kraju fosfatom esterificiranu hidroksilnu (-OH) skupinu šećera deoksiriboze (1).



Slika 1. Struktura DNA (preuzeto i prilagođeno s izvora na internetu (4))

1.2. Analiza DNA

Analiza DNA uspješno se koristi u svrhu određivanja identiteta osobe pri čemu je izuzetno važna uspješna izolacija genetičkog materijala. Unatoč značajnom napretku metoda i tehnologija za izolaciju DNA, još uvijek postoje poteškoće pri obradi oskudnih ili kontaminiranih bioloških uzoraka. Metode izolacije stoga trebaju biti prilagođene uzorku i osigurati rješenje za nedostatke poput male količine genetičkog materijala, fragmentirane DNA ili prisutnosti onečišćenja koja mogu inhibirati posljedične analitičke procese (5). U forenzičkoj analizi DNA dobiveni DNA izolati najčešće se koriste za analizu kratkih, tetranukleotidnih ponavljanja (STR, prema engl. *short tandem repeat*), koje u različitom broju pronalazimo na različitim humanim kromosomima. STR su popularni DNA biljezi zato što se jednostavno mogu amplificirati lančanom reakcijom polimeraze, visoko su polimorfni u ljudskoj populaciji i stabilno se nasljeđuju (6). Polimorfizam STR biljega temelji se na duljini i broju kratkih oligonukleotidnih ponavljanja koji značajno variraju unutar populacije. Pojedine alelne varijante STR lokusa određene su promjenom broja oligonukleotidnih jedinica (npr. 5 puta ponovljen niz TCTA = alel 5) i čine osnovu genetičkog profila, jedinstvenog za osobu te su stoga primjenjive u forenzičkim, populacijskim i antropološkim studijama (7). Ispitivanjem kratkih tandemskih ponavljanja na 10 ili više genetičkih lokusa moguće je utvrditi DNA profil osobe, a polimorfna priroda STR regija povećava mogućnost razlikovanja različitih DNA profila. Genetički profili sastavljeni od STR biljega mogu se zatim rabiti za vještačenja srodstvenih odnosa, identifikaciju nestalih osoba ili potencijalnih počinitelja kriminalnih djela.

1.2.1. Izolacija DNA

Postoje brojne metode izolacije DNA, koje se ovisno o temeljnom načelu izdvajanja DNA molekule iz biološkog uzorka, mogu podijeliti na afinitetne i neafinitetne metode. Afinitetno izdvajanje podrazumijeva vezanje DNA molekule za čvrstu fazu poput silika kolonice ili magnetskih kuglica, a neafinitetna izolacija primjenom organskih otapala ili soli osigurava izdvajanje DNA od ostalih komponenti stanične smjese (proteini, lipidi) na temelju razlike u gustoći, polarnosti ili topljivosti (8). Osnovni koraci koji se poduzimaju pri izolaciji DNA uključuju razgradnju stanične membrane, inaktivaciju deoksiribonukleaza (DNaza), ispiranje, centrifugiranje i otapanje DNA molekula. U forenzičkim laboratorijima, u svrhu izolacije DNA, najčešće se primjenjuje kombinacija afinitetnih i neafinitetnih metoda, poput komercijalno dostupnih kompleta sa silika kolonicama ili ionsko-izmjenjivačkih smola.

Među njima izrazito je popularna neafinitetna metoda razvijena na temelju primjene Chelex smole, koja osigurava brzu i jednostavnu izolaciju DNA uz minimalan trošak i rizik od kontaminacije tijekom izolacije DNA iz različitih bioloških uzoraka poput krvi, tkiva, dlake ili kosti (9). Anionska izmjenjivačka smola Chelex sastoji se od stiren-divinilbenzenskih polimera i iminodiacetatnih iona koji osiguravaju vezanje polivalentnih metalnih iona i inaktivaciju DNaza (8). Izolacija DNA s pomoću Chelex smole izrazito je pogodna za oskudne količine biološkog materijala, poput dlake ili krvne mrlje. Uzorci se najprije inkubiraju s proteinazom K, a zatim centrifugiranjem razdvajaju na gornju, vodenu fazu u kojoj zaostaje DNA, dok ostale komponente stanične smjese precipitiraju zajedno s česticama smole u donjem sloju (8). Prednosti te metode jesu jednostavnost, brzina i cijena, a nedostaci uključuju rizik od razgradnje DNA pri dužem skladištenju izoliranih uzoraka, moguću inhibiciju PCR-a zbog zaostale smole te manje učinkovitu analizu uzoraka koji su visoko degradirani ili imaju nisku razinu DNA (9).

Često korištena afinitetna metoda za izolaciju DNA primjenom silika kolonice podrazumijeva korištenje komercijalnih kompleta poput QIAamp Mini Kit seta. Taj komercijalni komplet dizajniran je za brzu ekstrakciju DNA bez primjene opasnih kemikalija (5,9). Silica kolone u primjeni, u uvjetima povećane koncentracije soli, visokim afinitetom vežu negativno nabijene molekule DNA (8). Ostaci otapala i nečistoća zatim se uklanjaju serijom ponavljajućih koraka ispiranja i centrifugiranja, a DNA se u konačnici eluira sa silika kolonice primjenom pufera s niskim udjelom soli i povišene pH vrijednosti (8,9).

1.2.2. Mjerenje koncentracije DNA

Mjerenje količine i kvalitete DNA izrazito je važno u svrhu postizanja optimalnih rezultata u forenzičkim analizama.

DNA se može izmjeriti primjenom UV spektrofotometra. Spektrofotometar mjeri količinu zračenja određene valne duljine koju je apsorbirala ispitivana otopina. Lambert-Beerov zakon opisuje ovisnost monokromatskog zračenja o koncentraciji tvari, a prikazuje se jednadžbom:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

gdje je apsorbancija (A) jednaka negativnom logaritmu omjera intenziteta propuštenog (I) i upadnog zračenja (I_0).

Tražena koncentracija nukleinske kiseline može se zatim izračunati primjenom sljedeće jednadžbe:

$$A = \epsilon cL$$

gdje je apsorbancija (A) jednaka umnošku molarnog koeficijenta apsorpcije (ϵ), koncentracije tvari u otopini (c) i duljine puta svjetlosti kroz mjerenu otopinu (L). Osim za određivanje koncentracije, spektrofotometrijska analiza koristi se i za određivanje čistoće izoliranih DNA uzoraka. U tu svrhu ispitivanim uzorcima mjeri se veličina apsorbancije zračenja valne duljine 230 nm, 260 nm i 280 nm. Uzorak se smatra onečišćenim ako su omjeri A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} značajno manji od 2. UV spektroskopija tradicionalna je metoda za kvantitativnu i kvalitativnu analizu nukleinskih kiselina, ali je metoda slabije osjetljiva u uzorcima s niskim udjelom genetičkog materijala (10).

Za mjerenje koncentracije DNA u uzorcima s oskudnom količinom genetičkog materijala često se rabe fluorometrijske metode i pridruženi uređaji poput QUBIT fluorometra. Fluorometrijske metode određuju koncentraciju ciljane molekule mjerenjem intenziteta fluorescencije nakon apsorpcije fotona primijenjenog zračenja. Uređaj na temelju vezanja specifičnih fluorescentnih boja za dsDNA (prema engl. *double stranded DNA*) određuje koncentraciju DNA. QUBIT fluorometar smatra se korisnim za provjeru koncentracije uzorka prije sekvencioniranja nove generacije jer osigurava preciznu kvantifikaciju dsDNA, neovisno o prisutnosti RNA (11). Načelo metode temelji se na specifičnom vezanju fluorescentne boje za nukleinske kiseline te mjerenju emisijskog spektra fluorescentnog zračenja čija je jakost proporcionalna koncentraciji ispitivanog genetičkog materijala u uzorku (9). Emisijsko zračenje niže je energije i veće valne duljine od apsorbiranog zračenja jer se dio energije ulaznih fotona utroši pri interakciji s elektronima ispitivane tvari, pri čemu dolazi do njihova prelaska iz osnovnog singlet stanja u vibracijsko stanje. Pri povratku elektrona u niže energijske razine dolazi do emisije fluorescentnog zračenja koje možemo izmjeriti QUBIT fluorometrom. Za preciznu kvantifikaciju genskog materijala primjenom QUBIT fluorometra koriste se standardni uzorci poznate koncentracije DNA ili RNA, koji služe za izradu standardne krivulje. Standardna krivulja opisuje linearni odnos koncentracije nukleinskih kiselina i veličine fluorescencijskog signala te služi za kvantifikaciju genetičkog materijala u uzorcima nepoznate koncentracije DNA ili RNA. Prednosti mjerenja QUBIT fluorometrom visoka su selektivnost za različite vrste makromolekula, osjetljivost i preciznost mjerenja, posebice u uzorcima izrazito niske koncentracije nukleinskih kiselina. Ipak, metoda nije primjenjiva za analizu kvalitete DNA jer je neosjetljiva na prisutnost PCR inhibitora i pokidanih DNA odsječaka (11).

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*) jedna je od preciznijih i učinkovitijih metoda za kvantifikaciju DNA (9). Lančana reakcija polimeraze omogućuje umnažanje ciljnih sekvenci DNA uporabom specifičnih početnica te PCR smjese koja sadržava termostabilni enzim DNA polimerazu, smjesu četiriju deoksiribunukleozid-trifosfata (dNTP) i PCR pufer s $MgCl_2$, koji je važan za aktivnost DNA polimeraze. Svaki PCR ciklus sastoji se od denaturacije, vezivanja početnica (engl. *annealing*) i elongacije (12). Amplifikacija DNA započinje denaturacijom dsDNA pri 95 °C, nakon čega na nižoj temperaturi dolazi do vezanja početnica za DNA kalup te se na kraju tijekom elongacije pri 72 °C sintetizira novi lanac DNA djelovanjem Taq polimeraze. Višebrojnim ponavljanjem ciklusa dolazi do stvaranja velikog broja ciljnih DNA odsječaka.

Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu temelji se na mjerenju fluorescencijskog signala na kraju elongacije svakog PCR ciklusa. Porast broja kopija umnoženih odsječaka moguće je pratiti primjenom TaqMan proba koje na svom 5' kraju sadrže takozvanu „reporter“ boju, a na 3' kraju „quencher“ boju. TaqMan probe prepoznaju i vežu ciljne sekvence DNA molekule koje se nalaze između veznih mjesta oligonukleotidnih početnica. Na početku PCR ciklusa TaqMan proba ne emitira fluorescentno zračenje jer se „reporter“ i „quencher“ boja nalaze u neposrednoj blizini, na krajevima netaknute TaqMan probe (13). Međutim, tijekom procesa elongacije Taq polimeraza sintetizira novi lanac DNA i s kalupa izrezuje TaqMan probu pri čemu dolazi do emisije fluorescentnog zračenja „reporter“ fluorokroma s 5' kraja probe (14). Razina fluorescencije mjeri se na kraju svakog PCR ciklusa pa je stoga proces amplifikacije ciljnih DNA odsječaka moguće pratiti u stvarnom vremenu. Kvantifikacija DNA qPCR metodom oslanja se dakle na linearni odnos između veličine fluorescentnog signala i količine ciljnih DNA molekula u ispitivanim uzorcima. Taj linearni odnos najbolje se može razlikovati mjerenjem fluorescencije u uzorcima poznate koncentracije DNA, tzv. standardima. Porast fluorescencije proporcionalan je početnoj količini DNA u svakom uzorku standarda, a kvantificira se brojem PCR ciklusa u kojem fluorescentni signal nadmašuje pozadinski signal ili prag fluorescencije, tzv. Ct vrijednost (prema engl. *threshold cycle*) (8). Koncentracija DNA u nepoznatim uzorcima zatim se određuje usporedbom Ct vrijednosti nepoznatih uzoraka s Ct vrijednostima uzoraka poznate DNA koncentracije.

Učinkovitost PCR reakcije može se izračunati iz nagiba pravca standardne krivulje primjenom sljedeće jednadžbe:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{nagib}}\right)} - 1$$

dok je nagib pravca standardne krivulje moguće izračunati iz izraza:

$$y - y_1 = \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)}(x - x_1)$$

gdje se uspoređuje omjer Ct vrijednosti i koncentracije DNA izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje (15).

Prednost te metode jesu specifičnost i preciznost, ali lažno negativni rezultati mogu nastati u slučaju kada su uzorci DNA fragmentirani ili onečišćeni PCR inhibitorima (16).

1.2.3. Poteškoće pri analizi

Analizu DNA prate različite poteškoće kao što su kontaminacija drugim molekulama i PCR inhibitori koje dovode do lažno negativnih rezultata. PCR reakciju mogu inhibirati spojevi koji ometaju interakciju između DNA molekule i Taq polimeraze (9). Spojevi koji potencijalno mogu inhibirati PCR nalaze se posvuda. Većina poznatih inhibitora jesu organski spojevi: urea, fenol (degradiraju DNA polimerazu), kolagen (inhibira aktivnost polimeraze), melanin (formira reverzibilan kompleks s DNA polimerazom), miogloblin i hemoglobin (njegov derivat hematin inhibira aktivnost polimeraze). Također, neke tvari reagiraju s kofaktorima polimeraze smanjujući im aktivnost i inhibirajući PCR reakciju (17). Danas postoje razni načini kako bi se izbjegla inhibicija poput povećanja koncentracije Taq polimeraze ili razrjeđivanje uzorka, pri čemu dolazi do posljedičnog razrjeđivanja inhibitora (9). Problemi pri umnažanju mogu nastati i zbog nedovoljne količine uzorka. U uvjetima niske koncentracije DNA povećan je rizik lažno negativnih PCR rezultata, a preveliki unos DNA materijala može uzrokovati inhibiciju PCR reakcije ili pospješiti amplifikaciju neželjenih nespecifičnih DNA odsječaka. Primjerice, u kontekstu analize STR lokusa, u uzorcima s niskom koncentracijom DNA materijala često dolazi do gubitka alela (engl. *allele dropout*) (18), a u uvjetima prevelike koncentracije DNA do pojave lažno pozitivnih signala (engl. *stutter allele*; *off ladder allele*; *pull-up allele*). Pojava lažno pozitivnih signala raste i s duljinom alela pojedinog STR lokusa. Unatoč značajnom broju

različitih metoda izolacije DNA u primjeni, količina i čistoća izolirane DNA i dalje su ograničavajući čimbenici u dobivanju optimalnih rezultata STR analize. Stoga svaki protokol zahtijeva validaciju u uvjetima specifičnog laboratorija, materijala i reagensa za izolaciju.

2. CILJEVI

1. Ispitati i usporediti prinos i čistoću DNA iz krvnih mrlja nakon izolacije s pomoću InstaGene Matrix suspenzije i QIAamp Blood Mini seta;
2. Ispitati i usporediti prinos i čistoću DNA iz obrisaka usne sluznice nakon izolacije s pomoću InstaGene Matrix suspenzije i QIAamp Blood Mini seta;
3. Utvrditi djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju mjerenjem podudarnosti koncentracije DNA izmjerene na Qubit fluorometru i qPCR uređaju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

Uzorci DNA izolirani su iz uzoraka krvnih mrlja i brisa usne sluznice deset ispitanika koji su dali informirani pristanak za izuzimanje biološkog materijala. Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku (klasa: 602-04/18-08/07, broj: 2158-61-07-18-83).

3.1.2. Upotrijebljene kemikalije

Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, SAD)

- Qubit® dsDNA HS Reagent (Component A)
- Qubit® dsDNA HS Buffer (Component B)
- Qubit® dsDNA HS Standard #1 (Component C)
- Qubit® dsDNA HS Standard #2 (Component D)

Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)

- Quantifiler PCR Reaction Mix
- Quantifiler Human DNA Standard
- Quantifiler Human Primer Mix
- Centrikon-100 filter tubice (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)
- TE puffer (Buffer TE)
- Temeljna standardna otopina (stock solution)

QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka)

- QIAGEN Proteinaza
- Proteinaza K
- AL pufer (Buffer AL)
- ATL pufer (Buffer ATL)
- Etanol (96 – 100%)
- AW1 pufer (Buffer AW1)
- AW2 pufer (Buffer AW2)
- AE pufer (Buffer AE)

InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, CA, SAD)

Autoklavirana i deionizirana H₂O

3.2. Metode

3.2.1. InstaGene™ Matrix

DNA je izolirana iz brisa usne sluznice i mrlje krvi s pomoću InstaGene™ Matrixa prema sljedećem protokolu: uzorak je stavljen u sterilnu tubicu volumena 0,2 mL, nakon čega je dodano 0,2 mL destilirane H₂O. Nakon kratkog vorteksiranja sadržaj tubice inkubiran je 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon kratkog miješanja na vorteksu uzorci su istaloženi centrifugiranjem 3 minute na 13 000 rpm. Supernatant je uklonjen i dodano je 100 µl InstaGene™ matrix reagensa te su uzorci inkubirani na 56 °C tijekom 3 sata. Pripremljeni uzorci zatim su kratko promiješani na vorteksu i inkubirani 8 minuta na 100 °C. Svaki je uzorak označen jedinstvenom identifikacijskom oznakom i pohranjen na -20 °C u zamrzivaču.

3.2.2. QIAamp Mini Kit

DNA je izolirana iz brisa usna sluznice s pomoću komercijalnog QIAamp Mini Kit kompleta prema sljedećem protokolu: u tubicu volumena 1,5 mL stavljen je komadić vatiće s uzorkom te je dodano 600 µl PBS pufera, 20 µl QIAGEN proteinaze i 600 µl AL pufera. Sadržaj je promiješan na vorteksu i kratko centrifugiran, nakon čega je 700 µl suspenzije prebačeno na QIAamp Mini kolonicu u kompletu s kolekcijskom tubicom, poklopac je zatvoren i kolonica je centrifugirana 1 min na 8 000 rpm. QIAamp Mini kolonica prebačena je zatim u novu kolekcijsku tubicu, dodano je 500 µl pufera AW1 i kolekcijski komplet centrifugiran je 1 min na 8 000 rpm. U sljedećem koraku, postupak ispiranja ponovljen je primjenom 500 µl pufera AW2 i centrifugiranjem kolekcijskog kompleta tijekom 1 min na 14 000 rpm. U konačnici, DNA je eluirana s mrežice QIAamp Mini kolonice dodatkom 100 µl zagrijanog AE pufera i centrifugiranjem 1 min na 8 000 rpm. Svaki DNA izolat označen je jedinstvenom identifikacijskom oznakom i pohranjen na -20 °C u zamrzivaču.

Izolacija DNA iz krvnih mrlja prikupljenih na FTA karticama primjenom QIAamp Mini kompleta učinjena je prema sljedećem protokolu: kružić promjera 3 mm izbušen je s površine FTA kartice i inkubiran u 180 µl ATL pufera tijekom 10 min na 85 °C. Nakon inkubacije u suspenziju je dodano 20 µl proteinaze K te je nakon kratkog miješanja na vorteks miješalici uzorak inkubiran 60 min na 56 °C. U sljedećem koraku dodano je 200 µl AL pufera, suspenzija je temeljito promiješana na vorteks miješalici te potom inkubirana 10 min na

70 °C. U nastavku dodano je 200 µl EtOH (96-100%) te je cjelokupan sadržaj temeljito promiješan na vorteksu i kratko centrifugiran. Nastali supernatant zatim je prebačen na QIAamp kolonicu i centrifugiran 1 min na 8 000 rpm. QIAamp Mini kolonica potom je prebačena u novu koleksijsku tubicu i nakon dodatka 500 µl pufera AW1 centrifugirana 1 min na 8 000 rpm. Sljedeći korak ispiranja ponovljen je primjenom 500 µl pufera AW, nakon čega je koleksijski komplet centrifugiran 3 min na 14 000 rpm. U posljednjem koraku ispiranja, DNA je eluirana s QIAamp Mini kolonice dodatkom 100 µl AE pufera i centrifugiranjem 1 minutuna 8 000 rpm. Svaki je DNA izolat označen jedinstvenom identifikacijskom oznakom te je pohranjen na -20 °C u zamrzivaču.

3.2.3. Mjerenje koncentracije DNA s pomoću komercijalnog kompleta „Qubit HighSensitivity DNA“

Za mjerenje koncentracije DNA 40 uzoraka i 2 standarda spomoću QUBIT fluorometra pripremljena je radna otopina razrjeđenja 1:200. Radna otopina sastojala se od dviju komponenata - 8358 µl Qubit dsDNA HS pufera i 42 µl Qubit dsDNA HS reagensa. Za pripremu standarda 1 (0 ng/µl), odnosno standarda 2 (10 ng/µl) pomiješano je 190 µl Qubit radne otopine i 10 µl stock otopine Qubit dsDNA HS Standarda 1, odnosno 10 µl stock otopine Qubit dsDNA HS Standarda 2. Alikvoti za mjerenje DNA u uzorcima nepoznate koncentracije pripremljeni su miješanjem 195 µl Qubit radne otopine i 5 µl DNA izolata, nakon čega su kratko vorteksirani te inkubirani na sobnoj temperaturi. Prvo su izmjerene vrijednosti fluorescencije standarda 1 i 2, a zatim su na temelju dobivene standardne krivulje određene vrijednosti koncentracije DNA u ispitivanim uzorcima (Slika 2.).



Slika 2. QUBIT fluorometar

3.2.4. Mjerenje koncentracije DNA s pomoću komercijalnog kompleta „QuantiFiler Human Quantification DNA Kit“

Komercijalni komplet QuantiFiler Human Quantification DNA sadrži 2 kompleta početnica i 2 TaqMan probe za detekciju amplifikacije ciljnih humanih i kontrolnih sekvenci, tzv. IPC kontrole (IPC, prema engl. *Internal PCR Control*). IPC kontrola jest sintetički oligonukleotid koji čini dio svake PCR smjese i služi za testiranje prisutnosti PCR inhibitora u ispitivanim DNA uzorcima. Zbog prisutnosti dviju različito fluorescentno obilježenih TaqMan proba, od kojih jedna specifično veže humane DNA sekvence, a druga IPC oligonukleotid, moguće je u stvarnom vremenu istodobno pratiti umnažanje ciljnih humanih sekvenci i detektirati prisutnost PCR inhibitora (Slika 3.).

Postupak: Prvo su pripremljeni standardi (Tablica 1.), a zatim PCR MasterMix za 96 jažica na mikrotitarskoj pločici. Za pripremu radne otopine Standarda 1 (Std1; 50 ng/ul), faktora razrjeđenja 4x, u 30 µl TE pufera dodano je 10 µl stock otopine Standarda 1 (200 ng/µl). U nastavku, serijskim razrjeđenjem Std1 (50 ng/µl) pripremljeno je još 7 standarda od kojih je svaki razrijeđen 3 puta u odnosu na prethodni. U konačnici, dobiveno je 8 Std uzoraka, koncentracijskog raspona od 50 ng/µl (Std1) do 0,02 ng/µl. PCR MasterMix zatim je pripremljen miješanjem 1071 µl Quantifiler Human Primer Mix reagensa i 1275 µl Quantifiler PCR Reaction Mix otopine. Svaki DNA uzorak testiran je u duplikatu, dodatkom 2 ul standarda ili DNA izolata u 23 µl pripremljene PCR MasterMix smjese. Amplifikacija je provedena tijekom ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja PCR smjese u skladu s temperaturnim uvjetima opisanim u Tablici 2.

Tablica 1. Priprema standarda

Standard	Koncentracija (ng/ul)	Primjer	Minimalna količina	Faktor razrjeđenja
Std1	50	50 ul (200 ng/ul stock) + 150 ul TE	10 ul (stock) + 30 ul TE	4x
Std2	16,7	50 ul (Std1) + 100 ul TE	10 ul (Std1) + 20 ul TE	3x
Std3	5,56	50 ul (Std2) + 100 ul TE	10 ul (Std2) + 20 ul TE	3x
Std4	1,85	50 ul (Std3) + 100 ul TE	10 ul (Std3) + 20 ul TE	3x
Std5	0,62	50 ul (Std4) + 100 ul TE	10 ul (Std4) + 20 ul TE	3x
Std6	0,21	50 ul (Std5) + 100 ul TE	10 ul (Std5) + 20 ul TE	3x
Std7	0,06	50 ul (Std6) + 100 ul TE	10 ul (Std6) + 20 ul TE	3x
Std8	0,02	50 ul (Std7) + 100 ul TE	10 ul (Std7) + 20 ul TE	3x

Tablica 2. Temperaturni uvjeti qPCR reakcije

Korak	Enzimski aktivnost	Umnažanje (40 ciklusa)		Završna elongacija
		Denature	Anneal	
	HOLD	95 °C	60 °C	4°C
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C	4°C
Vrijeme	10 min	15 s	1 min	∞



Slika 3. Uređaj QuantStudio 5 PCR

3.2.5. Statističke metode

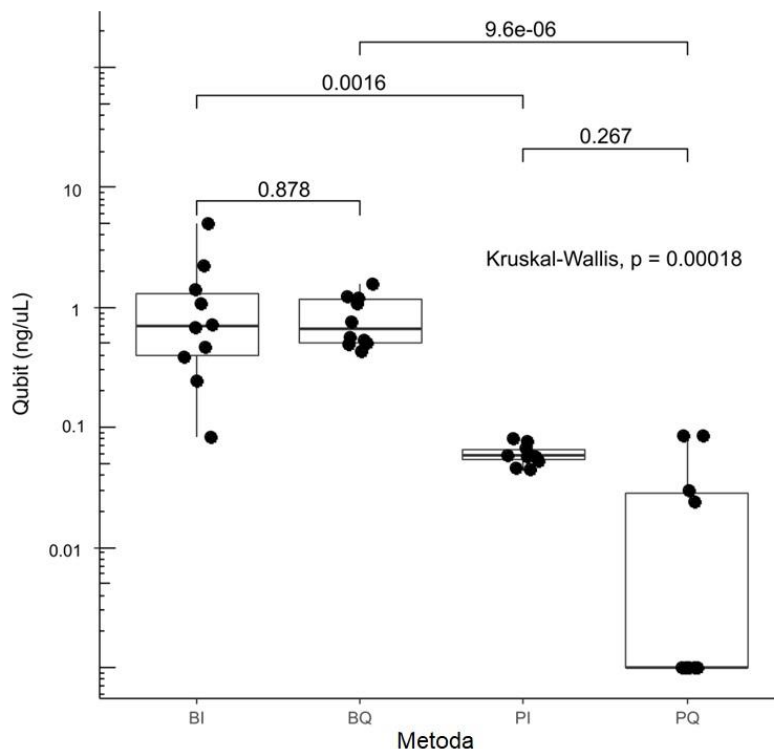
Omjerne varijable prikazane su medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR), distribucije su procijenjene Shapiro-Wilkovim, a homogenost varijanci Levenovim testom. Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom, s *post hoc* Bonferroni-Dunnovom poredbom. Podudarnost mjerenja ocijenjena je Linovim (19, 20) koeficijentom konkordancije korelacija s pripadnim 95%-tnim intervalom pouzdanosti (<https://www.niwa.co.nz/node/104318/concordance>). Bland-Altmanovi grafovi rekonstruirani su u Microsoft Excel programu. Ako nije drugačije naznačeno, dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti, a testovi su provedeni u NCSS2007 programu (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, SAD). Za grafički je prikaz upotrijebljen *ggpubr* paket za R program v3.4.1 (<http://www.R-project.org>).

4.REZULTATI

Izmjerene su koncentracije DNA na QUBIT fluorometru i QuantStudio 5 PCR uređaju za sve izolirane uzorke. Napravljena je analiza podudarnosti izmjerenih vrijednosti DNA koncentracije.

4.1. Analiza prinosa DNA QUBIT fluorometrom ovisno o uzorku i izboru metode izolacije

Mjerenjem koncentracije DNA na Qubit fluorometru uočena je značajna razlika u prinosu DNA materijala koji je izoliran iz uzoraka brisa usne sluznice u odnosu na prinos ostvaren u uzorcima mrlja krvi, neovisno o izboru metode za izolaciju DNA [Kruskal-Wallis test; $P = 0,00018$]. Najveća koncentracija DNA ostvarena je primjenom Instagene reagensa u uzorcima brisa usne sluznice [BI medijan (IQR); $M_e = 0,7$ (0,35 - 1,59)], a značajno manje vrijednosti zabilježene su u uzorcima mrlje krvi primjenom Instagene [PI $M_e = 0,058$ (0,051 - 0,069); $P = 0,0016$] ili QIAamp Mini Kit kompleta [PQ $M_e = 0$ (0 - 0,004); $P = 9,6 \times 10^{-6}$]. Najveći broj mjerenja ispod donje granice osjetljivosti Qubit fluorometra zabilježen je u uzorcima mrlje krvi izoliranih QIAamp Mini Kit kompletom [PQ $M_e = 0$ (0 - 0,004)]. Prinos DNA izmjeren Qubit fluorometrom u uzorcima koji su izolirani iz brisa usne sluznice s pomoću Instagene i QIAamp Mini komercijalnih kompleta nije se značajno razlikovao (Kruskal-Wallis test; $P = 0,878$). Jednako tako, nisu zabilježene značajne razlike u koncentraciji DNA izolirane iz mrlje krvi, primjenom Instagene reagensa ili QIAamp Mini seta ($P = 0,267$).

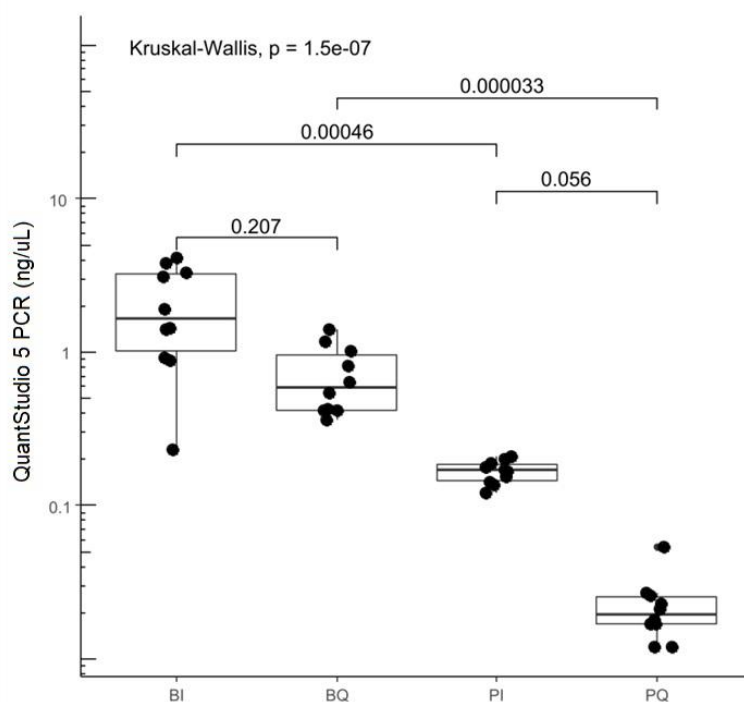


Slika 4. Prinos DNA iz uzoraka brisa usne sluznice (B) i krvnih mrlja (P) nakon izolacije Instagene Matrix reagensom (BI; PI) ili Qiagen QIAamp Blood Mini komercijalnim kompletom (BQ; PQ). Koncentracija je izmjerena na QUBIT fluorometru, a vrijednosti su prikazane box-plot dijagramima gdje gornje i donje vertikalne crte predstavljaju granice 1,5x interkvartilnog raspona. $P < 0,05$ označava prag značajnosti (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom). Ordinata je log-os.

4.2. Analiza prinosa DNA na QuantStudio 5 PCR uređaju ovisno o uzorku i izboru metode izolacije

Mjerenjem koncentracije DNA na QuantStudio 5 PCR uređaju uočena je značajna razlika u prinosu DNA materijala koji je izoliran iz uzoraka brisa usne sluznice u odnosu na prinos ostvaren u uzorcima mrlje krvi, neovisno o izboru metode za izolaciju DNA [Kruskal-Wallis test; $P = 1,5e - 07$]. Najveća koncentracija DNA ostvarena je primjenom Instagene reagensa [BI medijan (IQR); $M_e = 1,67 (0,92 - 3,45)$] i QIAamp Mini kompleta [BQ medijan (IQR); $M_e = 0,59 (0,42 - 1,06)$] u uzorcima brisa usne sluznice, a značajno manje vrijednosti zabilježene su u uzorcima mrlje krvi primjenom Instagene [PI $M_e = 0,17 (0,14 - 0,19)$; $P = 0,00046$] ili QIAamp Mini Kit kompleta [PQ $M_e = 0,02 (0,016 - 0,026)$; $P = 0,000033$]. Prinos DNA izmjeren

uređajem QuantStudio 5 PCR u uzorcima koji su izolirani iz brisa usne sluznice s pomoću Instagene i QIAamp Mini komercijalnih kompleta nije se značajno razlikovao (Kruskal-Wallis test; $P = 0,207$). Jednako tako, nije zabilježena značajna razlika u koncentraciji DNA izolirane iz mrlje krvi, neovisno o izboru metode za izolaciju DNA ($P = 0,056$).

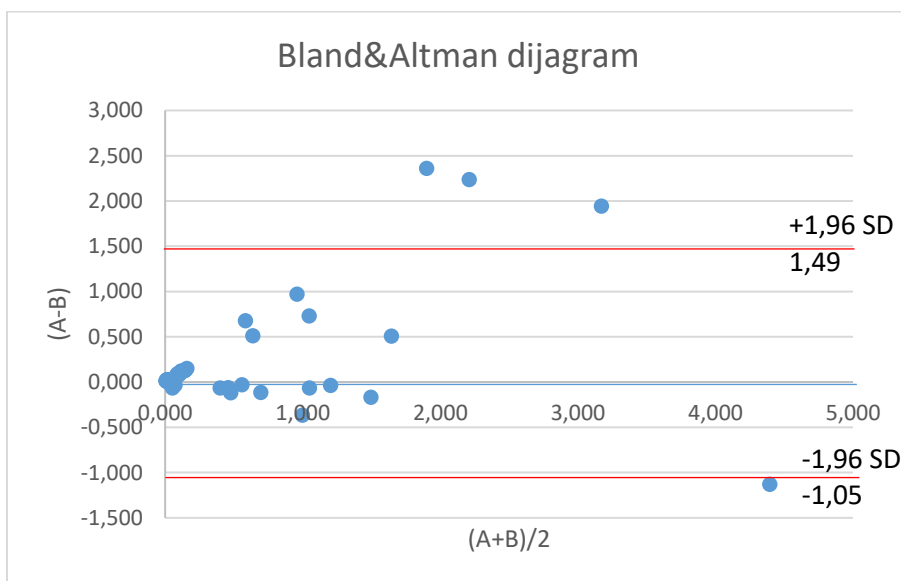


Slika 5. Prinos DNA iz uzoraka brisa usne sluznice (B) i krvnih mrlja (P) nakon izolacije InstaGene Matrix reagensom (BI; PI) ili Qiagen QIAamp Blood Mini komercijalnim kompletom (BQ; PQ). Koncentracija je izmjerena na uređaju QuantStudio 5 PCR, a vrijednosti su prikazane box-plot dijagramima, gdje gornje i donje okomite crte predstavljaju granice 1,5x interkvartilnog raspona. $P < 0,05$ označava prag značajnosti (Kruskal-Wallisov test s post hoc Bonferroni-Dunnovom poredbom). Ordinata je log-os.

4.3. Analiza podudarnosti mjerenja koncentracije DNA na QUBIT fluorometru i uređaju QuantStudio 5 PCR

Dijagram Bland-Altman prikazuje podudarnost vrijednosti koncentracije DNA izmjerenih na uređaju QuantStudio 5 PCR i QUBIT fluorometru te omogućuje identifikaciju systemske razlike

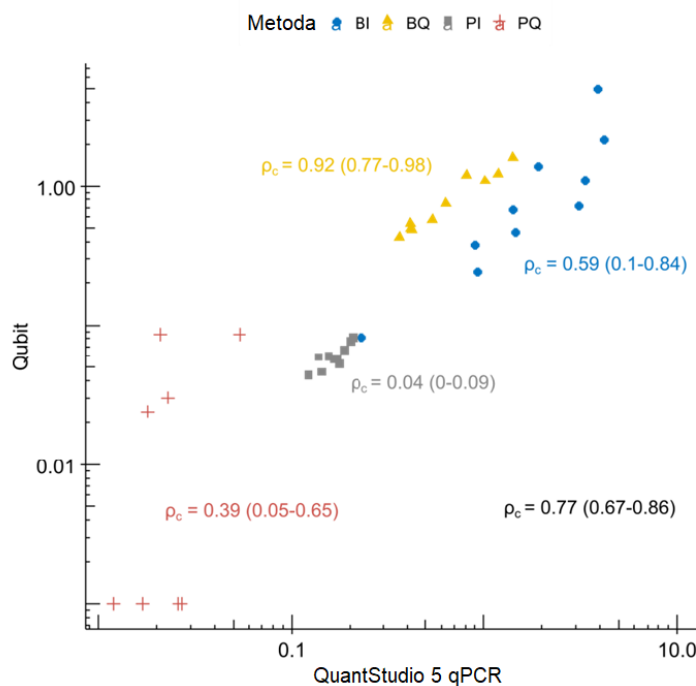
između dobivenih mjerenja. Za izradu Bland-Altman dijagrama i kvantifikaciju podudarnosti mjerenja dobivenih primjenom dviju kvantitativnih metoda određuje se razlika izmjerenih vrijednosti (QS5 PCR-Qubit) i aritmetička sredina uparenih mjerenja $((QS5\ PCR+Qubit)/2)$. Izračunata srednja vrijednost razlike mjerenja (središnja horizontalna os) predstavlja procjenu podudarnosti dviju metoda i opisuje veličinu pristranosti jedne metode u odnosu na drugu. Standardna devijacija razlike mjerenja omogućuje pak definiranje intervala sporazumijevanja unutar kojeg je moguće vidjeti slučajne fluktuacije zabilježenih razlika. Ako se srednja vrijednost razlike značajno razlikuje od nule, to ukazuje na prisutnost konstantne pristranosti mjerenja dobivenih jednom metodom u odnosu na mjerenja dobivena drugom metodom. U ovom istraživanju srednja vrijednost razlike iznosi 0,22 jedinica. Razlika nije nula, što znači da uređaj QuantStudio 5 PCR pri procjeni koncentracije DNA u ispitivanim uzorcima, u prosjeku bilježi 0,22 jedinica više nego QUBIT fluorometar .



Slika 6. Bland-Altman dijagram raspršenja. X-os predstavlja razliku izmjerenih vrijednosti (QS5PCR-Qubit). Y-os predstavlja aritmetičku sredinu uparenih mjerenja $(QS5\ PCR+Qubit)/2$. Horizontalna os predstavlja srednju vrijednost razlike mjerenja koja iznosi 0,22. Granice intervala sporazumijevanja dviju metoda definirane su rasponom od +/- 1,96 x SD razlike mjerenja.

Linov koeficijent konkordancije test je kojim se mjeri sličnost mjerenja dobivenih primjenom nove i referentne metode. Linov koeficijent kreće se od -1 do 1 (savršeni sporazum) te predstavlja stupanj korelacije između dvaju mjerenja. U ovom istraživanju Linov koeficijent

konkordancije upotrijebljen je za prikaz podudarnosti mjerenja koncentracije DNA na QUBIT fluorometru i uređaju QuantStudio 5 PCR. Rezultat pokazuje da postoji određeni stupanj korelacije i podudarnosti između učinjenih mjerenja ($\rho_c = 0,77$ (0,67 - 0,86)), posebice u uzorcima DNA koji su izolirani iz uzoraka brisa usne sluznice primjenom QIAamp Mini Kit kompleta. Najmanji stupanj korelacije pokazuju mjerenja zabilježena u skupini DNA uzoraka dobivenih iz mrlje krvi s pomoću Instagene reagensa ($\rho_c = 0,04$ (0 - 0,09)).



Slika 7. Analiza podudarnosti izmjerenih vrijednosti koncentracije DNA izolirane iz uzoraka brisa usne sluznice (B) ili krvnih mrlja (P) primjenom InstaGene Matrix reagensa (BI; PI) ili Qiagen QIAamp Blood Mini komercijalnog kompleta (BQ; PQ) na uređajima QUBIT i QuantStudio 5 qPCR. Linov koeficijent konkordancije - ρ_c

5.RASPRAVA

Izolacija DNA koja prethodi većini postupaka laboratorijske analize genetičkog materijala danas je metodološki uvelike napredovala kako bi se prilagodila raznolikim biološkim uzorcima. Među njima, uzorci krvi i brisa usne sluznice jedni su od češće korištenih. Uspješnost analize DNA ovisi o velikom broju različitih čimbenika. Forenzički uzorci pak čine skupinu izrazito zahtjevnog biološkog materijala koji je često kontaminiran, onečišćen, oskudan ili oštećen. Danas postoje brojne metode za izolaciju DNA koje se poglavito temelje na različitim kemijskim svojstvima molekule DNA i drugih makromolekula koje nalazimo u stanicama. Među češće korištenim metodama za izolaciju DNA ubrajamo neafinitetnu Chelex metodu te afinitetna rješenja poput QIAamp DNA Blood Mini kompleta. Komercijalni kitovi za izolaciju DNA sve su učestaliji u laboratorijima, a izbor najbolje metode za optimalni prinos DNA iz različitih vrsta bioloških uzoraka izrazito je važan za uspješnost posljedičnih analitičkih postupaka. Zbog toga se uvijek traga za novim metodološkim rješenjima, a izbor uzoraka i reagensa koji određuju brzinu, učinkovitost, kvalitetu i cijenu izolacije DNA dio su odluke svakog laboratorija.

Svrha ovog istraživanja bila je procijeniti djelotvornosti izolacije DNA iz krvnih mrlja i obrisaka bukalne sluznice primjenom InstaGene Matrix reagensa i Qiagen QIAamp Blood Mini kompleta. U tu svrhu provedeno je mjerenje koncentracije dobivenih DNA izolata s pomoću QUBIT fluorometra i uređaja qPCR. Količina DNA materijala koja je dobivena iz izuzetih uzoraka značajno je varirala u ovisnosti o vrsti biološkog materijala, ali ne i u ovisnosti o metodi izolacije. Sukladno navedenom, značajno veći prinos DNA materijala dobiven je iz briseva usne sluznice u odnosu na količinu DNA koja je izolirana iz mrlja krvi, posebice u uzorcima u kojih je DNA izolacija učinjena primjenom InstaGene reagensa. Suprotno, u populaciji istovrsnih uzoraka, nisu zabilježene značajne razlike u količini DNA dobivenih primjenom InstaGene smole ili QIAamp Mini kompleta.

Naši rezultati u skladu su s rezultatima ranije studije koja opisuje manji prinos DNA materijala iz uzoraka sline nakon primjene QIAamp Mini kolonice, dok ostale metode u primjeni, uključujući i InstaGene reagens, daju bolje rezultate (21). Međutim, prinos DNA materijala nije jedini kriterij učinkovitosti metode za izolaciju. Usporedbom pet različitih metoda za izolaciju DNA, Stephen Ip i sur. pokazali su da DNA uzorci izolirani QIAamp Mini kompletom daju cjelovitije STR profile u odnosu na uzorke koji su izolirani primjenom InstaGene reagens,

posebice kada su u pitanju oskudni ili razrijeđeni uzorci DNA (22). Castello i sur. također su uočili bolju učinkovitost QIAamp DNA Mini kompleta, ali tek u kombinaciji s homogenizirajućim kolonama uređaja QIAshredder, koji osigurava značajno veći prinos DNA materijala u usporedbi s količinama koje su dobivene primjenom Chelex ili klasične organske metode. Takva izolacija pokazala je superiornost nad Chelex protokolom u testiranim uzorcima, između kojih su bili i uzorci krvi i brisa usne sluznice (23). Prinosi ostvareni QIAamp Mini kompletom bez uređaja QIAshredder više nalikuju količinama zabilježenima u našoj studiji.

Usporedbom mjerenja koncentracije DNA na QUBIT fluorometru i uređaju QuantStudio 5 PCR uočeno je da uređaj QuantStudio 5 PCR u prosjeku bilježi 0,22 jedinica više nego QUBIT fluorometar. Taj rezultat uvelike je posljedica izostanka QUBIT mjerenja koncentracije DNA u uzorcima krvnih mrlja koje su izolirane QIAamp Mini kompletom. Naime, donja granica detekcije QUBIT fluorometra iznosi 0,01 ng/ μ l, a koeficijent varijacije ponovljenih mjerenja značajno raste u uzorcima čije se vrijednosti koncentracije približavaju granici detekcije. U tom kontekstu, zabilježena odstupanja i nemogućnost mjerenja koncentracije DNA u uzorcima s niskim prinosom ukazuju na nepreciznost QUBIT metode te potvrđuju qPCR analizu kao metodu izbora za mjerenje vrlo malog broja DNA kopija. Takav zaključak podupiru i rezultati analize podudarnosti izmjerenih vrijednosti DNA na QUBIT i qPCR uređaju. Naime, najveći stupanj korelacije između QUBIT i qPCR mjerenja zabilježen je u uzorcima DNA dobivenih iz obrisaka usne sluznice, a podudarnost mjerenja opada sa smanjenim prinosom DNA materijala iz krvnih mrlja. Zanimljivo, gotovo savršeni stupanj slaganja pokazuju mjerenja učinjena u uzorcima brisa usne sluznice koji su izolirani QIAamp Mini kompletom, što potencijalno upućuje na najbolji omjer količine i čistoće DNA u ovoj skupini uzoraka. Veća neslaganja uočena su međutim usporedbom mjerenja ostvarenih u uzorcima brisa usne sluznice koji su izolirani InstaGene reagensom, potencijalno kao posljedica negativnog učinka Chelex smole na učinkovitost vezanja DNA i fluorescentne boje. Zanimljivo, drugi su autori opisali smanjenu uspješnost STR analize uzoraka koji su izolirani Chelex metodom, ali ne i QIAamp Mini kompletom (24). U našoj skupini uzoraka, uključujući i uzorke izolirane InstaGene reagensom, PCR inhibitori međutim nisu zabilježeni. Potencijalni negativni učinci InstaGene reagens na učinkovitost mjerenja QUBIT fluorometrom ostaju za sada nerazjašnjeni.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da u usporedbi s mrljama krvi uzorci bukalne sluznice daju veći prinos DNA neovisno o izboru metode za izolaciju. InstaGene reagens međutim ima nešto bolji učinak kada su u pitanju oskudni uzorci poput mrlja krvi. U odnosu na

QUBIT fluorometar, qPCR metoda pokazuje nekoliko prednosti uključujući mogućnost istodobne detekcije izrazito malog broja DNA kopija i potencijalno prisutnih onečišćenja.

6. ZAKLJUČAK

1. Uzorci brisa usne sluznice daju veći prinos DNA materijala nego uzorci krvnih mrlja prikupljeni na FTA karticama, neovisno o izboru metode za izolaciju DNA.
2. U odnosu na InstaGene reagens, QIAamp Blood Mini komplet jednako je dobar izbor za izolaciju DNA iz obrisaka usne sluznice, ali je manje prihvatljiv za izolaciju optimalnih količina DNA iz krvnih mrlja.
3. Vrijednosti DNA koncentracije izmjerene na QUBIT fluorometru i uređaju qPCR pokazuju najveći stupanj korelacije u uzorcima s većom količinom DNA, a podudarnost mjerenja opada smanjenjem DNA koncentracije.
4. U odnosu na QUBIT fluorometar, qPCR je metoda izbora za mjerenje vrlo malog broja DNA kopija u ispitivanim uzorcima.

7. SAŽETAK

UVOD: Učinkovita izolacija DNA iz različitih bioloških uzoraka osnova je uspješne forenzičke analize genetičkog materijala. Ionsko-izmjenjivačke smole i komercijalne silika kolonice najčešći su primjeri neafinitetnih i afinitetnih metoda koje se koriste za izolaciju DNA iz oskudnih uzoraka poput krvnih mrlja ili brisa bukalne sluznice. Izbor optimalne metode za izolaciju DNA izrazito je važan za uspješnost posljedičnih forenzičkih analiza te je u tu svrhu ispitivana učinkovitost Chelex® InstaGene™ i Qiagen® QIAamp Mini komercijalnih kompleta.

CILJ: Odrediti djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju DNA iz brisa bukalne sluznice i krvne mrlje mjerenjem količine i kvalitete DNA na QUBIT fluorometru i uređaju qPCR.

MATERIJAL I METODE: Upotrijebljeni su uzorci krvi i brisa usne sluznice. DNA je izolirana InstaGene reagensom i QIAamp Blood Mini kompletom. Koncentracija DNA izmjerena je QUBIT fuorometrom i qPCR uređajem, primjenom Qubit High Sensitivity DNA i QuantiFiler Human Quantification seta.

REZULTATI: Značajno veći prinos DNA materijala dobiven je iz briseva usne sluznice u odnosu na količinu DNA dobivenu iz mrlja krvi. U populaciji istovrsnih uzoraka nisu zabilježene značajne razlike u količini DNA koja je dobivena primjenom InstaGene smole ili QIAamp Mini kompleta. Najveći stupanj korelacije između QUBIT i qPCR mjerenja zabilježen je u uzorcima obrisaka usne sluznice, a podudarnost mjerenja opada sa smanjenim prinosom DNA materijala.

ZAKLJUČAK: U odnosu na InstaGene reagens, QIAamp Blood Mini komplet jednako je dobar izbor za izolaciju DNA iz briseva usne sluznice, ali je manje prihvatljiv za izolaciju optimalnih količina DNA iz krvnih mrlja.

KLJUČNE RIJEČI: bris usne sluznice; DNA; krvna mrlja; lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.

8. SUMMARY

INTRODUCTION: Effective DNA isolation from various biological samples is the basis for successful forensic analysis of genetic material. Ion-exchange resin and commercial silica column are the most common examples of non-affinity and affinity methods used for DNA isolation from scarce biologic samples such as blood stains or buccal swabs. Choosing the optimal DNA isolation method is thus essential for subsequent forensic analyses, which is why the efficiency of Chelex® InstaGene™ and Qiagen® QIAamp Mini commercial kits was examined.

AIM: To determine the efficacy of the investigated methods for DNA isolation from buccal swabs and blood stains by measuring the amount and quality of extracted DNA on QUBIT fluorometer and qPCR.

MATERIAL AND METHODS: Blood samples and buccal swabs were used for this study. DNA was isolated with the InstaGene reagent and the QIAamp Blood Mini kit. The DNA concentration was subsequently measured on the QUBIT fluorometer and a qPCR machine using Qubit High Sensitivity DNA and QunatiFiler Human Quantification DNA Kits.

RESULTS: A significantly higher yield of DNA material was gained from buccal swabs in comparison with the amount of DNA obtained from blood stains. No substantial difference was found in the amount of DNA isolated from the same kind of samples, regardless of isolation method used. The highest degree of Lin's concordance between measurements made on QUBIT fluorometer and the qPCR machine was recorded in buccal swab samples, with the measurement concordance declining as the yield of DNA material decreased.

CONCLUSION: Compared to the InstaGene reagent, the QIAamp Blood Mini Kit is an equally good alternative for DNA isolation from buccal swabs, but is less acceptable for isolating optimal amounts of DNA from blood stains.

KEYWORDS: buccal swab; DNA; blood stain; real-time polymerase chain reaction

9. LITERATURA

1. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011
2. Cooper GM, Hausman RE. Stanica Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska Naklada; 2010.
3. Stryer L. Biokemija. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1991.
4. U.S. National Library of Medicine Dostupno na adresi:
<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/dna> Datum pristupa: 9.5.2019.
5. Cattaneo C, Gelsthorpe K, Sokol RJ. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons. 2006. pp. 1-19.
6. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. Am J Hum Genet. 1991; 49:746-756
7. Gymrek M. A genomic view of short tandem repeats. Curr Opin Genet Dev. 2017;44:9-16.
8. Chacon-Cortes D, Griffiths LR. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives, J Biorepos SciAppMed. 2014;2:1-9.
9. President's DNA Initiative. DNA Extraction & Quantitation for Forensic Analysts. Crime Scene and DNA Basics for Forensic Analysts [Online tečaj]. 2008 Dostupno na adresi:
<http://www.sjsu.edu/people/steven.lee/courses/c2/s2/DNA%20Extraction%20and%20Quantitation%20for%20Forensic%20Analysts.pdf> Datum pristupa: 22.4.2019.
10. Haque KA, Pfeiffer RM, Beerman MB, Struewing JP, Chanock SJ, Bergen AW. Performance of high-throughput DNA quantification methods. BMC Biotechnol. 2003; 3:20.
11. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. PLoS One. 2016; 11:e015528.
12. Promega Corporation. DNA-Based Human Identification. Protocols & Applications Guide [Internet]. Dostupno na adresi:
<https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/dna-based-human-identification/> Datum pristupa: 22.4.2019.

13. Applied Biosystems. Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits user guide. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation 2014.
14. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 1. izd. Gaithersburg: Academic Press; 2011. 49-67.
15. Timken MD, Swango KL, Orrego C, Chong MD, Buoncristiani MR. Quantitation of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR. *Final Rep.* 2005; 1-89.
16. Martins C, Lima G, Carvalho MR, Caine L, Porto MJ. DNA quantification by real-time PCR in different forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2015; 5:e545-e546.
17. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012; 113:1014–26.
18. McCord B, Opel K, Funes M, Zoppis S, Jantz LM. An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic Samples. 2011; 1-65.
19. Putkonen MT, Palo JU, Cano JM, Hedman M, Sajantila A. Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples. *Investig Genet.* 2010;1:9.
20. Lin LI-K. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45: 255–268.
21. Garbieri TF, Brozoski DT, Dionísio TJ, Santos CF, Neves LT das. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *J Appl Oral Sci.* 2017 Apr;25(2):147–58.
22. Ip SCY, Lin S, Lai K. An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex® 100, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAamp® DNA Investigator Kit, QIAasymphony® DNA Investigator® Kit and DNA IQ™. *Sci Justice.* 2015; 55:200–8.
23. Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Sci Int.* 2006; 156:70-73.
24. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. QIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation for Forensic Casework. *J Forensic Sci.* 1998;43:1024-1030.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Jelena Jakšić

Datum i mjesto rođenja:

17.prosinca 1996., Osijek

Obrazovanje:

- 2015. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2011. – 2015. II. gimnazija Osijek
- 2003. – 2011. Osnovna škola „Mladost“