



HUMAN NUCLEAR AND MALE Y-CHROMOSOME DNA QUANTIFICATION BY REAL-TIME PCR ASSAY

Agnieszka MIROWSKA¹, Ryszard PAWŁOWSKI^{2, 3}

¹ *Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, Poland*

² *Institute of Forensic Medicine, Medical University of Gdansk, Poland*

³ *Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

Abstract

The aim of the investigations was to develop a novel method of simultaneous quantitative determination of human nuclear and male Y-chromosome DNA by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for (the needs of) forensic genetics laboratories. When validating the method, the authors investigated the parameters and kinetics of both reactions. Combining two monoplex experiments in a single reaction was determined to exert no significant effect on the results and the investigators demonstrated a significant consistency between quantitative determinations of the two examined sequences. A very high sensitivity of the multiplex experiment was ensured by determination based on the AluYb8 sequences, thanks to which it was possible to detect with due accuracy at least 2 pg of human DNA. The described real-time PCR assay is sensitive to the degree of DNA fragmentation and for this reason it constitutes a prognostic tool that is helpful in selection of further DNA analytical methods. When evaluating the specificity of the reaction, the authors observed that animal DNA samples did not result in considerable amplification; nor did they interfere with human DNA determinations. Summing up, the developed new method of multiplex PCR assay not only provides reliable results of quantitative determinations of nuclear and male Y-chromosome DNA, but is also a source of information on the quality of the examined material.

Key words

Multiplex human DNA quantitation; Real-time PCR assay; Alu Yb8 sequences; Chromosome Y-specific sequence.

Received 1 July 2008; accepted 12 August 2008

1. Introduction

From the analytical point of view, determination of the amount of DNA in samples originating from biological materials is a critical stage that affects the reliability of DNA profiling by PCR assay, often leading to numerous artefacts [2, 7]. The most reliable methods of determining the amount of human DNA include those based on the real-time PCR technique, which measure genuinely amplifiable DNA, in spite of the effects of such negative factors as PCR inhibitors or highly degraded DNA. In the case of examination of biological traces, a major factor limiting the specialist

in the course of a medicolegal DNA examination is the amount of DNA; for this reason, methods are employed or sought which would allow the greatest amount of information to be obtained from the least amount of DNA. Such methods include multiplex PCR techniques that have been applied for a long time (used in forensic DNA profiling). Methods employed in DNA quantitation usually require considerable amounts of DNA, hence when measuring the amount of DNA, RT-PCR-based techniques are increasingly frequently used; they are characterised by a very high sensitivity [9].

The authors (of the present paper) have based their investigations on the method proposed by Walker

et al. [13], consisting in a simultaneous amplification of the Alu Yb8 and Y-DNA sequences by RT-PCR and allowing analysis of both autosomal DNA and Y-chromosome DNA. The present report is an attempt to develop a method for specific determination of total human DNA content (nDNA) and male DNA (Y-DNA) in a single multiplex RT-PCR (nYDNA) reaction. To determine these components, the authors employed the Alu Yb8 sequence [5, 13] and the human Y chromosome-specific sequence [13].

The aim of the present investigations was to develop a novel method of simultaneous quantitative determination of nuclear DNA and male Y-chromosome DNA by real-time PCR assay. The scope of the investigations encompassed both determination of experimental conditions for the procedure and assessment of reliability of results. A further aim of the investigations was to determine universal reaction parameters allowing effective application in a medicolegal context.

2. Material and methods

2.1. Samples

The investigations were performed using DNA quantitation standards and human and animal DNA samples, as has been described previously [5]. DNA was extracted by a non-enzymatic method [4] and DNA concentration was determined by fluorometry (PicoGreen-based assay).

2.2. Real time PCR primers and probes

Quantitation of human nuclear DNA was performed using the primers and probe as described in [5]. Quantitation of human male Y-chromosome DNA was performed employing primers and probe with the following sequences [13]:

primer 1: 5'CACCTACTGTGCCAGACAATGTG3'
 primer 2: 5'CCCATGCCATGTTTGTGCATACT3'
 probe: 5'NED TAGGCTCTAGGAATACAAA3'
 MGBNFQ.

2.3. Real time PCR reagents

RT-PCR assays using both TaqMan probes and melting curves were carried out employing commercially available kits and previously described methods [5]. In the course of multiplex determination of human nuclear DNA and Y-chromosome DNA, the reaction mixture contained: TaqMan Universal PCR

Master Mix (1), both nDNA primers (0.1 μ M), Y-DNA primers (1 μ M), VIC-labelled TaqMan probe for nDNA (100 nM), NED-labelled TaqMan probe for Y-DNA (250 nM), as well as matrix DNA and water to obtain a reaction mixture volume of 12.5 μ l.

2.4. Real time PCR quantitation of DNA

RT-PCR measurements of DNA concentration were performed under the previously described conditions [5], using an Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR System. Analysis of results of both monoplex and multiplex determinations was carried out using ABI PRISM 7900HT Sequence Detector Software (Applied Biosystems). Analyses of melting curves and DNA standard curves were performed as described previously [5].

2.5. Determination of multiplex RT-PCR assay sensitivity

In order to define the minimum amount of DNA at which DNA concentration is determinable in an nY multiplex reaction, DNA standards were diluted to obtain samples with the following concentration values: 2 ng/ μ l, 0.5 ng/ μ l, 0.25 ng/ μ l, 0.05 ng/ μ l, 0.025 ng/ μ l, and 0.002 ng/ μ l, and the volume of the samples was measured in double determinations.

2.6. Determination of the effect of animal DNA admixture on quantitation of nDNA and Y-DNA

Investigations were carried out on a mixture of male Y-chromosome DNA at three various concentration values (0.5, 2 and 10 ng) with approximately 5 ng of deer, horse or mouse DNA, as well as on a mixture of male Y-chromosome DNA (10 ng) and chimpanzee DNA (approximately 5 ng).

2.7. Determination of degraded DNA concentration levels using a Quantifiler kit and a real time PCR multiplex assay

To assess the dependence between the results of DNA concentration determinations and the degree of DNA degradation, the authors prepared male Y-chromosome DNA of varying degrees of degradation. High-molecular DNA was degraded using the DNAfree DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion) in keeping with the manufacturer's recommendations. Digestion was carried out for 2 to 120 minutes. Degradation effectiveness was confirmed by electrophore-

sis. DNA concentration levels for various degradation times were measured using the commercially available Quantifiler kit (Applied Biosystems) and a multiplex RT-PCR (nYDNA) reaction.

3. Results and discussion

3.1. Selection of amplified sequences

In the present investigations, the authors employed the Alu Yb8 sequence, which is highly conservative and characterised by a high number of copies in the human genome; the sequence was described by Walker et al. [13] and has been previously employed in DNA quantitation by multiplex RT-PCR assays [5]. Quantitative measurements of Y-chromosome DNA were based on amplification of the homologous region occurring on both sex chromosomes. The selectivity of the experiment for chromosome Y only is assured through copying the fragment of the sequence that does not occur on chromosome X due to deletion. Precisely within the above mentioned mutation, there is a domain, to which a specific TaqMan probe and the second primer of the pair of PCR primers bind. A significant issue is the fact that deletion of 90 nucleotides occurs solely in the human genome and thus a PCR reaction based on this sequence will not take place in the case of human X chromosomes, but may occur in the genome of other primate species (order: *Primates*), ir- respectively of sex [13].

3.2. Verification of amplification specificity

Investigations of nDNA sequence amplification specificity were previously carried out in a multiplex RT-PCR reaction [5]. To confirm the specificity of amplification of a sequence originating from the Y chromosome, the present authors carried out a real-time PCR reaction employing an intercalating SYBR Green I dye and primers specific for the above-mentioned sequences, and also performed an analysis of melting curves of the resultant products [3, 5].

Analysis of dissociation curves for the sequence of the homologous region on chromosome Y carried out for three different male Y-chromosome DNA concentration values indicates T_m amounting to approximately 77°C and the presence of only one PCR product for this reaction. The obtained value of T_m closely approximates the value obtained for the Alu Yb8 sequence [5]. The observed melting curve does not show the presence of primer dimers, has a narrow melting range and is characterised by a much higher homogeneity as compared to the Alu Yb8 sequence [5].

3.3. Calibration curve and determination of its linear range for Y-DNA

To determine the linear range of the investigated real-time PCR reaction, the authors amplified a series of dilutions of standard male Y-chromosome DNA with concentration values amounting to precisely $200\text{ ng}/\mu\text{l}$, $100\text{ ng}/\mu\text{l}$, $20\text{ ng}/\mu\text{l}$, $5\text{ ng}/\mu\text{l}$, $1\text{ ng}/\mu\text{l}$,

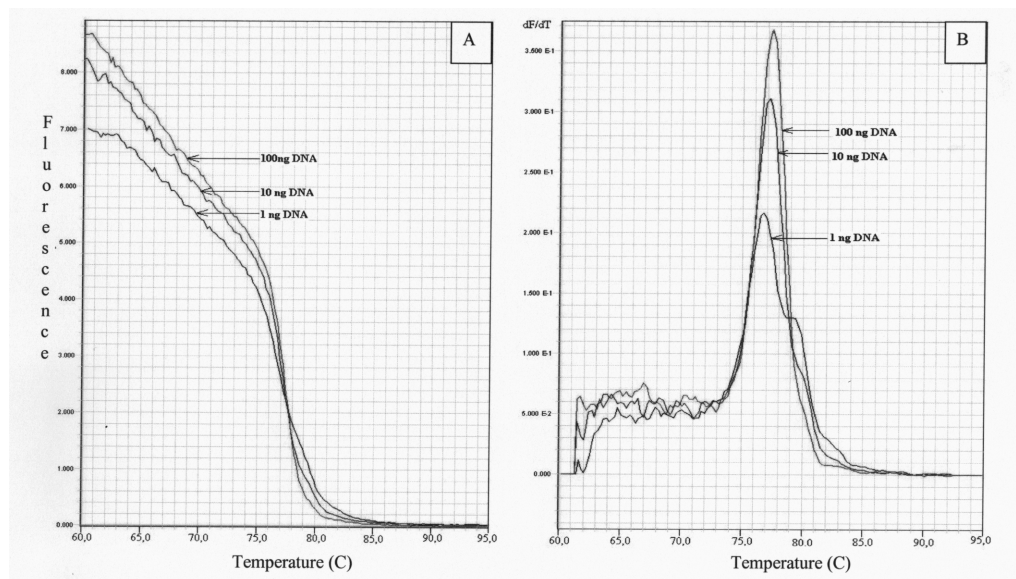


Fig. 1. Graph illustrating the dependence of fluorescence on melting temperature of the homologous region on chromosome Y for three concentration values of male Y-chromosome DNA (Panel A) and a sequence melting curve for the same sequence for three DNA concentration levels (Panel B).

0.2 ng/ μ l, 0.02 ng/ μ l and 0.002 ng/ μ l. Based on the resultant C_t values, a calibration curve was plotted for Y-DNA (Figure 2). A comparison of calibration curves for Y-DNA and the Alu Yb8 sequence described in the previous report [5] reveals a distinct divergence of the range of their values.

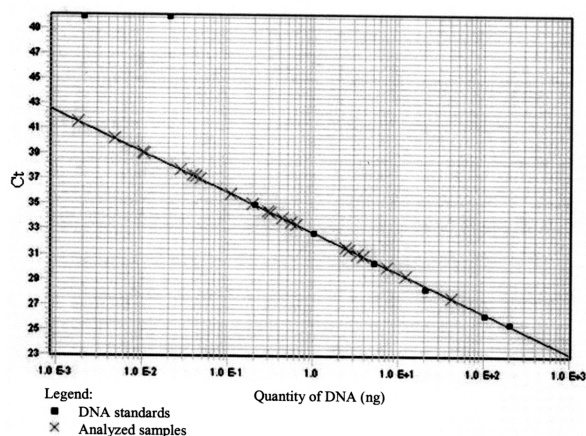


Fig. 2. Calibration curve illustrating the dependence of the C_t value on the amount of standard DNA of the homologous sequence on the Y chromosome. Correlation coefficient = 0.9987. Slope of standard curve: -3.1833 . Calculated theoretical efficiency of PCR reaction = 1.0613. Amplification performed for samples containing DNA within the range of 200 ng to 0.2 ng.

Determinations of DNA concentration values based on the Alu Yb8 sequence resulted in a much higher range of detected concentrations – by six orders of magnitude, while determinations employing the Y-DNA sequence – by four orders of magnitude only. Thus, the difference between the lower detectability limit of the two reactions, below which the obtained results will not necessarily be precise and correlated with the standard curve, is approximately one hundred-fold. This difference in sensitivity chiefly stems from the number of copies of the investigated sequences in the human genome, namely from the immense number of copies of the Alu sequence (approximately 2800) and only one copy from chromosome Y in a diploid human genome. This fact is also the cause of much faster Alu detection and by the same token, a lower value of C_t (for 1 ng, C_t equals approximately 20) as compared to the sequence of the male Y-chromosome (32 cycles). Both standard curves are characterised by a comparable, high correlation coefficient (0.9996 for nDNA and 0.9987 for Y-DNA). Lack of amplification of the homologous sequence of chromosome Y for the two lowest measurement points may be explained by the fact that for such amounts of DNA

(0.02 ng and below), a sequence with a single copy per human haploid genome will appear as several (maximally six) copies only. On the other hand, a standard requirement for a reaction based on real-time PCR is detection of at least 50 copies of the investigated sequence [6], although experiments have been reported in the literature with sensitivity at the level of single DNA copies [8].

3.4. Optimisation of multiplex nYDNA reaction conditions

When determining conditions for a multiplex reaction, it is desirable to perform appropriate monoplex reactions to find out whether there are any significant differences in amplification efficiency of both experiments and to compare their precision and the accuracy of measurements of an equal amount of DNA in separate test tubes. Only when the C_t values of both reactions are compared, is it possible to discern whether there is a significant effect exerted by combining the two monoplex experiments on the results of determinations. Such a course of action allows avoidance of competition for substrates between the two PCR reactions, which could interfere with C_t values obtained for a less numerous matrix. An optimal solution is finding such a concentration of reaction primers that does not affect the value of C_t when the R_n value is reduced. The results of experiments [1] indicate that only decreasing primer concentration below 50 nM strongly affects the value of C_t . It has been demonstrated that employing primers with concentrations of 10 nM and 6.6 nM indeed leads to absence of PCR reaction products. These experiments (results not shown) were aimed at reduction of nDNA primer concentrations sufficient to equalise the C_t values for both determinations. As a consequence, the appropriate approach in order to optimise the experiment is determination of a limiting primer concentration value (100 nM) for the Alu sequence, while the Y-DNA reaction is carried out under standard conditions (1 μ M).

A separate issue in optimisation of a multiplex PCR reaction is concentrations of TaqMan probes. The concentration values should be maintained at the same level as in monoplex reactions, even while limiting primer concentrations for one matrix. Thanks to such an approach, the generated fluorescence signal is sufficiently strong to be registered by measurement devices. Figure 3 presents a comparison of the course of monoplex and duplex reactions for nDNA and Y-DNA.

For both monoplex and multiplex reactions, the curves illustrating the dependence of the C_t value on the amount of investigated DNA are rectilinear over the entire measurement range (Figure 3) and run parallel, differing by a constant value of C_t .

Experiments using quantitative PCR assays and performed as multiplex and monoplex reactions are characterised by an almost identical reaction course and effectiveness (Table I). Amplification of nuclear DNA in the multiplex reaction exhibited a slightly lower effectiveness (by 4%) as compared to the monoplex reaction. The opposite was seen in the case of male chromosome Y DNA amplification, where the combination of both reactions resulted in a slight increase in reaction effectiveness (by 5%).

TABLE I. THEORETICAL EFFECTIVENESS VALUES OF PCR AMPLIFICATION CALCULATED FOR MONOPLEX AND MULTIPLEX nDNA AND Y-DNA REACTIONS (CALCULATIONS AS PREVIOUSLY DESCRIBED IN [5]).

Reaction	Theoretical effectiveness
nDNA monoplex reaction	0.8942
Y-DNA monoplex reaction	0.8943
nDNA multiplex reaction	0.8504
Y-DNA multiplex reaction	0.9474

A detailed analysis of the results indicates that for each concentration value, DNA amplification is characterised by a slightly increased value of the C_t parameter in the multiplex as compared to the monoplex reaction. These data are, moreover, in accordance with the calculated theoretical effectiveness values of both reactions (Table I). No similar dependence can be found for Y-DNA amplification. This phenomenon has been anticipated, since the latter reaction, in view of the small number of copies of the investigated sequence, has the advantage of a ten times higher primer concentration level in the experiment. This observation may be explained by another hypothesis [11], according to which the elevation of the C_t value for the reaction in which VIC fluorescence was measured is a consequence of Y-DNA fluorescence spectrum blurring in combination with another marker (NED) in a multiplex PCR assay.

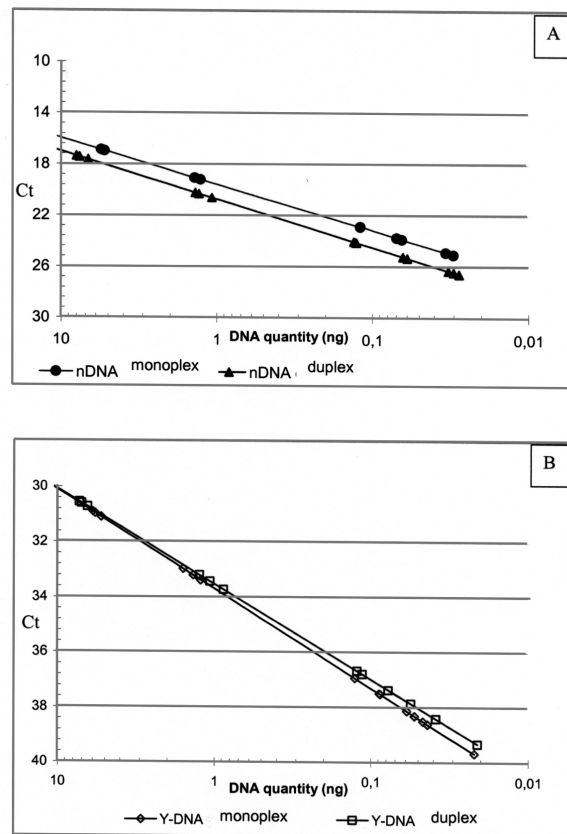


Fig. 3. Panel A: Curves illustrating dependence of the C_t value on the amount of DNA for nDNA monoplex and multiplex reactions. Panel B: Curves illustrating dependence of the C_t value on the amount of DNA for Y-DNA monoplex and multiplex reactions.

3.5. Determination of sensitivity of multiplex real-time PCR assay

Sensitivity of analyses employed in forensic laboratories is among the most significant parameters of the method. Table II presents the results of studies on sensitivity of nDNA and Y-DNA quantitation in a multiplex reaction.

Analysis of data presented in Table II indicates that for amplification of the investigated Alu sequence, there is no direct correlation between measurement accuracy and DNA quantity over the range of 2 ng to 2 pg. The number of copies of the sequence corresponding to 2 pg DNA is thus sufficient to obtain reliable results of determinations. This means that one might successfully determine even lower DNA concentrations; however, the above-mentioned level is sufficient, since forensic genetics almost exclusively investigates STR-type, single-copy sequences. Another observation can be made concerning measurements of

TABLE II. ASSESSMENT OF nYDNA REACTION SENSITIVITY OVER THE RANGE OF 2 ng TO 2 pg OF MATRIX DNA

Sample no.	Studied DNA amount [ng]	Ct for nDNA	Measured for nDNA [ng]	Ct for Y-DNA	Measured for Y DNA [ng]
1	2	17.89	4.226	31.33	2.733
2	2	18.46	2.919	31.44	2.520
3	0.5	20.63	0.711	33.31	0.653
4	0.5	20.68	0.688	33.48	0.577
5	0.25	22.33	0.236	34.26	0.328
6	0.25	22.16	0.263	34.34	0.310
7	0.05	24.27	0.067	37.61	0.029
8	0.05	24.47	0.058	36.9	0.048
9	0.025	25.72	0.026	37.07	0.041
10	0.025	25.96	0.022	37.18	0.039
11	0.002	28.71	0.003	38.99	0.010
12	0.002	28.37	0.004	—	—

Y chromosome sequences, where, as the amount of matrix decreases, so too does the accuracy of determination, resulting in a 200% error for the lowest concentration value. Amplification of this sample gave a *Ct* value equalling approximately 39 and it does not seem very likely that in further PCR cycles, smaller amounts of DNA would be capable of producing a significant fluorescence signal for this determination. Reliable results were obtained for standard DNA concentration of 25 pg, or – in other words – for approximately four somatic cells, which should be regarded as perfectly adequate accuracy in view of the amount of DNA required for determinations performed with multiplex kits, such as SGMPlus or YFiler.

3.6. Verification of species specificity of human DNA determinations by RT-PCR assay

An extremely important element of validation of a method in forensic genetics is its species specificity. To prove the species specificity of the multiplex PCR method, the authors investigated genomic DNA originating from 16 mammalian species (including chimpanzees), two bird species and one fish species; the experiments were performed under standard conditions (Figure 4).

DNA of seven animal species (horse, deer, mouse, dog, cat, sheep, goat) investigated by a multiplex PCR reaction, (in a similar manner as in a monoplex PCR assay), exhibited a fluorescence signal for the Alu sequence corresponding to a concentration of 0.45 pg, or

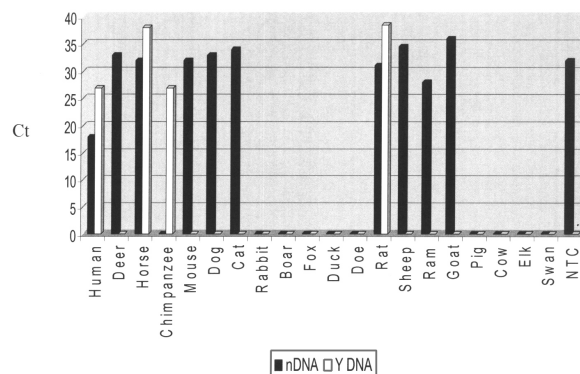


Fig. 4. Examination of species specificity of multiplex determination of nDNA and Y-DNA.

de facto at the level of the background value. Higher *Ct* values were observed for rat and sheep DNA, which is in accordance with other previous observations [5, 6, 13].

Examination of the species specificity of the Y chromosome sequence may be regarded as significant in a single case only. Since the sequence is characteristic for the genome of all primates, its presence was demonstrated in DNA of the chimpanzee (*Pan troglodytes*). On the other hand, a stronger signal generated for the sequence in chimpanzee as compared to an identical amount of human DNA may be explained by the fact that in the former species, the sequence is present on two sex chromosomes (both X and Y) rather than only on the Y chromosome, as in humans.

3.6.1. Measurement of DNA concentration in mixtures of human and animal DNA

Since samples that are to be examined in forensic genetic laboratories constitute mixtures of not only human genetic material, but also material originating from numerous animal species that come into contact with man, the authors resolved to find out whether there were any differences in measurements performed on samples consisting of DNA from many sources. To determine the level of interference (the effect of animal DNA contaminating the samples), the investigators prepared a series of mixtures composed of human and animal DNA (Table III).

The specificity of amplification of the studied DNA sequences in PCR assays is determined by primer pairs. In multiplex real-time PCR, an additional verification of the specificity was obtained by employing TaqMan probes, whose ideal hybridisation to the matrix in the course of this procedure is a decisive factor in generating the fluorescence signal [1]. For this reason, in spite of the presence of animal DNA in the examined samples (excluding DNA originating from primates), the results of human DNA quantitation, taking into consideration deviations characteristic for the method, do not seem to be either underestimated, which might result from interference of alien DNA, or overestimated, which might be a consequence of simultaneous amplification of the material (Table III). To sum up concerning investigations of species specificity of nYDNA by RT-PCR, one may state that the component which detects male Y-chromosome DNA is not specific solely for the human genome. Nevertheless, as long as the reaction is an element of the duplex, DNA originating from other primates generating the signal may be eliminated from quantitative determinations.

3.7. Comparison of methods of degraded DNA quantitation using a Quantifiler kit and a multiplex real-time PCR reaction

Since numerous DNA samples encountered in forensic genetic laboratories contain material that is moderately or highly degraded (by environmental factors, UV light, microbiologic activity, nucleolytic enzymes), the investigators examined the effect of such degradation on the results of DNA quantitation, at the same time comparing the method under development to a technique employing the commercially available Quantifiler kit.

In the past, information on the quality of tested DNA was obtained solely on the basis of gel electrophoresis. The procedure is, however, characterised by low sensitivity, requires a large amount of material to be examined, is not specific for human DNA, and above all does not allow quantitative determinations [10]. Table IV presents the dependence of the *Ct* value on the degree of DNA degradation for the Quantifiler and nYDNA methods.

As can be unequivocally inferred from analysis of the results, the highest rate of degradation of the tested material (the highest increase of the *Ct* value) was observed within the initial two minutes of incubation with DNase. Almost complete degradation was achieved after 120 minutes. The results of the experiment were in agreement with the electrophoretic image (results not presented).

Very similar results of *Ct* were noted for particular stages of digestion in all the determined amplicons (Table IV). This phenomenon stems from the fact (amongst others) that the experiment was performed on amplicons of approximately the same size (62 pz – Quantifiler, 69 pz for the nuclear genome and 71 pz for chromosome Y). Thus, the achieved results of measurement are not completely proportional to the total DNA content, being rather an indicator of its degradation and providing information on the amount of DNA

TABLE III. COMPOSITION OF INVESTIGATED MIXTURES OF HUMAN AND ANIMAL DNA

Sample no.	Amount of DNA [ng/ l] per 1 l					Water	Expected amount of human DNA	Measured amount of DNA [ng/ l]	
	Human	Deer	Horse	Mouse	Chimpanzee			for n DNA	for Y DNA
1	10	approx. 5	approx. 5	approx. 5	approx. 5	–	2.5	3.527	3.486
2	2	approx. 5	approx. 5	approx. 5	–	–	0.5	0.391	0.452
3	0.5	approx. 5	approx. 5	approx. 5	–	–	0.125	0.076	0.203
4	10	–	–	–	approx. 5	2 l	2.5	2.644	12.566

TABLE IV. DEPENDENCE OF THE C_t VALUE ON DNA DEGRADATION TIME FOR THE QUANTIFILER AND nYDNA METHODS

Time of DNase degradation (min)	C_t value obtained during measurement by Quantifiler kit	C_t value for nDNA obtained by multiplex nYDNA PCR reaction	C_t value for Y-DNA obtained by multiplex nYDNA PCR reaction
0	24.50	14.01	26.96
2	26.18	16.31	29.03
20	26.29	16.46	29.06
35	26.55	16.91	29.27
60	27.59	19.89	31.68
120	33.27	24.52	36.32

in a sample which is fit for amplification at the magnitude level of approximately 60–70 pz [12]. It can thus be stated that the developed method is not completely reliable, since its results depend not only on the amount of tested material, but also on its quality, which actually is an advantage of the determinations in view of their diagnostic value. Since numerous molecular biology methods are based on the PCR technique, the presented multiplex reaction provides a valuable source of information on the tested material. Nevertheless, in view of the fact that highly degraded samples will show a greater number of shorter rather than longer DNA fragments, the results of measurements are dependent in this case on the length of the amplified sequence [11]. In such a case, PCR determinations that employ shorter amplicons clearly overestimate the quantified amount of DNA, which is a phenomenon with a negative impact for subsequent STR analyses, for which the amplicon length ranges from 100 to 450 pz.

Summing up, the method of quantification of human nuclear DNA and male Y-chromosome DNA is highly sensitive and reliable. The method detects DNA concentration at the level of a single haploid cell (nDNA) and is characterised by a very high species specificity, at the same time allowing determination of whether male Y-chromosome DNA is present in a given sample, and if so, what amount is present.

References

1. Applied Biosystems, Real-Time PCR systems chemistry guide.
2. Butler J. M., Sample collection, DNA extraction, and DNA quantitation, [in:] *Forensic DNA typing*, Elsevier, Academic Press, Amsterdam 2005.
3. Dorak M. T., Real time PCR, www.dorak.info/genetics/realtime.html.
4. 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.
5. Mirowska A., Pawłowski R., Determination of nuclear DNA concentration using real-time PCR technique, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 58, 351–361.
6. 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 Sciences* 2005, 50, 1081–1090.
7. 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.
8. Rengarajan K., Cristol S. M., Mehta M., [et al.], Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores, *Molecular Vision* 2002, 8, 416–421.
9. Sifis M. E., Both K., Burgoyne L. A., A more sensitive method for the quantitation of genomic DNA by Alu amplification, *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47, 589–592.
10. 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.
11. Timken M. D., Swango K. L., Orrego C. [et al.], Quantitation of DNA for forensic DNA typing by qPCR (quantitative PCR): Singleplex and multiplex modes for nuclear and mitochondrial genomes, and the Y chromosome, <http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/210302.pdf>
12. Tringali G., Barbaro A., Insirelo E. [et al.], Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples, *Forensic Science International* 2004, suppl. 146, 177–181.
13. 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, *Journal of Forensic Sciences* 2002, 47, 593–598.

mosome DNA: application in human identification, *Analytical Biochemistry* 2005, 337, 89–97.

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

METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA DNA JĄDROWEGO CZŁOWIEKA I DNA MĘŻCZYZNY TECHNIKĄ KOMPLEKSOWEJ REAKCJI PCR W CZASIE RZECZYWISTYM

1. Wstęp

Z analitycznego punktu widzenia pomiar ilości DNA w próbkach pochodzących z materiału biologicznego jest krytycznym etapem wpływającym na wiarygodność profilowania DNA metodą PCR, prowadząc często do powstawania licznych artefaktów [2, 7]. Do najbardziej wiarygodnych metod pomiaru ilości DNA człowieka należą metody oparte na technice PCR w czasie rzeczywistym, które mierzą DNA faktycznie poddający się amplifikacji nawet pomimo działania niekorzystnych czynników, jakimi są m.in. inhibitory reakcji PCR czy silnie zdegradowany DNA. W przypadku badania śladów biologicznych jednym z głównych czynników ograniczających analityka podczas sądowego badania DNA jest jego ilość, z tego więc powodu stosuje się lub poszukuje metod umożliwiających pozyskanie jak największej ilości informacji z jak najmniejszej ilości DNA. Do tego typu metod należą od dawna stosowane metody kompleksowego PCR używane do sądowego profilowania DNA. Metody stosowane do pomiaru ilości DNA zazwyczaj wymagają znacznych jego ilości, stąd też do jego pomiaru stosowane są coraz częściej techniki oparte na technice RT-PCR charakteryzujące się bardzo wysoką czułością [9].

W badaniach wykorzystano metodę zaproponowaną przez Walkera i in. [13] polegającą na jednoczesnej amplifikacji sekwencji Alu Yb8 i Y-DNA metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwalającą na analizę zarówno DNA autosomalnego, jak i DNA z chromosomu Y. Niniejsza praca jest próbą opracowania metody swoistego oznaczania całkowitej ilości DNA człowieka (nDNA) oraz DNA mężczyzny (Y-DNA) w jednej kompleksowej reakcji RT-PCR (nYDNA). W celu oznaczenia tych komponentów zastosowano sekwencję Alu Yb8 [5,13] oraz sekwencję swoistą dla chromosomu Y człowieka [13].

Celem niniejszej pracy było opracowanie własnej metody ilościowego jednoczesnego oznaczania stężenia DNA jądrowego i DNA z chromosomu Y mężczyzny techniką PCR w czasie rzeczywistym. Zakres badań obejmował zarówno ustalenie eksperymentalnych warunków procedury przeprowadzenia metody, jak i ocenę wiarygodności wyników pomiarów. Zamierzeniem podjętych badań było określenie uniwersalnych parametrów reakcji pozwalających na jej efektywne zastosowanie w kontekście medyczno-sądowym.

2. Materiały i metody

2.1. Badane próbki

Do badań użyto standardów ilości DNA oraz próbek DNA człowieka i zwierząt jak opisano uprzednio [5]. DNA izolowano metodą nieenzymatyczną [4], a jego stężenie oznaczano metodą fluorymetryczną z PicoGreen.

2.2. Startery i sondy do PCR w czasie rzeczywistym

Do pomiarów ilościowych ludzkiego DNA jądrowego zastosowano startery i sondę jak podano w [5]. Do pomiaru ilościowego ludzkiego DNA z chromosomu Y zastosowano startery i sondę o następujących sekwencjach [13]:
starter 1: 5' CACCTACTGTGCCAGACAATGTG3'
starter 2: 5' CCCATGCCATGTTTGTCTACT3'
sonda: 5' NED TAGGCTCTAGGAATACAAAA3'
MGBNFQ.

2.3. Odczynniki do PCR w czasie rzeczywistym

Badania techniką RT-PCR zarówno z sondami typu TaqMan, jak i krzywe topnienia, prowadzono gotowymi zestawami oraz metodami opisanymi uprzednio [5]. Podczas kompleksowego oznaczania DNA jądrowego człowieka oraz DNA z chromosomu Y mieszanina reakcyjna zawierała: TaqMan Universal PCR Master Mix (1), oba startery dla nDNA (0,1 μM), startery dla Y-DNA (1 μM), sondę typu TaqMan dla nDNA znakowaną VIC (100 nM), sondę TaqMan dla Y-DNA znakowaną NED (250 nM) oraz matrycowy DNA i wodę uzupełniającą mieszaninę reakcyjną do 12,5 μl.

2.4. Pomiar ilości DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym

Pomiary stężenia DNA metodą PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w warunkach jak opisano uprzednio [5], stosując aparat do PCR w czasie rzeczywistym firmy Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR System. Analizę wyników pomiarów zarówno mono-komplexowych, jak i kompleksowych, przeprowadzono za pomocą urządzenia ABI PRISM 7900HT Sequence Detector Software (Applied Biosystems). Analizy krzywych topnienia oraz krzywe standardowe ilości DNA tworzone jak uprzednio [5].

2.5. Wyznaczenie czułości kompleksowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W celu wyznaczenia minimalnego poziomu ilości DNA, przy którym można oznaczyć jego stężenie w reakcji kompleksowej nY, sporządzono rozcieńczenia standardów DNA w celu otrzymania próbek o stężeniach: 2 ng/ μ l, 0,5 ng/ μ l, 0,25 ng/ μ l, 0,05 ng/ μ l, 0,025 ng/ μ l, 0,002 ng/ μ l i dokonano pomiaru ich ilości, stosując podwójne oznaczania.

2.6. Badanie wpływu domieszki DNA zwierząt na pomiar ilości nDNA i YDNA

Badaniom poddano mieszaniny DNA męczyzny w trzech różnych stężeniach (0,5, 2 i 10 ng) z około 5 ng DNA jelenia, konia lub myszy oraz mieszaninę DNA męczyzny (10 ng) z DNA szympansa (ok. 5 ng).

2.7. Pomiar stężenia DNA zdegradowanego przy użyciu zestawu Quantifiler i reakcji kompleksowej PCR w czasie rzeczywistym

W celu zbadania zależności wyników pomiaru stężeń DNA od stopnia jego degradacji, przygotowano DNA męczyzny o różnym stopniu degradacji. Wysokocząsteczkowy DNA degradowano z zastosowaniem zestawu DNAfree DNase Treatment and Removal Reagents firmy Ambion w warunkach polecanych przez producenta. Trawienie prowadzono w przedziale czasowym od 2 do 120 min. Skuteczność degradacji potwierdzano metodą elektroforetyczną. Stężenie DNA dla różnych czasów degradacji mierzono za pomocą komercyjnego zestawu Quantifiler (Applied Biosystems) oraz kompleksowym PCR metodą nYDNA.

3. Wyniki i dyskusja

3.1 Wybór amplifikowanych sekwencji

W niniejszej pracy zastosowano wysoce konserwatywną i występującą w wielu kopiach w ludzkim genomie sekwencję Alu Yb8 opisaną przez Walkera i in. [13], a stosowaną uprzednio do ilościowego oznaczania nDNA metodą monopleksowego RT-PCR [5]. Pomiar ilościowego DNA z chromosomu Y oparte zostały na amplifikacji regionu homologicznego obecnego na obu chromosomach płci. Selektowność eksperymentu tylko do chromosomu Y jest zapewniona przez powielanie fragmentu tej sekwencji, który nie występuje na chromosomie X z powodu delecji. Dokładnie w obrębie wspomnianej mutacji znajduje się miejsce, do którego przyłącza się specyficzna sonda TaqMan i drugi z pary starterów reakcji PCR. Istotnym zagadnieniem jest fakt, iż delecja

90 nukleotydów występuje tylko w genomie człowieka, a więc reakcja PCR oparta na tej sekwencji nie będzie miała miejsca w przypadku ludzkich chromosomów X, ale może zachodzić dla genomu innych gatunków naczelnych (rząd: *Primates*) niezależnie od płci [13].

3.2. Potwierdzenie specyficzności amplifikacji

Badanie specyficzności amplifikacji sekwencji nDNA przeprowadzono uprzednio w reakcji monopleks RT-PCR [5]. Aby potwierdzić również specyficzność amplifikacji sekwencji z chromosomu Y, przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem barwnika interkalującego SYBR Green I i starterów specyficznych względem wyżej wymienionej sekwencji oraz wykonano analizę krzywych topnienia powstałych produktów [3, 5].

Analiza krzywych dysocjacji sekwencji rejonu homologicznego chromosomu Y przeprowadzona dla trzech różnych stężeń DNA męczyzny wskazuje na T_m wynoszącą ok. 77°C oraz obecność tylko jednego produktu PCR dla tej reakcji. Uzyskana wartość T_m jest bardzo zbliżona do tej, którą otrzymano dla sekwencji Alu Yb8 [5]. Obserwowana krzywa topnienia nie wykazuje obecności dimerów starterów, jest bardzo wąska i charakteryzuje się jeszcze wyższą homogennością niż w przypadku sekwencji Alu Yb8 [5].

3.3. Krzywa kalibracyjna i określenie zakresu jej prostoliniowości dla Y-DNA

Aby wyznaczyć zakres prostoliniowości badanej reakcji PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzono amplifikację szeregu rozcieńczeń standardowego DNA męczyzny o stężeniach wynoszących dokładnie 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 i 0,002 ng/ μ l. Na podstawie otrzymanych wartości C_t utworzono krzywą kalibracyjną dla Y-DNA (rycina 2). Porównanie krzywych kalibracji dla Y-DNA i sekwencji Alu Yb8 opisaną w poprzedniej pracy [5] wykazuje wyraźną rozbieżność zakresu ich pomiarów.

Oznaczenie stężeń DNA oparte na sekwencji Alu Yb8 wykazało dużo szerszy zasięg wykrywanych stężeń – sześć rzędów wielkości, natomiast oznaczenie wykorzystujące sekwencję Y-DNA tylko cztery rzędy wielkości. A zatem różnica dolnej granicy oznaczalności obu reakcji, poniżej której uzyskane wyniki niekoniecznie muszą być precyzyjne i skorelowane z krzywą standardową, jest około stukrotna. Ta różnica czułości wynika głównie z ilości kopii badanych sekwencji w ludzkim genomie, a mianowicie ogromnej liczby kopii sekwencji Alu (ok. 2800) i tylko jednej z chromosomu Y przypadającej na diploidalny ludzki genom. Fakt ten jest również przyczyną znacznie szybszej detekcji Alu, a tym samym niższej wartości C_t (dla 1 ng C_t przyjmuje wartość ok. 20)

niż sekwencji chromosomu Y mężczyzny (odpowiednio: 32 cykl). Obie krzywe standardowe charakteryzuje porównywalny i wysoki współczynnik korelacji (0,9996 dla nDNA i 0,9987 dla Y-DNA). Brak amplifikacji sekwencji homologicznej chromosomu Y dla dwóch najniższych punktów pomiarowych można wytłumaczyć faktem, iż dla tych ilości DNA (0,02 ng i niższych) sekwencja o jednej kopii przypadająca na ludzki haploidalny genom będzie występowała w liczbie zaledwie kilku (maksymalnie sześciu) kopii. Natomiast standardowym wymogiem dla reakcji opartej na PCR w czasie rzeczywistym jest to, aby wykrywała ona przynajmniej 50 kopii badanej sekwencji [6], chociaż opisywane w literaturze eksperymenty posiadają czułość na poziomie pojedynczych kopii DNA [8].

3.4. Optymalizacja warunków reakcji kompleksowej nY-DNA

Określając warunki dla reakcji kompleksowej, pożądanym jest przeprowadzenie odpowiednich reakcji monopleksowych, aby stwierdzić, czy istnieją istotne różnice w wydajności amplifikacji obu eksperymentów oraz aby porównać ich precyzję i dokładność pomiarów równoważnej ilości DNA w oddzielnych próbkach. Dopiero porównując wartości C_t obu reakcji, można dowiedzieć się, czy występuje znaczący wpływ połączenia tych dwóch eksperymentów (monopleksowych) na wyniki oznaczeń. Postępowanie to pozwala uniknąć konkurencji o substraty między obiema reakcjami PCR, co mogłoby interferować z wartościami C_t uzyskanymi dla mniej licznej matrycy. Optymalnym rozwiązaniem jest znalezienie takiego stężenia starterów do reakcji, które przy redukcji wartości R_n nie oddziałują na wartość C_t . Wyniki doświadczeń [1] wskazują, iż dopiero obniżenie stężenia starterów poniżej 50 nM ma silny wpływ na wartość C_t . Stwierdzono, iż użycie starterów o stężeniach 10 nM i 6,6 nM faktycznie prowadzi do braku powstania produktów PCR. Doświadczenia te (wyniki nie pokazane) miały na celu odpowiednie zredukowanie stężenia starterów dla nDNA, aby możliwe było zrównanie wartości C_t dla obu oznaczeń. W rezultacie właściwym podejściem dla optymalizacji eksperymentu jest wyznaczenie limitującego stężenia starterów (100 nM) dla sekwencji Alu przy przeprowadzeniu reakcji dla Y-DNA w standardowych warunkach (1 μ M).

Osobnym zagadnieniem dla optymalizacji reakcji kompleksowej PCR są stężenia sond TaqMan. Powinny być one zachowane na takim samym poziomie, jak w reakcjach monopleksowych, nawet przy ograniczeniu stężenia starterów dla jednej z matryc. Dzięki temu wytworzony sygnał fluorescencji jest wystarczająco silny, aby mogła go zarejestrować aparatura pomiarowa. Rycina 3 przedstawia porównanie przebiegu reakcji monopleksowych i dupleksowych dla nDNA i Y-DNA.

Zarówno dla reakcji monopleksowych, jak i dla reakcji kompleksowej, krzywe zależności wartości C_t od ilości badanego DNA są prostoliniowe w całym zakresie pomiarów (rycina 3) oraz przebiegają równoległe, różniąc się o stałą wartość C_t pomiędzy obiema reakcjami.

Eksperymenty z wykorzystaniem ilościowego PCR, przeprowadzane kompleksowo i w monopleksach, charakteryzują się prawie identycznymi przebiegami i wydajnościami reakcji (tabela I). Amplifikacja jądrowego DNA w reakcji kompleksowej przebiegła z nieco mniejszą wydajnością (o 4%) niż w monopleksie. Odwrotne zjawisko zaszło dla amplifikacji Y-DNA, gdzie połączenie obu reakcji spowodowało niewielki wzrost (o 5%) wydajności reakcji.

Szczegółowa analiza uzyskanych wyników wskazuje, iż dla każdego stężenia amplifikacja nDNA charakteryzuje się nieco podwyższoną wartością parametru C_t w reakcji kompleksowej niż dla monopleksu. Dane te zgadzają się ponadto z obliczonymi teoretycznie wydajnościami obu reakcji (tabela I). Podobnej zależności nie można stwierdzić dla amplifikacji Y-DNA. Jest to przewidywany wynik, gdyż reakcja ta z uwagi na małą ilość kopii badanej tu sekwencji jest uprzywilejowana 10-krotnie wyższym stężeniem starterów w tym eksperymencie. Obserwacja ta może być wyjaśniona za pomocą innej hipotezy [11], według której podwyższenie wartości C_t dla reakcji, w której mierzono fluorescencję VIC, jest skutkiem rozmywania się jego widma fluorescencji w kombinacji z drugim znacznikiem (NED) w kompleksowym PCR.

3.5. Wyznaczenie czułości kompleksowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Czułość analiz stosowanych w laboratoriach sądowych jest jednym z istotniejszych parametrów metody. Tabela II pokazuje wyniki badania czułości oznaczenia ilości nDNA i Y-DNA w reakcji kompleksowej.

Analiza danych zawartych w tabeli II wskazuje, iż dla amplifikacji badanej sekwencji Alu nie ma bezpośredniej korelacji pomiędzy dokładnością pomiaru a ilością DNA w zakresie od 2 ng do 2 pg. Ilość kopii tej sekwencji odpowiadająca 2 pg DNA jest zatem wystarczająca dla uzyskania wiarygodnych wyników oznaczeń. Oznacza to, że można by określić z powodzeniem jeszcze niższe stężenia nDNA, jednak poziom ten jest wystarczający, gdyż w genetyce sądowej badane są prawie wyłącznie sekwencje typu STR występujące w jednej kopii. Inna obserwacja wynika z pomiarów sekwencji chromosomu Y, gdzie w miarę zmniejszania ilości matrycy następuje redukcja dokładności oznaczeń prowadząca do błędów wielkości 200% dla najniższego stężenia. Amplifikacja tej próbki wykazała wartość C_t wynoszącą ok. 39 i nie wydaje się prawdopodobne, aby w późniejszych cyklach reakcji PCR mniejsze ilości DNA mogły wytworzyć znacz-

niejszy sygnał fluorescencji dla tego oznaczenia. Wiarogodne wyniki uzyskiwano dla stężenia DNA standardowego występującego w ilości 25 pg, czyli dla ok. 4 somatycznych komórek, co należy uznać za zupełnie wystarczającą czułość, mając na uwadze ilości DNA wymagane do oznaczeń zestawami multipleksowymi, np. SGMPlus czy YFiler.

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

Jednym z bardzo istotnych elementów walidacji metod w genetyce sądowej jest jej swoistość gatunkowa. Aby dowieść gatunkowej specyficzności metody kompleksowej PCR, badano genomowy DNA pochodzący od 16 gatunków ssaków (w tym szympansa), 2 gatunków ptaków i 1 gatunku ryby w standardowych warunkach (rycina 4).

DNA 7 gatunków zwierząt (koń, jeleń, mysz, pies, kot, owca, koza) badany w reakcji kompleksowej PCR, podobnie jak w reakcji monopleksowej, wykazał sygnał fluorescencji dla sekwencji Alu na poziomie odpowiadającym stężeniu 0,45 pg, czyli *de facto* na poziomie tła oznaczenia. Wyższe wartości *Ct* obserwowano dla DNA szczura i owcy, co zgodne jest z innymi uprzednimi obserwacjami [5, 6, 13].

Badanie specyficzności gatunkowej sekwencji chromosomu Y tylko w jednym przypadku można uznać za znaczące. Ponieważ jest ona charakterystyczna dla genomu wszystkich naczelnych, DNA szympansa (*Pan troglodytes*) wykazuje jej obecność. Natomiast silniejszy sygnał wygenerowany dla tej sekwencji u szympansa niż dla analogicznej ilości ludzkiego DNA, można wytłumaczyć faktem, iż występuje ona u tego gatunku na dwóch chromosomach płci (zarówno X, jak i Y), nie zaś tylko na Y, jak u człowieka.

3.6.1. Pomiar stężenia DNA w mieszaninach DNA ludzkiego i zwierzęcego

Ponieważ często próbki badane w laboratorium genetyki sądowej to mieszaniny materiału genetycznego nie tylko ludzkiego, ale pochodzącego od znacznej liczby gatunków zwierząt stykających się z człowiekiem, postanowiono zbadać, czy istnieją różnice w pomiarach próbek składających się z wielu źródeł DNA. W celu wyznaczenia interferencji (oddziaływania zwierzęcego DNA zanieczyszczającego próbki) sporządzono szereg mieszanin złożonych z DNA ludzkiego i zwierzęcego (tabela III).

O swoistości amplifikacji badanych sekwencji DNA w reakcji PCR stanowią pary starterów. W reakcji kompleksowej PCR w czasie rzeczywistym dodatkowe potwierdzenie specyficzności uzyskano przez zastosowanie sond TaqMan, których idealna hybrydyzacja do matrycy

w przebiegu tego procesu decyduje o wytworzeniu sygnału fluorescencji [1]. Dlatego, mimo obecności zwierzęcego DNA w badanych próbkach (z wyłączeniem naczelnych), wyniki pomiarów dla ludzkiego DNA z uwzględnieniem odchyłeń charakterystycznych dla zastosowanej metody nie wydają się być zaniżone, co mogłoby być skutkiem interferencji obcego DNA, ani zawyżone, co mogłoby wynikać z jednoczesnej amplifikacji tego materiału (tabela III). Podsumowując badania swoistości gatunkowej metody nY-DNA metodą RT-PCR, można stwierdzić, iż jej komponent wykrywający DNA mężczyzny nie jest specyficzny tylko dla genomu człowieka. Jednak dopóki reakcja ta będzie częścią dupleksu, DNA innych naczelnych generujący sygnał może zostać wyeliminowany z ilościowych oznaczeń.

3.7. Porównanie metod pomiaru stężenia DNA zdegradowanego przy użyciu zestawu Quantifiler i reakcji typu multipleks PCR w czasie rzeczywistym

Ponieważ wiele próbek DNA spotykanych w laboratoriach genetyki sądowej zawiera materiał w średnim lub wysokim stopniu zdegradowany (czynniki środowiska, światło UV, aktywność mikrobiologiczna, enzymy nukleolityczne), badano, jaki wpływ będzie miała taka degradacja na wyniki oznaczeń ilościowych, porównując jednocześnie opracowywaną metodę z komercyjnie dostępnym zestawem Quantifiler.

W przeszłości informacje o jakości badanego DNA uzyskiwano tylko na podstawie elektroforezy żelowej. Procedura ta jednak jest mało czuła, wymaga użycia dużej ilości badanego materiału, nie jest swoista dla DNA człowieka, a przede wszystkim nie zapewnia oznaczeń ilościowych [10]. Tabela IV przedstawia zależność wartości *Ct* od stopnia degradacji DNA dla metody Quantifiler i nY-DNA.

Z analizy wyników jednoznacznie wynika, iż największe tempo degradacji badanego materiału (największy wzrost *Ct*) obserwowano w czasie pierwszych dwóch minut inkubacji z DNazą. Prawie zupełną degradację osiągnięto po 120 min. Wyniki eksperymentu zgodne były z obrazem elektroforetycznym (wyniki nieprezentowane).

Zaobserwowano bardzo zbliżone wartości *Ct* dla poszczególnych faz trawienia dla wszystkich oznaczanych amplikonów (tabela IV). Wynika to między innymi z faktu, że badaniu poddawane są amplikony o mniej więcej tej samej wielkości (62 pz – QuantifilerTM, 69 pz dla jądrowego genomu i 71 pz dla chromosomu Y). Uzyskane wyniki pomiarów nie są do końca adekwatne co do całkowitej zawartości DNA, a raczej są wyznacznikiem jego degradacji i mówią o ilości DNA w próbce, który nadaje się do amplifikacji na poziomie wielkości ok. 60–70 pz. [12]. Można zatem stwierdzić, iż opracowy-

wana metoda nie wykazuje pełnej wiarygodności, gdyż jej wyniki zależą nie tylko od ilości badanego materiału, ale także od jego jakości, co stanowi zaletę tych oznaczeń ze względu na ich wartość diagnostyczną. Ponieważ wiele metod w biologii molekularnej opartych jest na technice PCR, opisywana reakcja kompleksowa zapewnia cenne źródło informacji o badanym materiale. Jednakże z uwagi na fakt, iż dla bardzo zdegradowanych próbek więcej będzie krótszych niż dłuższych fragmentów DNA, wyniki pomiarów uzależnione będą w tym przypadku od długości amplifikowanej sekwencji [11]. W takim przypadku oznaczenia PCR wykorzystujące krótsze amplikony wyraźnie zawyżają mierzone ilości DNA, co jest zjawiskiem niekorzystnym dla późniejszych ewentualnych analiz typu STR, dla których długość amplikonu wynosi od 100 do 450 pz.

Reasumując, badana metoda ilościowego oznaczania DNA jądrowego człowieka i DNA mężczyzny należy do bardzo czułych i wiarygodnych analiz. Wykrywa ona stężenia DNA na poziomie jednej haploidalnej komórki (nDNA) oraz charakteryzuje się bardzo wysoką specyficznnością gatunkową, pozwalając jednocześnie określić, czy i w jakiej ilości obecny jest DNA mężczyzny w badanej próbce.