



DETERMINATION OF NUCLEAR DNA CONCENTRATION USING REAL-TIME PCR TECHNIQUE

Agnieszka MIROWSKA³, Ryszard PAWŁOWSKI^{1,2}

¹ *Institute of Forensic Medicine, Medical University, Gdańsk*

² *Institute of Forensic Research, Krakow*

³ *Faculty of Pharmacy, Medical University, Gdańsk*

Abstract

The general aim of the present study was to develop and optimise a real-time PCR (RT-PCR) based method of determination of human nuclear DNA concentration that could be utilized in forensic genetics laboratories. The study material consisted of human DNA as well as DNA from nineteen different vertebrate species. The developed quantitative test is based on amplification of the Alu Yb8 repetitive sequence specific for human DNA. It was shown that measurement of the nuclear DNA concentration is linear in the range from 200 ng/ l to 0.02 ng/ l and that appropriate precision and accuracy are ensured for samples which have DNA concentration above 2 pg/ l. The method should therefore be considered as very sensitive since it allows determination of DNA concentration at the level of the single haploid cell. A performed validation study indicated that in general amplification of animal DNA is negligible and it was also found that in the case of the (closely related to humans) chimpanzee species, an amplification signal of the Alu Yb8 is not present at all. The performed experiments showed that the developed method of determination of human nuclear DNA concentration is very sensitive, reliable and highly specific and therefore can be a valuable tool utilized in forensic examinations.

Key words

Forensic genetics; Determination of human DNA concentration; Real-time PCR; Alu Yb8 DNA sequences.

Received 4 December 2006; accepted 8 January 2007

1. Introduction

In forensic genetics studies accurate determination of DNA concentration in biological samples is an important issue as the amount of template DNA may affect the ensuing PCR amplification of STR loci [3]. This problem is addressed for instance by Standard 9.3 of the DNA Advisory Board (DAB) [4] regarding quality assurance in forensic genetics laboratories which specifies that “a laboratory should have and apply procedures of determination of human DNA concentration in analysed samples”. Therefore, in all samples which are to be subjected to amplification or other

examinations with molecular biology techniques, DNA concentration should be evaluated beforehand. Many different techniques have been used for years for the purpose of measurement of DNA concentration. They include very simple UV spectrometry based methods as well as recently developed approaches based on quantitative PCR reactions. Due to the specific nature of studied biological material, more sophisticated methods are required (in forensic genetics) which allow determination of not just total DNA concentration, but also human DNA in particular, which is most frequently the subject of forensic analyses. Inappropriate template DNA concentration used for the

PCR reaction usually leads to numerous different interpretation problems. In the case of use of excess of template DNA, additional fractions may be observed. The ratio of the n to $n + 1$ fraction increases as a result of incomplete adenylation, the percentage of stutter peaks rises and also the balance between alleles in particular loci may be changed. On the other hand, deficiency of template DNA may cause incomplete DNA profiles, overrepresentation of short amplicons and false homozygotes [10]. One of the methods used for determination of human DNA concentration is a semi-quantitative slot-blot technique. This method uses a DNA probe which is specific to the alpha-satellite DNA sequence characteristic for Human and Primate DNA and present on human chromosome 17. The method utilizes radioactive labelled probes, is relatively time-consuming but sensitive. It enables determination of single and double stranded DNA at the level of approximately 10–20 pg [15]. This method is implemented in commercial kit Quantiblot Human Quantitation Kit manufactured by Applied Biosystems. The other commercially available kit used for determination of human DNA concentration is Promega's AluQuant based on the luminometric method. This kit allows measurement of the DNA amount on the basis of Alu sequences, which are present in many copies in the human genome, and enables high precision in the range of 0.1–50 ng [8]. There are also methods of determination of human DNA concentration which implement the end-point PCR reaction for amplification of single STR loci [6]. In this case, the PCR reaction is used for amplification of target DNA from analysed samples and reference samples of known DNA concentration which are used for drawing a calibration curve. The sensitivity of such a method is assessed to be at the level of about 100 pg of DNA.

It seems that methods based on real-time PCR should be considered as the most reliable techniques of determination of human DNA concentration in forensic genetics. This stems from the fact that only DNA which has actually been subjected to amplification in spite of the action of unfavourable factors such as inhibitors (hem, humic acid, tannin) or heavily degraded DNA, is measured. In this way not only the DNA amount, but also the quality of template DNA is taken into account. This method is implemented in commercially available kits used for determination of human DNA concentration: Quantifiler and Quantifiler Y based on amplification of the hTERT or SRY, respectively [1]. The sensitivity of these kits was assessed to be at the level of 20 pg of human DNA, i.e. about 3 somatic cells.

The present paper is an attempt to adapt the method of specific determination of human DNA amount by application of amplification of Alu sequences. Alu elements are 300 bp long retrotransposon DNA sequences which during the last 65 million years have been duplicated in the human genome to above 1 million copies and currently comprise more than 10% of human DNA. It has been verified that PCR amplification of multi-copy Alu sequences is a more sensitive method of determination of nuclear DNA concentration than typical procedures based on the hybridisation technique (e.g. slot blot). PCR amplification of Alu sequences also retains all the advantages of the singleplex PCR reaction, e.g. amplicons have the same size and melting temperature. Moreover, amplicons are short enough (69 bp for Yb8) to overcome difficulties related to degradation of template DNA. In general Alu elements are specific for Primates, including man. However, some evolutionarily younger subgroups of the Alu family, such as Ya5 and Yb8 are exclusively specific to the human genome [13].

This paper presents results of a study performed on Alu Yb8 sequences. The Alu Yb8 which is actually amplified from many identical target loci dispersed in the human genome gives a homogenous PCR product. Thus, this multi-template amplification has all the advantages of a singleplex PCR reaction. In the present study, Alu Yb8 sequences were analysed using the real-time PCR approach on the basis of a procedure developed by Walker and co-workers [14] which allows multiplex analysis of Alu Yb8 nuclear sequences as well as additional mitochondrial and Y chromosome loci. The present paper shows results of experiments carried out in order to optimise conditions of a multiplex method of determination of human DNA concentration based on RT-PCR and a TaqMan probe. The study addressed such issues as determination of experimental conditions of the procedure and assessment of the reliability of the obtained results. The method was optimised from the point of view of application to medico-legal examinations.

2. Materials and methods

2.1. Samples

The study was conducted using three types of DNA standards: 1) human DNA included in the Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) – concentration 200 ng/ μ l, 2) human DNA standard 9947A (Promega) – concentration 10ng/ μ l, 3) human DNA extracted from male peripheral blood using the

non-enzymatic method [7]. The latter was first subjected to DNA quantitation using the fluorimetric method with PicoGreen dye and Fluoroscan Ascent FI apparatus (Thermolabsystem).

Human peripheral blood and peripheral blood deposited on cotton material collected from cat (*Felis catus*), dog (*Canis familiaris*), horse (*Equus caballus*), rat (*Rattus norvegicus*), sheep (*Ovis avies*), goat (*Capra hircus*), mouse (*Mus musculus*), swan (*Cygnus olor*) was subjected to DNA extraction using the non-enzymatic method according to Lahiti et al. [7]. In the case of cow (*Bos taurus*), pig (*Sus scrofa domestica*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), duck (*Anas discors*), roe deer (*Odocoileus virginianus*), boar (*Sus scrofa*), fox (*Vulpes vulpes*), chicken (*Gallus gallus*), turkey (*Meleagris gallopavo*) and salmon (*Salmo salar*), DNA was extracted from muscular tissue using proteinase K digestion and double extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. Hair roots provided by the zoo in Gdansk Oliwa were used for chimpanzee (*Pan troglodytes*) DNA extraction.

2.2. Primers and probes used for real-time PCR

All experiments were conducted using primers and probes described in a study by Walker and co-workers [14]. The oligonucleotides were synthesised by Applied Biosystems and the sequences were as follows:

- primer 1: 5'CTTGCACTGAGCCGAGATT 3';
- primer 2: 5'GAGACGGAGTCTCGCTCTGTC 3';
- TaqMan probe: 5'VIC
ACTGCAGTCCGCAGTCCGGCCT 3' MGBNFQ.

2.3. Chemicals used for real-time PCR

All RT-PCR reactions were done using commercial kits from Applied Biosystems: Quantifiler Human DNA Quantification Kit, SYBR[®] Green RT-PCR Reagents and TaqMan[®] Universal PCR Master Mix. Experiments with Quantifiler kit used for quantitation of DNA concentration were performed according to the manufacturer's recommendations. Determination of nuclear DNA concentration and examination of melting curves were performed using RT-PCR with fluorescent dye SYBR Green I. The reaction mixtures consisted of: 1.25 µl of SYBR Green PCR Buffer (1 ×), 0.125 U of UNG, 1 µM of both primers, 0.5 mM dNTP Mix, 5.0 mM of MgCl₂, 0.625 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase, template DNA and water up to the final volume of 12.5 µl.

The mixture used for nuclear DNA quantitation using the multiplex reaction consisted of TaqMan Uni-

versal PCR Master Mix (1 ×), 1 µM of both primers, TaqMan probe (100 nM), template DNA and water up to 12.5 µl.

2.4. Quantitation of DNA concentration using real-time PCR

DNA quantitation using the real-time PCR method was conducted using the 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Amplifications were carried out in a total volume of 12.5 µl using 96-well reaction plates (Applied Biosystems). Standard curves were prepared using consecutive dilutions of DNA standard. Positive control samples of known DNA concentration and negative controls (NTC) containing water instead of template DNA were amplified in each experiment. All real-time PCR reactions were prepared using high quality purified water (Baker B. V.) filtered with 0.2 µm filters (Schleicher & Schuell). All pipettes and tubes used for preparation of reaction mixtures were sterilised in a UV transmitter (Herolab). DNA amplification was conducted using the following conditions: 50°C/2 min, 95°C/10 min and 50 cycles of 95°C/15 s and 60°C/1 min. Furthermore, in experiments studying melting curves of PCR products with SYBR Green I dye, after the amplification reaction, denaturation of the obtained products was additionally performed. The products were heated at a rate of 2°C per minute from 60 to 95°C. Analysis of results was performed with ABI PRISM 7900HT Sequence Detector Software (Applied Biosystems). Separate standard curves were used for determination of DNA concentration in analysed samples in all conducted experiments. Correlation coefficients in each case were higher than 0.99.

3. Results and discussion

3.1. Selection of the analysed sequences

The basic criterion of selection of target DNA sequences used in experiments with quantitative PCR is to exclude the possibility of their variation. Therefore, it is desirable to use human DNA sequences which are highly conserved for both nucleotide composition and number of copies. Analysis of these kinds of DNA sequences guarantees that the result of quantitative determinations is not dependent on an individual's particular genotype. Examinations based on multi-copy DNA sequences allow quantitative analyses to be conducted with smaller amounts of template DNA. Although DNA samples that originate from various

individuals may differ according to the actual number of copies of dispersed repetitive elements, which are very numerous in the human genome, these differences are negligible [9]. In the present work, quantitative measurements were based on the Alu Yb8 sequence, which is highly conserved and occurs in the human genome in many copies. This sequence was previously used in the multiplex PCR assay designed by Walker and co-workers [14]. So far, 1852 sequences of Alu Yb8 have been identified in the human genome. 75% of these elements are conserved (i.e. present in all individuals) and the remaining 25% vary in different individuals [2]. Therefore, a single haploid genome contains approximately 1389 conserved sequences and 463 loci of Alu Yb8, which optionally may be present in DNA. Thus, by extrapolation, the single diploid cell should contain as many as 2778 and 926 of these sequences respectively. Alu elements which are present in the human genome in many copies seem to be perfect for DNA quantitation. The sequence Alu intra-Yb8 which was used in our experiments is 69 bp long and is specific for the human genome [14]. It contains a repetitive 7 bp region characteristic for the subfamily Yb, which is a target site for the TaqMan probe and a specific nucleotide for the subfamily Yb8, which is complementary to the nucleotide at the 3' end of the first primer.

3.2. Specificity of amplification

In order to perform relevant amplification of the target DNA sequence, the applied PCR primers must be specific in order to avoid amplification of pseudogenes or other related sequences. An important issue is appropriate amplicon size, which should be in the range between 50 to 150 bp. Short amplicons are more desirable because they allow more efficient amplification and are crucial in the case of heavily degraded DNA [5]. In order to confirm specificity of amplification of the nuclear Alu intra-Yb8, a real-time PCR experiment was conducted with SYBR Green I intercalating dye and specific primer pair, which enabled analysis of melting curves of the generated products. In order to demonstrate changes of fluorescence emission, melting curves were drawn as a negative first derivative of the measured signal ($-dF/dT$). This differentiable function allows us to define the most narrow temperature range with the highest fluorescence change visible on the chart as a single peak. The peak indicates the point of transformation of the dsDNA into ssDNA (Figure 1). The properly optimised PCR method should reveal only one amplicon, which is visible as a single signal on the DNA melting curve [5, 12].

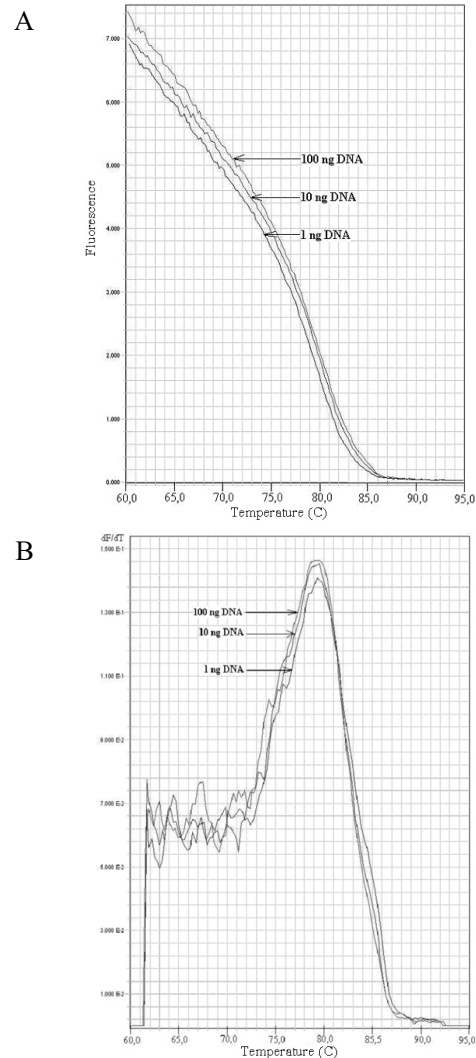


Fig. 1. Graph showing the correlation between the fluorescence and melting temperature of the Alu Intra-Yb8 sequence for three human DNA concentrations (Panel A) and melting curve of the Alu Intra-Yb8 sequence for three human DNA concentrations (Panel B).

Analysis of dissociation curves for Alu Yb8 performed for three different template DNA concentrations shows that T_m is close to 79°C and indicates the presence of only one PCR product for this amplification reaction using this primer set. However, the obtained peak is relatively wide. This may indicate heterogeneity of the generated sequence, which may be a result of, for example, substitution of a single nucleotide or amplification of DNA elements from a closely related Alu subfamily. The obtained results indicate that the tested PCR reaction is specific for the target sequence under optimal conditions. Detailed examination of the melting curve reveals no additional peaks from potential primer dimers, which means that

primer concentrations were properly optimised and the assay is not affected by error caused by unspecific primer hybridisations.

3.3. Calibration curve and determination of degree of its linearity

The number of copies of the sequence that is studied using real-time PCR determines the absolute amount of DNA specified in mass units. The results of these tests are evaluated using the standard curve method, which relies on comparative analysis of the fluorescence signal measured for each quantified sample and standards of known DNA concentrations analysed during the same experiment. The linearity of the tested real-time PCR reaction was verified by amplification of serial dilutions of DNA standard. The analysis encompassed the following DNA concentrations: 200 ng/ μ l, 100 ng/ μ l, 20 ng/ μ l, 5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 0.2 ng/ μ l, 0.02 ng/ μ l, 0.002 ng/ μ l. The obtained C_t values were used for preparation of calibration curves for this nuclear DNA assay (Figure 2). DNA concentrations in the analysed samples were determined by ABI 7900 software and were based on comparisons of C_t values obtained for these samples and the calibration curve reflecting a correlation between C_t values and amounts of DNA standards.

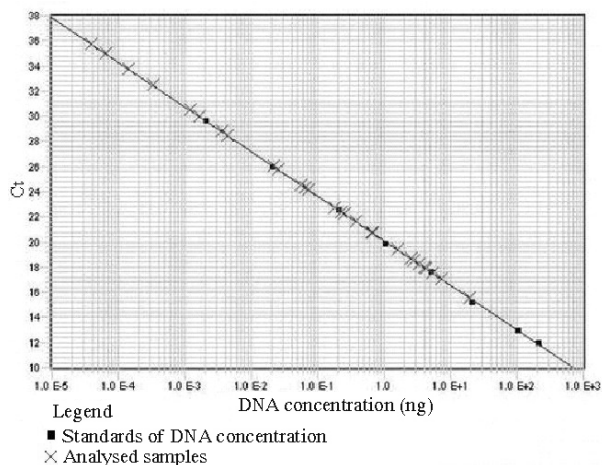


Fig. 2. Calibration curve reflecting the relation between C_t value and amount of DNA standard. Correlation coefficient = 0.9996. Standard curve declivity value = 3.5472. Efficiency of the reaction = 0.9138 (theoretical efficiency of PCR reaction calculated according to [11]).

The method of determination of DNA concentration based on analysis of the Alu Yb8 sequence was found to reveal a wide range of detectable concentrations spread across six orders of magnitude from 200 ng to 2 pg. The correlation coefficient characteris-

tic for the obtained standard curve is at a high level (0.9996) and this confirms the high usefulness of the verified RT-PCR method for determination of DNA concentration in a very wide range of DNA amounts. Obtaining such a high value for the correlation coefficient shows that the RT-PCR assay performed efficiently under reduced volume of reaction mixture, which equalled 12.5 μ l. This modification was introduced because of economic reasons. The observed sensitivity of the test is similar to that noted for the same Alu sequence analysed in duplex (nDNA and mtDNA) and triplex (nDNA, mtDNA and Y-DNA) by Walker and co-workers (1 pg) [14]. Figure 3 presents kinetics of the reaction depending on the PCR cycle and different DNA concentrations from 200 to 0.002 ng/ μ l.

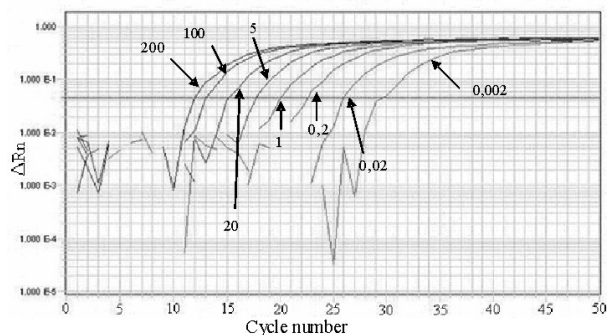


Fig. 3. The dependence of fluorescence characteristic for VIC[®] marker on number of cycles of PCR reaction calculated for samples containing DNA concentrations: 200, 100, 20, 5, 1, 0.2, 0.02, 0.002 ng and respective values of C_t : 12.05, 13.04, 15.31, 17.75, 19.98, 22.65, 26.03, 29.78.

The result $C_t = 15$ obtained for DNA concentration 20 ng/ μ l shows the high efficiency of the assay. Moreover, the C_t value 29.78 obtained for template concentration 0.002 ng/ μ l shows the high sensitivity of the method, which allows detection of DNA contained in merely one haploid cell. Such a high sensitivity is obviously the result of the high number of Alu copies characteristic of a single human genome.

3.4. Species specificity of the RT-PCR DNA quantitation assay

One of the crucial elements of validation of methods in forensic genetics is demonstration of the species specificity (of the given method). The STR loci used for genetic identification purposes are specific for human and Primate DNA. When validating the RT-PCR method, it was checked whether nDNA primers are species specific for the human genome. To accomplish this, DNA extracted from several common domestic,

wild and farmed animal species and chimpanzee was subjected to analysis. Examinations encompassed 15 species of mammals (including chimpanzee), 2 species of birds and one species of fish. The results are summarised in Figure 4.

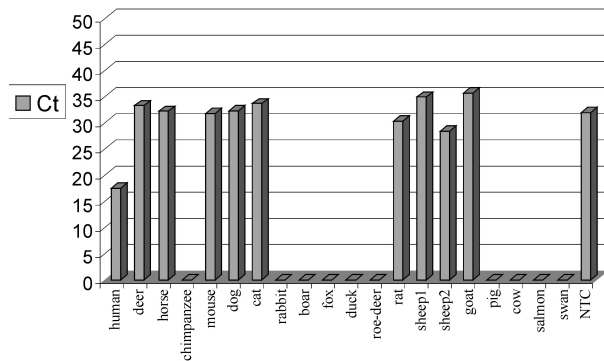


Fig. 4. Study on species specificity of nDNA amplification using the RT-PCR assay. In this experiment, 5 ng of DNA extract from human and 18 different animal species was analysed. The graph shows the correlation between C_t value and the species of origin of the amplified DNA. NTC – non template control.

A weak fluorescence signal was noted for the analysed Alu sequence in the case of 8 animal species (horse, deer, mice, dog, cat, rat, sheep, goat). However, the amplification signal in the case of these species was found to be approximately at the level of the negative control (NTC), which gives a positive signal only in cycle 32. This means that the theoretical amount of DNA corresponding to this result equals merely 0.45 pg, and this value is much lower than the previously established sensitivity of the RT-PCR assay and might not be the result of the real presence of DNA. If results obtained for the negative control are considered as reflecting the detection limit, all values found below such a limit ought to be treated as background. Such noises may be caused for instance by minimal signal related to incomplete fluorescence quenching of the reporter markers. Higher values of C_t were observed in the case of rat and sheep DNA samples. This result is partially concordant with another study on Alu Yb8 sequences [14]. In that study, an amplification signal stronger than for NTC was also noted in the case of some animal samples. The results of the experiment with animal DNA are also concordant with the results of another study performed on Alu sequences used as a target in an RT-PCR assay [9]. In that study amplification of non-primate animal DNA occurred with an efficiency corresponding to 0.5 pg of human DNA.

Therefore it was verified that the tested method of quantitative analysis of nuclear DNA is a very sensitive and reliable technique which allows determination of DNA concentration at the level of a single haploid cell. Moreover, since negative amplification is observed for the chimpanzee, which is a very close relative to the human species, this indicates that the method is very specific for human DNA.

References

1. Applied Biosystems Quantifiler Human DNA Quantification Kit and Quantifiler Y Human male DNA Quantification Kit user's manual, Applied Biosystems, Foster City 2003.
2. Batzer M. A., Carroll M. L., Roy-Engel A.M. [et al.], Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity, *Journal of Molecular Biology* 2001, 311, 17–40.
3. Butler J.M., Sample collection, DNA extraction, and DNA quantitation, [in:] *Forensic DNA Typing*, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2005.
4. DNA Advisory Board, Standards for Forensic DNA Testing Laboratories, Standard 9.3., 1998, <http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/forensic.htm>.
5. Dorak M. T., Real time PCR, www.dorak.info/genetics/realtime.html.
6. Fox J. C., Cave C. A., Schumm W., Development, characterization, and validation of a sensitive primate-specific quantitation assay for forensic analysis, *BioTechniques* 2003, 34, 314–322.
7. Lahiri D. K., Bye S., Nurnberger J. L. [et al.], A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1992, 25, 193–205.
8. Mandrekar M. N., Erickson A. M., Kopp K. [et al.], Development of a human DNA quantitation system, *Croatian Medical Journal* 2001, 42, 336–339.
9. Nicklas J. A., Buel E., An Alu-based, MGB Eclipse real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples, *Journal of Forensic Science* 2005, 50, 1081–1090.
10. Pawłowski, R., Maciejewska, A. Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in northern Poland, *International Journal of Legal Medicine* 2000, 114, 45–49.
11. Stratagene, Mx 4000TM, Multiplex Quantitative PCR System.
12. Swango K. L., Timken M. D., Chong M. D. [et al.], A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples, *Forensic Science International* 2006, 158, 14–26.

13. Walker J. A., Hughes D. A., Hedges D. J. [et al.], Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements, *Genomics* 2004, 83, 518–527.
14. Walker J. A., Hedges D. J., Perodeau B. P. [et al.], Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification, *Analytical Biochemistry* 2005, 337, 89–97.
15. Walsh P. S., Varlaro J., Reynolds R., A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA, *Nucleic Acids Research* 1992, 20, 5061–5065.

Corresponding author

Ryszard Pawłowski
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej w Gdańsku
ul. Dębowa 23
PL 80-204 Gdańsk
e-mail: richard@amg.gda.pl

OZNACZANIE STĘŻENIA JĄDROWEGO DNA METODĄ TECHNIKI PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

1. Wstęp

Pomiar ilości DNA w próbkach pochodzących z materiału biologicznego jest niezwykle istotnym zagadnieniem dla genetyki sądowej m.in. ze względu na prawidłową amplifikację *loci* typu STR techniką PCR [3]. Zagadnieniu temu poświęcony jest także standard 9.3 DAB [4] dotyczący kontroli jakości pracy laboratoriów genetyki sądowej, który mówi, że „laboratorium powinno posiadać i stosować procedury oznaczania stężenia DNA człowieka w analizowanych próbkach”. W tym celu próbki przygotowywane do amplifikacji lub badań z zastosowaniem innych technik biologii molekularnej winne być poddawane pomiarom stężenia DNA. Od szeregu lat dostępnych jest wiele metod pomiaru ilości DNA, od spektrofotometrii UV poczynając, a na technikach ilościowego PCR kończąc. Ze względu na specyfikę badanego materiału genetyka sądowa wymaga zastosowania bardziej wysublimowanych metod pozwalających na określenie nie tylko całkowitego stężenia DNA, ale w szczególności DNA człowieka, który to materiał jest najczęściej przedmiotem analiz. Użycie niewłaściwej ilości DNA do reakcji PCR prowadzi zazwyczaj do licznych trudności interpretacyjnych. W przypadku użycia nadmiaru DNA pojawiają się między innymi dodatkowe frakcje, zwiększa się udział frakcji n w stosunku do $n + 1$ w wyniku niepełnej adanytacji, wzrasta procentowy udział pików typu *stutter* oraz znaczącej zmianie ulega wzajemny stosunek alleli pomiędzy poszczególnymi *loci*. Z kolei użycie zbyt małej ilości DNA prowadzi do powstawania niekompletnych profili, dając nadreprezentację krótkich amplikonów i homozygot [10]. Do metod pozwalających na oznaczenie stężenia DNA człowieka należy między innymi półilościowa technika *slot-blot* wykorzystująca sondę DNA swoistą dla sekwencji DNA alfa satelitarnego człowieka i naczelnych obecna na 17 chromosomie człowieka. Ta dosyć czasochłonna metoda należy do stosunkowo czułych, dając możliwość wykrycia DNA zarówno jedno-, jak i dwuniciowego na poziomie ok. 10–20 pg [15] przy zastosowaniu sond znakowanych radioaktywnie. Na tej właśnie metodzie oparty jest komercyjny zestaw Quantiblot Human Quantitation Kit firmy Applied Biosystems. Innym komercyjnym zestawem do pomiaru DNA człowieka metodą luminometryczną jest zestaw AluQuant firmy Promega. Zestaw ten umożliwia pomiar DNA w oparciu o powtórzenia typu Alu występujące w dużej ilości w ludzkim genomie i pozwala na oznaczenie stężeń DNA w zakresie 0,1–50 ng [8]. Do innego typu metod pomiaru stężenia DNA człowieka należą metody powielania pojedynczych

loci typu STR oparte na reakcji PCR typu *end-point* [6]. W metodzie tej powieleniu ulegają zarówno badane próbki, jak i próbki o znanym stężeniu, które służą do wykreślenia krzywej kalibracyjnej. Czułość metody szacuje się na ok. 100 pg DNA.

Wydaje się, że do najbardziej wiarygodnych metod pomiaru ilości DNA człowieka należą metody oparte na technice PCR w czasie rzeczywistym. Wynika to z faktu, że pomiarowi ulega tylko ten DNA, który faktycznie poddaje się amplifikacji nawet pomimo działania niekorzystnych czynników, jakimi są m. in. inhibitory (hem, kwas humusowy, tanina) czy silnie zdegradowany DNA. Tym sposobem podczas pomiaru uwzględnia się nie tylko ilość, ale również i jakość matrycowego DNA. Na tej metodzie oparte są komercyjne zestawy do pomiaru ilości DNA człowieka: Quantifiler jak i Quantifiler Y oznaczające odpowiednio *loci* hTERT oraz SRY [1]. Czułość tych metod szacowana jest na ok. 20 pg ludzkiego DNA, czyli ok. 3 somatycznych komórek.

Niniejsza praca jest próbą adaptacji metody swoistego oznaczania ilości DNA człowieka z zastosowaniem amplifikacji sekwencji Alu. Elementy Alu są retrotranspozonomami o długości 300 pz powielonymi do ponad 1 miliona kopii w ludzkim genomie przez ostatnie 65 milionów lat, stanowiąc więcej niż 10% sekwencji ludzkiego DNA. Stwierdzono, że amplifikacja metodą PCR występujących w wielu kopiach sekwencji Alu jest bardziej czułą metodą ilościowego pomiaru jądrowego DNA niż typowe procedury oparte na technice hybrydyzacji (np. *slot blot*) przy jednoczesnym zachowaniu zalet PCR dla pojedynczego lokusa. Przykładowo, amplifikowane produkty mają jednakową wielkość i temperaturę topnienia. Ponadto amplikony te są wystarczająco krótkie (69 pz dla Yb8), aby pokonać trudności związane z uszkodzeniem lub degradacją matrycowego DNA. Elementy Alu charakterystyczne są dla genomu naczelnych (rząd: *Primates*) i człowieka. Natomiast niektóre z młodszych ewolucyjnie podrodzin tej grupy, takie jak Ya5 i Yb8, są specyficzne tylko dla ludzkiego genomu [13].

W doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy zastosowano właśnie sekwencję Alu Yb8. Jej amplifikacja następująca jednocześnie z wielu *loci* ludzkiego genomu daje w efekcie jednorodny produkt, a więc reakcja ta, wykorzystując wiele takich samych sekwencji, posiada wszystkie zalety eksperymentu monopleksowego. Przeprowadzone badania oparte zostały na powielaniu sekwencji Alu Yb8 metodą PCR w czasie rzeczywistym, którą wykorzystał Walker i in. [14] w reakcji PCR typu multipleks (kompleksowy PCR) oznaczającej zarówno jądrowy, mitochondrialny, jak i DNA z chromosomu Y.

Niniejsza praca jest próbą zastosowania opisanej sekwencji typu Alu do ilościowego oznaczania DNA człowieka metodą RT-PCR w zmodyfikowanych warunkach eksperymentalnych z zastosowaniem reakcji monopleks oraz sondy typu TaqMan. Zakres badań obejmował ustalenie eksperymentalnych warunków procedury przeprowadzenia metody, jak i ocenę wiarygodności wyników pomiarów. Zamierzeniem podjętych badań było również wyznaczenie takich uniwersalnych parametrów reakcji, aby metodę tę można było wykorzystać do celów medyczo-sądowych.

2. Materiały i metody

2.1. Badane próbki

Jako standardy ilości DNA wykorzystywano ludzki DNA o stężeniu 200 ng/ l, wchodzący w skład zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), ludzki DNA o stężeniu 10 ng/ l (9947A, Promega) oraz ludzki DNA wyizolowany z krwi obwodowej mężczyzny metodą nieenzymatyczną [7]. Jego stężenie wyznaczono przy użyciu metody fluorymetrycznej z zastosowaniem barwnika PicoGreen i aparatu Fluorokan Ascent FL firmy ThermoLabsystem.

Analizie poddano próbki ludzkiego DNA izolowane metodą nieenzymatyczną wg Lahiri i in. [7] oraz DNA pochodzący od kota (*Felis catus*), psa (*Canis familiaris*), konia (*Equus caballus*), szczura (*Rattus norvegicus*), owcy (*Ovis aries*), kozy (*Capra hircus*), myszy (*Mus musculus*), łabędzia (*Cygnus olor*) izolowany z krwi obwodowej naniesionej na bibułę filtracyjną. DNA pochodzący od krowy (*Bos taurus*), świni (*Sus scrofa domestica*), królika (*Oryctolagus cuniculus*), kaczki (*Anas discors*), sarny (*Odocoileus virginianus*), dzika (*Sus scrofa*), lisa (*Vulpes vulpes*), kurczaka (*Gallus gallus*), indyka (*Meleagris gallopavo*) i łososia (*Salmo salar*) izolowano z mięśni, stosując trawienie proteinazą K i podwójną ekstrakcję mieszaniną fenol-chloroform-alkohol izoamyłowy. DNA pochodzący od szympansa (*Pan troglodytes*) wyizolowano z cebulek włosów (materiał udostępniony dzięki uprzejmości Ogrodu Zoologicznego w Gdańsku Oliwie).

2.2. Startery i sondy do PCR w czasie rzeczywistym

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono z zastosowaniem starterów i sondy opisanych w pracy Walker i in. [14]. Syntezę oligonukleotydów przeprowadzono w firmie Applied Biosystems przyjmując następujące sekwencje:

- starter 1: 5'CTTGACAGTGAGCCGAGATT 3';
- starter 2: 5'GAGACGGAGTCTCGCTCTGTC 3';

- sonda typu taqman: 5'VIC
ACTGCAGTCCGAGTCCGGCCT 3' MGBNFQ.

2.3. Odczynniki do PCR w czasie rzeczywistym

Do badań techniką RT PCR wykorzystywano następujące zestawy odczynników firmy Applied Biosystems: Quantifiler Human DNA Quantification Kit, SYBR[®] Green RT-PCR Reagents oraz TaqMan[®] Universal PCR Master Mix. Oznaczenia ilości DNA z zastosowaniem zestawu Quantifiler prowadzono wg zaleceń producenta.

Oznaczanie ilości DNA jądrowego i badanie krzywych topnienia prowadzono metodą RT PCR z zastosowaniem fluoroscencyjnego markera SYBR Green I w mieszaninach reakcyjnych zawierających następujące końcowe objętości odczynników: SYBR Green PCR Buffer (1) 1,25 ml, UNG 0,125 U, oba startery o stężeniu 1 M, dNTP Mix 0,5 mM, MgCl₂ 5,0 mM, polimerazę DNA AmpliTaq Gold 0,625 U oraz matrycowy DNA i wodę uzupełniającą mieszaninę reakcyjną do 12,5 l.

Każda próbka badana przy użyciu reakcji monopleksowych dla jądrowego DNA zawierała mieszaninę o następującym składzie: TaqMan Universal PCR Master Mix (1), oba startery o stężeniu 1 M, sondę typu TaqMan (100 nM) oraz matrycowy DNA i wodę uzupełniającą mieszaninę reakcyjną do 12,5 l.

2.4. Pomiar ilości DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym

Pomiary stężenia DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym prowadzono, stosując aparat do PCR w czasie rzeczywistym firmy Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR System. Amplifikację prowadzono w objętości 12,5 ml na 96-studzienkowej płytce reakcyjnej (Applied Biosystems). Krzywe standardowe przygotowano z zastosowaniem kolejnych rozcieńczeń standardu ilości DNA. Ponadto w każdym eksperymencie przeprowadzono amplifikację kontroli pozytywnej o znanej ilości DNA i kontroli negatywnej (NTC), zastępując roztwór DNA równoważną objętością wody. Do wszystkich mieszanin reakcyjnych badanych metodą PCR w czasie rzeczywistym stosowano wodę o wysokim stopniu czystości (Baker BV) przesączoną przez sączki 0,2 mm (Schleicher & Schuell). Pipety oraz próbówki Eppendorfa służące do sporządzania mieszanin reakcyjnych każdorazowo wyjaławiano w emiterze promieniowania UV firmy Herolab.

Amplifikację DNA prowadzono w następujących warunkach: 50°C/2 min, 95°C/10 min, a następnie 50 cykli 95°C/15 s i 60°C/1 min. Ponadto w doświadczeniach badających krzywe topnienia produktów PCR z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I dodatkowo po ukończeniu amplifikacji przeprowadzono denaturację pow-

stałych produktów, podgrzewając je z szybkością 2°C na minutę od 60 do 95°C.

Analizę wyników przeprowadzono za pomocą programu komputerowego ABI PRISM 7900HT Sequence Detector Software (Applied Biosystems). Dla każdego eksperymentu stworzono oddzielne krzywe standardowe, aby wyznaczyć ilości DNA w każdej nieznannej próbce. Współczynnik korelacji dla krzywej standardowej w każdym eksperymencie był większy niż 0,9900.

3. Wyniki i dyskusja

3.1 Wybór amplifikowanych sekwencji

Podstawowym kryterium wyboru docelowych sekwencji DNA dla doświadczeń z użyciem ilościowego PCR jest wykluczenie możliwości ich polimorfizmu, a zatem pożądanym jest, by były to sekwencje dobrze konserwowane w ludzkim genomie zarówno pod względem składu nukleotydów, jak i liczby kopii. Dzięki temu wynik takich oznaczeń ilościowych nie będzie zależny od genotypu badanej osoby.

Sekwencje obecne w badanym genomie w wielu kopiach pozwalają na pomiary ilościowe przy użyciu mniejszej ilości matrycy. Mimo że próbki DNA pochodzące od poszczególnych osób mogą różnić się pod względem liczby kopii takich elementów, w przypadku rozszaniach, powtórzonych sekwencji bardzo licznie występujących w ludzkim genomie, to fluktuacje takie są mało znaczące [9]. W niniejszej pracy do oznaczeń ilościowych wybrano dobrze konserwowaną i występującą w wielu kopiach w ludzkim genomie sekwencję Alu Yb8. Zastosowanie tej sekwencji w reakcji kompleksowego PCR opisali Walker i in. [14]. Aktualnie zidentyfikowano obecność 1852 elementów Yb8 w genomie człowieka, z których 75% jest konserwowana (obecna u wszystkich osobników), a 25% z nich wykazuje polimorfizm pod względem występowania [2]. Zatem na jeden haploidalny genom przypada około 1389 utrwalonych sekwencji i 463 loci polimorficznych, które mogą, lecz nie muszą zawierać Alu Yb8. Przeliczając te wartości na zawartość w pojedynczej, diploidalnej komórce, otrzymujemy odpowiednio 2778 i 926 elementów. Elementy Alu występujące w wielu kopiach w ludzkim DNA wydają się idealne do pomiarów jego ilości. Amplifikowana w eksperymentach RT-PCR sekwencja intra-Alu Yb8 o długości 69 pz jest specyficzna tylko dla genomu człowieka [14]. Posiada powtórzony region długości 7 pz w miejscu hybrydacji sondy TaqMan charakterystyczny dla podrodziny Yb i specyficzną zasadę na końcu 3' pierwszego ze starterów, charakterystyczną dla podrodziny Yb8.

3.2. Potwierdzenie specyficzności amplifikacji

Aby przeprowadzić amplifikację tylko wyznaczonego odcinka DNA, para starterów użytych do reakcji PCR musi być specyficzna dla docelowej matrycy, aby zapobiec powielaniu pseudogenów lub innych pokrewnych sekwencji. Istotnym parametrem jest wybór amplikonu o wielkości mieszczącej się w zakresie od 50 do 150 pz. Krótkie amplikony są bardziej pożądane ze względu na wyższą wydajność amplifikacji oraz w przypadku silnie zdegradowanego DNA [5]. Aby potwierdzić docelową specyficzność amplifikacji sekwencji genomowej Alu Intra-Yb8, przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem barwnika interkalującego SYBR Green I i starterów specyficznych dla wyżej wymienionej sekwencji oraz wykonano analizę krzywych topnienia powstałych produktów. Aby bardziej uwidocznić zmiany emisji fluorescencji, krzywe topnienia wykreślono jako ujemną pierwszą pochodną mierzonego sygnału ($-dF/dT$). Ta funkcja różniczkowa pozwala na wytypowanie najwęższego przedziału temperatury o jak największej zmianie fluorescencji widocznej na tym wykresie jako pojedynczy pik wskazujący na moment przejścia dsDNA w formę ssDNA (rycina 1). Właściwie opracowana metoda PCR powinna charakteryzować się obecnością jednego amplikonu, a tym samym jednego sygnału na krzywej topnienia DNA [5, 12].

Analiza krzywych dysocjacji sekwencji Alu Yb8 przeprowadzona dla trzech różnych stężeń DNA matrycowego wskazuje, że T_m jest bliska 79°C oraz na obecność tylko jednego produktu PCR dla tej reakcji przy użyciu danej pary starterów. Jednak pik ten jest stosunkowo szeroki. Może to świadczyć o heterogenności tej sekwencji, wynikającej np. z substytucji jednego nukleotydu lub o amplifikacji elementów z blisko spokrewnionej podrodziny Alu. Innymi słowy, badana reakcja jest specyficzna względem docelowej sekwencji dla optymalnych warunków doświadczenia. Analiza krzywej topnienia wykazuje również brak pików pochodzących od ewentualnych dimerów utworzonych przez hybrydujące startery, co oznacza, iż stężenia tych ostatnich zostały dobrze dobrane właściwie, a sam pomiar nie jest obciążony błędem spowodowanym niespecyficzną hybrydacją starterów.

3.3. Krzywa kalibracyjna i określenie zakresu jej prostoliniowości

Liczba kopii sekwencji badanej metodą PCR w czasie rzeczywistym określa bezwzględną ilość DNA wyznaczoną w jednostkach masy. Do kalkulacji wyników uzyskanych w tych oznaczeniach stosowana jest metoda krzywej standardowej, w której sygnał fluorescencji mierzony dla każdej badanej próbki porównywany jest z pomiarami otrzymanymi w tym samym eksperymencie dla

znanych ilości DNA. Aby wyznaczyć zakres prostoliniowości badanej reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzono amplifikację szeregu rozcieńczeń standardowego DNA o stężeniach wynoszących 200 ng/ml, 100 ng/ l, 20 ng/ l, 5 ng/ l, 1 ng/ l, 0,2 ng/ l, 0,02 ng/ l, 0,002 ng/ l. Na podstawie otrzymanych wyników (wartości C_t) utworzono krzywą kalibracyjną dla jądrowego DNA (rycina 2). Stężenia badanych próbek wyznaczane były przez oprogramowanie ABI7900, które porównywało ich wartości C_t z krzywą kalibracyjną będącą zależnością C_t od stężeń standardów ilości DNA.

Oznaczenie stężeń DNA oparte na sekwencji Alu Yb8 wykazało szeroki zasięg wykrywanych stężeń mieszczący się na poziomie sześciu rzędów wielkości od 200 ng do 2 pg. Uzyskana krzywa standardowa charakteryzuje się wysokim współczynnikiem korelacji (0,9996), co dodatkowo potwierdza ogromną przydatność badanej metody RT-PCR do pomiaru stężenia DNA w bardzo szerokim zakresie. Uzyskanie tak wysokiego współczynnika korelacji jest tym bardziej istotne, że reakcję RT-PCR prowadzono w bardzo zredukowanej objętości mieszaniny reakcyjnej (12,5 ml), mając na celu obniżenie kosztów pojedynczego oznaczenia. Uzyskana czułość badanej reakcji jest zbliżona do tej (1 pg), jaką obserwowali Walker i in. [14] dla tej samej sekwencji Alu, jednak w reakcjach dupleksowych (nDNA i mtDNA) i tripleksowych (nDNA, mtDNA i Y-DNA).

Rycina 3 przedstawia kinetykę reakcji w zależności od cyklu PCR oraz dla różnych stężeń DNA od 200 do 0,002 ng/ l.

O bardzo wysokiej wydajności reakcji świadczy uzyskanie wartości $C_t = 15$ dla stężenia DNA 20 ng/ l. Natomiast wartość $C_t = 29,78$ otrzymana dla stężenia DNA matrycowego wynoszącego 0,002 ng/ml jest dowodem ogromnej czułości metody pozwalającej na wykrywanie ilości DNA występującego zaledwie w jednej haploidalnej komórce. Jest to bezsprzecznie wynikiem ogromnej liczby kopii Alu przypadającej na ludzki genom.

3.4. Potwierdzenie gatunkowej specyficzności oznaczania DNA człowieka metodą RT-PCR

Jednym z bardzo istotnych elementów walidacji metody w genetyce sądowej jest wykazanie ich swoistości gatunkowej. Stosowane do identyfikacji osobniczej *loci* typu STR są specyficzne dla DNA człowieka oraz naczelnych. Walidując metodę RT-PCR, sprawdzono, czy startery dla nDNA są swoiste gatunkowo dla genomu człowieka. W tym celu badaniom poddano DNA pochodzący od kilkunastu różnych powszechnie spotykanych gatunków zwierząt domowych, dzikich, hodowlanych oraz szympansa. Badaniom poddano 15 gatunków ssaków (w tym szympansa), 2 gatunków ptaków i 1 gatunku ryby. Wyniki badań ilustruje rycina 4.

Sygnal fluorescencji dla sekwencji Alu wykazał DNA 8 gatunków zwierząt (koń, jeleń, mysz, pies, kot, szczur, owca, koza). Jednak amplifikacja tych próbek kształtowała się w przybliżeniu na poziomie kontroli negatywnej (NTC), która daje pozytywny sygnał dopiero w 32 cyklu. Teoretyczna ilość DNA jej odpowiadająca wynosi 0,45 pg, a zatem jest to wartość dużo niższa od wyznaczonej czułości RT-PCR i niekoniecznie musi odpowiadać rzeczywistym wynikom. Jeżeli wyniki dla kontroli negatywnej można przyjąć za granicę wykrywalności eksperymentu, to wszystkie uzyskane wartości znajdujące się poniżej niej należy uznać za poziom tła. Takie szумы mogą być spowodowane np. minimalnym sygnałem wynikającym z niecałkowitego wygaszenia fluorescencji znaczników reporterowych. Wyższe wartości C_t obserwowano dla DNA szczura i barana. Są to wyniki częściowo zgodne z innymi badaniami wykorzystującymi te same sekwencje Alu Yb8 [14], w których uzyskano amplifikację sekwencji Alu w próbkach ze zwierzęcym DNA o sygnale przewyższającym kontrolę negatywną. Wyniki uzyskane w eksperymencie ze zwierzęcym DNA zbieżne są również z innymi doświadczeniami RT-PCR wykorzystującymi sekwencje Alu jako matrycę [9], gdzie amplifikacja materiału pochodzącego od zwierząt (nienależących do rzędu naczelnych) kształtowała się na poziomie odpowiadającemu 0,5 pg ludzkiego DNA.

Reasumując, można stwierdzić, że badana metoda ilościowego oznaczania DNA jądrowego człowieka należy do bardzo czułych i wiarygodnych metod wykrywających stężenia DNA na poziomie jednej haploidalnej komórki. Co więcej, poddane amplifikacji próbki DNA sympansa (gatunku w dużym stopniu spokrewnionego z człowiekiem) dają wynik negatywny, co wskazuje na wysoki stopień specyficzności metody dla gatunku człowieka.