



APPLICATION OF BIOROBOT M48 TO DNA EXTRACTION FROM BIOLOGICAL SPECIMENS ANALYSED IN FORENSIC INVESTIGATIONS

Agnieszka PARYS-PROSZEK, Wojciech BRANICKI, Paulina WOLAŃSKA-NOWAK, Tomasz KUPIEC

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

New methods of nucleic acids extraction based on magnetic separation have opened up possibilities of automation of the process of DNA isolation. Magnetic separation has been applied for instance in the BioRobot M48 apparatus, which enables simultaneous and efficient extraction of up to 48 DNA samples. The aim of this work was to evaluate possibilities of application of BioRobot M48 to examination of both typical biological traces and traces subjected to heavy degradation processes. The performed experiments allowed comparative analysis of the quality and efficiency of magnetic DNA extraction in relation to the previously applied phenol-chloroform method. The results obtained for typical biological traces which are most commonly investigated in forensic laboratories (i.e. blood, semen, saliva, hair roots) indicate that magnetic extraction using BioRobot M48 can completely replace the phenol-chloroform method. However, in the case of traces subjected to strong degradation processes, the method based on phenol-chloroform extraction should still be considered as much more efficient.

Key words

Automation of DNA extraction; Magnetic method of DNA isolation; BioRobot M48; Phenol-chloroform DNA extraction; Comparative examination of DNA extraction methods.

Received 25 July 2008; accepted 8 October 2008

1. Introduction

The use of an appropriate DNA extraction method has a significant influence on the final result of genetic analysis. In forensic genetics studies, determination of genetic profile based on examination of collected biological trace evidence depends on the quality and quantity of the extracted DNA [12, 13, 16]. Many forensic laboratories routinely use the standard phenol based DNA extraction method (the so-called organic method of DNA extraction) followed by concentration of DNA extract on Microcon 100 columns. This method is considered very versatile and allows isolation of genetic material from biological traces deposited on various types of substrata, from specimens

subjected to heavy degradation processes and from contact traces etc. However, the organic method also has some serious drawbacks. Due to necessary centrifugation steps and an additional stage of DNA concentration with cellulose columns, the method is very time consuming, and furthermore it cannot be fully automated, does not completely remove PCR inhibitors and may be dangerous to health [1, 2, 8, 13]. There is a general trend nowadays in forensic laboratories to implement automation of the entire process of genetic analysis. This is because a rapidly increasing number of biological traces and reference samples need to be examined and the process of forensic evidence examination needs to be as short as possible – such are the requirements of modern investigations and judicial

proceedings. Therefore, efforts are being made to limit the role of manual methods that are particularly prone to contamination or operator errors [4, 7, 15, 17].

New methods of nucleic acids extraction based on magnetic separation have created possibilities of automation of the process of DNA isolation [9, 15]. Magnetic separation is used, for example, in the BioRobot M48, an automatic workstation which has been designed for, among other things, extraction of DNA from biological traces examined in forensic studies [12, 13, 14, 15] or for DNA isolation carried out in microbiology and virology [6, 10, 18]. During the process of magnetic extraction, DNA molecules attach to magnetic beads covered with silica layer. In the presence of a magnetic field, the beads with the DNA attached are separated from the remaining cellular components and potential contaminants present in the extracted sample. At the next stage after several washing steps, DNA is eluted in elution buffer. Full automation of this procedure enables elution of up to 48 pure DNA extracts in just 2.5 hours [1, 13]. Automation of the process of DNA extraction has not aroused any controversy in the case of good quality specimens [1, 2, 4, 5, 7]. However, in forensic investigations, it is quite often necessary to extract DNA from specimens that have been subjected to heavy degradation processes. The aim of this work was to evaluate advantages and disadvantages associated with the use of the magnetic extraction method as applied in BioRobot M48 and to compare results obtained by this method with those obtained by the standard phenol-chloroform procedure used in forensic laboratories. In the performed experiments the effectiveness of the method was verified during analysis of good quality DNA samples, and special emphasis was placed on evaluation of the BioRobot M48 in the context of DNA extraction from biological specimens subjected to strong degradation.

2. Material and methods

2.1. The studied specimens

2.1.1. *Typical biological traces and reference samples*

The study material consisted of typical biological traces collected mainly in the course of routine expert work as well as specimens constituting reference samples. The investigated samples included 25 blood stains, 12 semen stains, 14 saliva stains deposited on various substrata, 5 samples of liquid blood and 5 buccal

swabs. Ten contact traces containing minimum amounts of DNA (swabs taken from magnetic key, wallet, ring, drawer handles, watch, receiver, computer keyboard, pen) were also subjected to analysis. Hair with roots was collected from four different individuals. All the samples were divided into two parts. The first part was subjected to magnetic DNA extraction with BioRobot M48 (Qiagen, Hilden, Germany) and the second was subjected to DNA isolation with the phenol-chloroform procedure.

2.1.2. *Heavily degraded biological traces*

Five bones, 5 paraffin embedded soft tissues, 5 decayed soft tissues and 10 strongly decayed blood samples represented specimens that contained seriously degraded DNA. Bone material was subjected to initial purification and decontamination by washing in 15% bleach, distilled water and 70% ethanol. The purification step was carried out according to literature data with some minor modifications [3]. Bones were then pulverized using FreezerMill 6750 apparatus (Spex CertiPrep, Metuchen, USA). Pulverized bone samples, samples taken from tissues and blood were then divided in two parts. The first was subjected to magnetic DNA extraction with BioRobot M48 (Qiagen, Hilden, Germany) and the second was subjected to DNA isolation with the phenol-chloroform procedure.

2.1.3. *Samples used for sensitivity testing*

Peripheral blood was taken in the presence of anticoagulant from two individuals and the blood was diluted in proportions 1:10 and 1:100. Then, 50 μ l of the diluted blood samples was subjected to magnetic DNA extraction. The same set of samples was subjected to phenol-chloroform DNA extraction.

2.1.4. *Samples used for reproducibility testing*

Five samples of liquid blood (50 μ l), 5 samples of blood deposited on Whatman 1MM filter paper (approximately 0.25 cm²) and buccal swabs from 5 different individuals were collected for the purpose of magnetic DNA extraction. The experiment was repeated twice. All the samples were of good quality and stored in correct conditions. Additionally, the reproducibility of the magnetic extraction method was tested by six-fold analysis of a single sample of liquid blood (50 μ l) and a single sample of blood deposited on Whatman 1MM filter paper (0.25 cm²).

2.1.5. Samples used for efficiency testing of the magnetic DNA extraction method depending on incubation time

This experiment involved analysis of samples of liquid blood (50 μ l) and samples of blood deposited on Whatman 1MM filter paper (about 0.25 cm²). Samples were incubated at 56°C for 15 min, 1 h, 2 h, 3 h and 24 h, and subjected to the magnetic DNA extraction method.

2.2. Magnetic DNA extraction method

All the samples were subjected to magnetic DNA extraction with BioRobot M48 apparatus (Qiagen, Hilden, Germany) and MagAttract DNA Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions [11]. Traces containing blood and saliva were incubated for 15 min in 190 μ l of G2 buffer and 10 μ l of proteinase K (10 mg/ml) at a temperature of 56°C. Soft tissues and hair roots were incubated overnight in 190 μ l of G2 buffer and 10 μ l of proteinase K (10 mg/ml) and 10 μ l of 1 M DTT (Sigma Chemical, Steinheim, Germany) at a temperature of 56°C. Paraffin embedded tissues were incubated for 5 min in 190 μ l of G2 buffer at a temperature of 75°C followed by overnight incubation at 56°C in the presence of proteinase K (10 mg/ml).

Traces containing semen were subjected to preferential lysis. Samples were incubated for 15 min at 56°C with 190 μ l of G2 buffer and 10 μ l of proteinase K (10 mg/ml). After centrifugation, 200 μ l of supernatant containing epithelial cells was collected into a new tube. The sperm cell fraction was washed three times with G2 buffer and then incubated at 56°C for 24 hours with 180 μ l of G2 buffer and 10 μ l of proteinase K (10 mg/ml) and 10 μ l of 1 M DTT.

Pulverised bone samples were incubated for 48 h in 37°C with 700 μ l of 0.5 M EDTA pH 8.3. Then 20 μ l of proteinase K (10 mg/ml) was added and samples were subjected to an additional incubation step at 56°C.

All the samples were centrifuged after incubation and 200 μ l of supernatant were transferred into a new set of tubes that were put into the BioRobot M48 for the magnetic separation step.

2.3. Phenol-chloroform (organic) DNA extraction method

Blood and saliva samples were incubated overnight at 56°C in 500 μ l of lysis buffer (10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 0.5 M EDTA, 2% SDS) and 15 μ l of proteinase K (10 mg/ml). Soft tissues and hair roots

were treated the same, but additionally 10 μ l of 1 M DTT was added. Traces containing semen were subjected to preferential lysis. Samples were incubated for 1 hour at 56°C with 500 μ l of the lysis buffer and 15 μ l of proteinase K (10 mg/ml). After centrifugation supernatant containing epithelial cells was transferred to a new tube. The sperm cell fraction was washed three times with lysis buffer and incubated overnight in a water bath at 56°C with 500 μ l of lysis buffer, 10 μ l of proteinase K (10 mg/ml) and 10 μ l of 1 M DTT. Fragments of paraffin embedded tissues were incubated with xylene for 30 min at 65°C. Samples were washed with 100% and 75% ethanol followed by washing in distilled water. After drying, tissues were transferred into tubes and incubated overnight in 500 μ l of lysis buffer, 15 μ l of proteinase K (10 mg/ml) and 20 μ l of 1 M DTT. Pulverised bone samples were incubated for 24 hours at 56°C with 3 ml of buffer (0.5 M EDTA, 10% SDS), 225 μ l proteinase K and 120 μ l of 1 M DTT. After incubation, all the samples were subjected to double extraction with a buffered mixture of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Sigma Chemical, Steinheim, Germany). DNA extracts were then concentrated on Microcon 100 cellulose minicolumns. In the case of bone samples, the concentration step was performed with Centricon 100 columns (Millipore, Billerica, USA).

2.4. Evaluation of DNA concentration

DNA concentration was measured in the studied samples with the fluorimetric method using PicoGreen dye (Molecular Probes, Eugene, USA and Fluoroskan Ascent FL apparatus (Labsystems, Helsinki, Finland).

2.5. Amplification and electrophoresis of the samples

DNA extracted from bone samples was subjected to PCR amplification with the Identifiler kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). The remaining samples were amplified with the SGM Plus kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). The total amplification volume was 25 μ l and the concentration of template DNA was 2 ng. PCR reactions were performed using GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR products were analysed using genetic analyser ABI Prism 3100A (Applied Biosystems, Foster City, USA). Electrophoresis results were analysed with GenScan Analysis 3.7 and Genotyper 3.7 computer programs.

2.6. Statistical calculations

Statistical calculations (descriptive statistics, T-student tests) were done with SPSS v. 12.01 computer software.

3. Results and discussion

3.1. Comparative analysis of the effectiveness of magnetic and organic DNA extraction methods in the case of biological traces and reference material

For the analysed samples, average DNA concentrations, standard deviations and variance in particular groups of samples were calculated. Performed experiments showed that samples subjected to magnetic extraction method contained lower DNA concentrations compared to corresponding samples subjected to phenol-chloroform extraction. The T-student test indicated that this observation is statistically significant ($p < 0.05$) for all the examined groups of samples (data not presented). However, variance analysis showed that the magnetic method is characterised by higher precision than the organic method (Table I). Figure 1 shows an efficiency comparison of the two methods of DNA extraction.

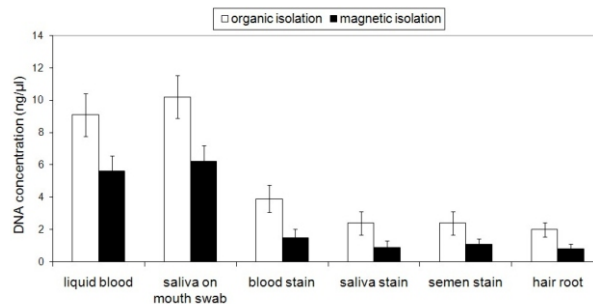


Fig. 1. Differences in efficiency of organic and magnetic isolation methods based on examination of 61 typical forensic samples.

Lower DNA concentrations found in samples subjected to the magnetic method may be due to a shorter incubation time compared to phenol-chloroform extraction. In the case of typical biological traces, the observed differences did not (negatively) affect the positive determination of microsatellite markers. The final genotyping results were comparable for samples extracted with the two different methods. All the magnetic DNA extracts were clear while some DNA extracts obtained with the phenol-chloroform extraction method were still coloured with dyes. The dyes most probably originated from substrata on which biological traces were deposited. This observation indicates that the magnetic DNA extraction method is a very effective tool for removing some chemical dyes from the

TABLE I. STATISTICAL CALCULATIONS FOR 61 TYPICAL FORENSIC SAMPLES AFTER ORGANIC AND MAGNETIC ISOLATION

		\bar{x}	SD	s^2
Liquid blood	Magnetic isolation	5.64	0.96	0.93
	Organic isolation	9.08	1.32	2.17
Saliva on mouth swab	Magnetic isolation	6.18	0.99	1.00
	Organic isolation	10.2	1.32	1.73
Blood stain	Magnetic isolation	1.49	0.53	0.28
	Organic isolation	3.90	0.84	0.71
Saliva stain	Magnetic isolation	0.86	0.40	0.16
	Organic isolation	2.42	0.73	0.54
Semen stain	Magnetic isolation	1.04	0.34	0.11
	Organic isolation	2.39	0.71	0.51
Hair roots	Magnetic isolation	0.82	0.33	0.11
	Organic isolation	2.00	0.43	0.18

\bar{x} – mean, SD – standard deviation, s^2 – variance.

analysed samples. It is known that chemical dyes may influence the amplification process by inhibition of the PCR reaction which may lead to negative DNA profiling results (Figure 2).

The automated DNA extraction method was also found to be a very effective tool for analysis of old biological traces. It was possible to genotype microsatellite markers in 10–20 year old semen, saliva and blood stains extracted with this method. However, a different situation was noted when traces subjected to serious degradation processes (decayed blood, soft tissues and bone material) were analysed. Out of a total of 25 heavily degraded samples extracted with BioRobot M48, only 3 DNA extracts gave partial genetic profiles. For the remaining 22 samples, negative genotypings were encountered. In contrast, examination of

the samples extracted with the organic method resulted in full genetic profiles in three cases and partial genetic profiles in 14 cases. Results obtained for seriously degraded specimens indicated that the phenol-chloroform method is definitely better and more efficient than magnetic DNA extraction for this kind of material. This result may be partially explained by the fact that magnetic beads (used in the process of extraction with BioRobot M48) are a target for both good quality and low quality DNA. Thus, competition between these two DNA fractions may lead to final insufficient concentration of good quality DNA (PCR template) in a sample and too high concentration of degraded DNA, which may inhibit the PCR reaction and thus lead to negative results of STR analysis (Figure 3).

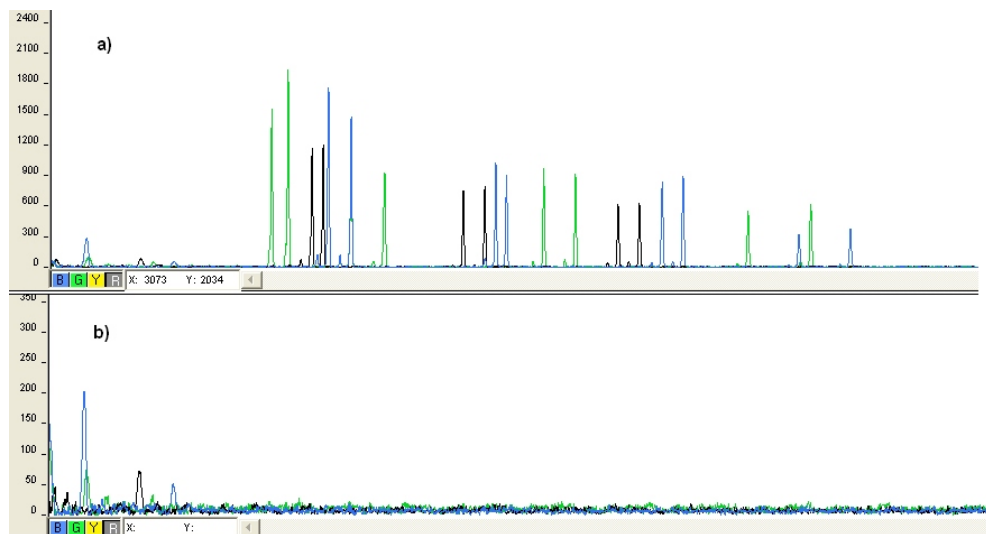


Fig. 2. Gene-Scan electrophoregrams from blood samples on black jeans after magnetic (a) and organic (b) isolation.

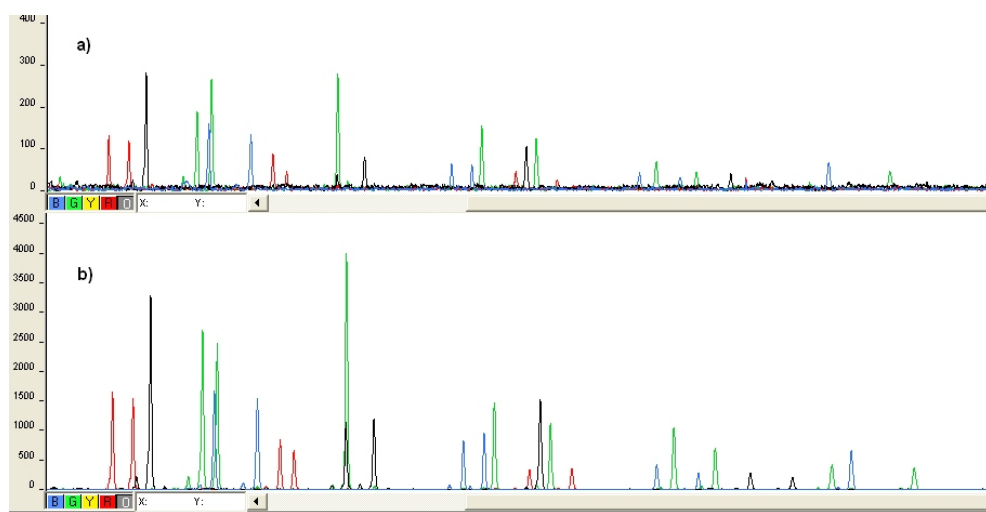


Fig. 3. Gene-Scan electrophoregrams from bone samples after magnetic (a) and organic (b) isolation.

In the case of contact traces containing minimum amounts of genetic material (swabbed magnetic key, wallet, ring, drawer handles, watch, computer keyboard, pen) positive genotyping results were found in 3 out of a total number of 10 samples subjected to magnetic DNA extraction. It is noteworthy that in the case of these samples, it was not possible to obtain a genetic profile in any of the DNA extracts obtained with the phenol-chloroform method. We explain the observed predominance of negative results of genetic examinations by minute amounts of DNA characteristic for all the analysed samples. Determination of DNA concentration showed that in most samples the DNA amount was below 100 pg/l.

3.2. Sensitivity of magnetic DNA extraction

Sensitivity tests performed on serial dilutions of liquid blood subjected to DNA extraction with the two methods and subsequent genetic analysis indicated that slightly better genotyping results were obtained in the case of the magnetic extraction method. In the case of magnetic extraction, a partial profile was determined for 1:100 dilution of sample A while in the case of phenol-chloroform extraction, a partial profile was determined for a dilution that was an order of magnitude lower (1:10). Similarly, analysis of sample B also indicated that significantly better results of examination of microsatellite markers were obtained for dilutions subjected to magnetic DNA extraction (Table II).

3.3. Reproducibility of magnetic DNA extraction

Comparable results of genetic analysis were obtained for two separate magnetic extractions of the same samples of liquid blood, blood deposited on filter paper and buccal swabs. Similar DNA amounts were obtained for both extractions in all cases and full genetic profiles were determined for all the samples. By measuring DNA concentration in six DNA extracts from a single liquid blood sample and six DNA extracts from a single blood sample deposited on filter paper, we were able to show that magnetic DNA extraction with BioRobot M48 gives repeatable results. The calculated values of the basic statistical parameters – mean, standard deviation and variance – are for liquid blood: $\bar{x} = 4.72$; $SD = 1.24$; $s^2 = 1.5$, respectively and for blood deposited on filter paper: $\bar{x} = 0.35$; $SD = 0.05$; $s^2 = 0.002$, respectively. The differences in precision observed for samples of blood deposited on filter paper and liquid blood may be due to the specificity of these two different kinds of material. Full genetic profiles were determined from all DNA extracts.

3.4. Efficiency of magnetic DNA isolation depending on incubation time

Experiments performed on samples of liquid blood and blood deposited on filter paper showed that DNA concentration in the isolated samples is proportional to the incubation time before the actual step of magnetic separation performed on BioRobot M48 (Figure 4). Extension of the incubation time up to 24 hours led to a significant increase in extraction efficiency in the case of a sample showing very low DNA concentration after 15 min incubation time.

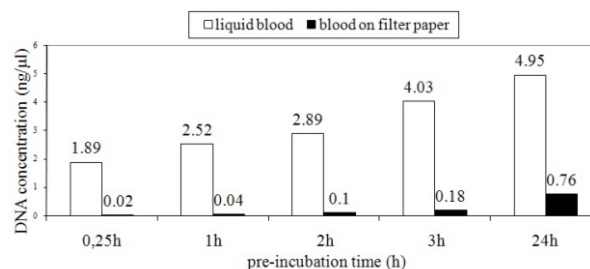


Fig. 4. The influence of pre-incubation time extension on DNA concentration in forensic samples extracted with the BioRobot M48.

This experiment indicated that using this simple modification it was possible – at least to some degree – to overcome the effect shown in Figure 1, i.e. significant disproportion between DNA concentrations after the magnetic and phenol-chloroform extraction methods. Based on this observation, we decided to re-analyse 5 blood traces (blood samples deposited on filter paper), which, when subjected to the standard 15 minute incubation before magnetic extraction, had produced only partial genetic profiles. Thus, additional 0.25 cm² samples of blood on filter paper were collected and this time incubated overnight at 56°C. The extended incubation time resulted in an increase in DNA concentration that was sufficient to produce full genetic profiles in the studied traces (Table III).

4. Conclusions

The automatic method of DNA extraction based on BioRobot M48 enables isolation of DNA from 48 samples in just 2.5 hours and this represents an essential improvement in the process of DNA extraction from biological traces. It was shown that in the case of typical biological traces, magnetic extraction may be equivalent to phenol-chloroform extraction and thus may completely replace it. However, in the case of biological samples subjected to serious decomposition,

TABLE II. COMPARISON OF THE SENSITIVITY OF ORGANIC AND MAGNETIC ISOLATION METHODS FOR UNDILUTED AND DILUTED LIQUID BLOOD SAMPLES

Locis in SGM Plus system	Sample A						Sample B					
	Magnetic isolation			Organic isolation			Magnetic isolation			Organic isolation		
	Undiluted	1:10	1:100	Undiluted	1:10	1:100	Undiluted	1:10	1:100	Undiluted	1:10	1:100
D3S1358	14, 15	14, 15	14, 15	14, 15	14, 15	14, 15	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18
VWA	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18	16, 18	14, 18	14, 18	14, 18	14, 18	14, 18	14, 18
D16S539	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
D2S1338	19, 23	19, 23	19, 23	19, 23	19, 23	19, 23	18, 19	18, 19	18, 19	18, 19	18, 19	18, 19
AMEL	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y	X, Y
D8S1179	12, 14	12, 14	12, 14	12, 14	12, 14	12, 14	8, 13	8, 13	8, 13	8, 13	8, 13	8, 13
D21S11	31, 31.2	31, 31.2	31, 31.2	31, 31.2	-	-	30.2, 31	30.2, 31	30.2, 31	30.2, 31	30.2, 31	30.2, 31
D18S51	14, 15	14, 15	14, 15	14, 15	14, 15	-	12, 14	12, 14	-	12, 14	-	-
D19S433	14	14	14	14	14	14	15	15	15	15	15	15
TH01	6, 9	6, 9	6, 9	6, 9	6, 9	6, 9	9, 9.3	9, 9.3	9, 9.3	9, 9.3	9, 9.3	9, 9.3
FGA	22, 24	22, 24	-	22, 24	-	-	22, 25	-	-	22, 25	-	-

TABLE III. RESULTS OF EXTENSION OF PRE-INCUBATION DURATION FOR BLOOD STAINS EXTRACTED USING THE MAGNETIC METHOD

Loci in SGM Plus system	Sample I		Sample II		Sample III		Sample IV		Sample V	
	0.25 h	24 h	0.25 h	24 h	0.25 h	24 h	0.25 h	24 h	0.25 h	24 h
D3S1358	–	15	14, 18	14, 18	15, 17	15, 17	–	14, 16	17, 18	17, 18
VWA	–	14, 18	15	15	16, 20	16, 20	16, 17	16, 17	16, 17	16, 17
D16S539	–	10, 12	9, 10	9, 10	9	9	–	11, 12	11	11
D2S1338	–	17, 18	17, 24	17, 24	19, 23	19, 23	–	20	20, 25	20, 25
AMEL	X	X	X	X	X, Y	X, Y	X	X	X, Y	X, Y
D8S1179	13	13	14	14	13, 14	13, 14	12, 15	12, 15	13	13
D21S11	–	28, 32.2	30, 31	30, 31	28, 32.2	28, 32.2	–	29, 31.2	31, 32.2	31, 32.2
D18S51	–	12, 15	–	13	–	14, 18	–	15, 19	–	14, 16
D19S433	13, 14	13, 14	13, 14	13, 14	14, 14.2	14, 14.2	14, 16	14, 16	13	13
TH01	–	9.3	6	6	7, 8	7, 8	6, 9.3	6, 9.3	6, 8	6, 8
FGA	–	22	–	20, 24	–	16.1, 23	–	23, 26	–	22, 22.2

which may have resulted in DNA defragmentation (old bones, decayed tissues), the phenol-chloroform extraction method is more effective and efficient. In spite of significantly lower DNA concentrations in samples extracted with the magnetic method, comparable final results of genetic analysis were obtained for DNA extracts isolated with both extraction methods. Bearing in mind the significant variation in quality of forensic samples that are the subject of DNA extraction, it would seem to be advisable to routinely extend incubation time to over 2 hours and in the case of low quality biological traces even up to 24 hours. Generally, this leads to a maintenance of higher DNA concentrations in samples subjected to DNA extraction using BioRobot M48 apparatus and thus raises the chances for positive results of genetic analysis. Automation of DNA extraction will definitely improve the process of DNA isolation of biological traces, significantly increasing efficiency and minimising the risk of contamination.

References

1. Anslinger K., Bayer B., Rolf B. [et al.], Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory, *Legal Medicine* 2005, 7, 164–168.
2. Crouse C., Yeung S., Greenspoon S. [et al.], Improving efficiency of a small forensic DNA laboratory: validation of robotic assays and evaluation of microcapillary array device, *Croatian Medical Journal* 2005, 46, 563–577.
3. Davoren J., Vanek D., Konjhdodžić R. [et al.], Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem Repeat testing of skeletal remains from mass graves, *Croatian Medical Journal* 2007, 48, 478–485.
4. Fregeau C. J., Lett M., Elliott J. [et al.], Adoption of automated DNA processing for high volume DNA casework: A combined approach using magnetic beads and real-time PCR, *International Congress Series* 2006, 1288, 688–690.
5. Greenspoon S. A., Ban J. D., Sykes K. [et al.], Application of the BioMek 2000 laboratory automation workstation and the DNA IQ system to the extraction of forensic casework samples, *Journal of Forensic Sciences* 2004, 49, 29–39.
6. Hjelmevoll S., Olsen M., Sollid J. [et al.], A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene, *Journal of Molecular Diagnostics* 2006, 8, 574–581.
7. Huang D. J., Zimmermann B. G., Holzgreve W. [et al.], Improvement of methods for the isolation of cell-free fetal DNA from maternal plasma. Comparison of manual and automated method, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1075, 308–312.
8. Ki J. S., Chang K. B., Roh H. J. [et al.], Direct DNA isolation from solid biological sources without pretreatments with proteinase-K and/or homogenization through automated DNA extraction, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2007, 103, 242–246.
9. Kishore R., Hardy W. R., Anderson V. J. [et al.], Optimization of DNA extraction from low-yield and degraded samples using the bioRobot EZ1 and BioRobot M48, *Journal of Forensic Science* 2006, 51, 1–7.

10. Knepp J., Geahr M., Rorman M. [et al.], Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA, *Journal of Clinical Microbiology* 2003, 41, 3532–3536.
11. MagAttract DNA Mini M48, Forensic Handbook, Qiagen 2006.
12. Montpetit S. A., Fitch I. T., O'Donnell P. T., A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework, *Journal of Forensic Science* 2005, 50, 1–9.
13. Nagy M., Otremba P., Krüger C. [et al.], Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics, *Forensic Science International* 2005, 152, 13–22.
14. Pizzamiglio M., Marino A., Portera G. [et al.], Robotic DNA extraction system as a new way to process sweat traces rapidly and efficiently, *International Congress Series* 2006, 1288, 598–600.
15. Riemann K., Adamzik M., Frauenrath S. [et al.], Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2007, 21, 244–248.
16. Skagestad V., Reitan E., Stacy R. [et al.], Innovative automated nucleic acid isolation by the key use of magnetic silica particles, *European Cells and Materials* 2002, 3, 199.
17. Steinlechner M., Parson W., Automation and high through-put for a DNA database laboratory: development of a laboratory information management system, *Croatian Medical Journal* 2001, 42, 252–255.
18. Tewari D., Zellers C., Acland H. [et al.], Automated extraction of avian influenza virus for rapid detection using real-time RT-PCR, *Journal of Clinical Virology* 2007, 40, 142–145.

Corresponding author

Agnieszka Parys-Proszek
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: aproszek@ies.krakow.pl

ZASTOSOWANIE APARATU BIOROBOT M48 DO IZOLACJI DNA Z PRÓBEK BIOLOGICZNYCH W BADANIACH SĄDOWYCH

1. Wstęp

Zastosowanie odpowiedniej metody izolacji materiału genetycznego ma zasadniczy wpływ na końcowe wyniki badań. W genetyce sądowej oznaczenie profilu genetycznego z zabezpieczonych śladów biologicznych jest uzależnione od jakości i stężenia DNA, który uzyskuje się w procesie jego ekstrakcji [12, 13, 16]. Niezwykle popularną metodą izolacji DNA stosowaną w wielu laboratoriach sądowych jest fenolowa (tzw. organiczna) metoda izolacji zakończona etapem zagęszczania ekstraktu na kolumnkach Microcon 100. Metoda ta jest niezwykle uniwersalna i pozwala pozyskiwać materiał genetyczny ze śladów biologicznych znajdujących się na różnorodnych podłożach, z próbek narażonych na procesy degradacyjne, ze śladów dotykowych itp. Jednak technika ta nie jest pozbawiona wad. Jest czasochłonna ze względu na etapy wirowania i zagęszczania próbek na kolumnkach celulozowych, uniemożliwia wprowadzenie pełnej automatyzacji, nie w pełni usuwa z izolatów inhibitory reakcji PCR, nie jest obojętna dla zdrowia osób przeprowadzających badania [1, 2, 8, 13]. Obecnie w wielu laboratoriach sądowych obserwuje się tendencje zmierzające do wprowadzania pełnej automatyzacji całego procesu badań. Staje się to konieczne ze względu na potrzebę analizy coraz większej liczby śladów biologicznych i próbek materiału porównawczego oraz skrócenia czasu wykonywania ekspertyz sądowych ze względu na dobro śledztwa. Dąży się do ograniczania metod manualnych, które szczególnie narażone są na możliwość wystąpienia kontaminacji czy też pomyłki ze strony osoby wykonującej badania [4, 7, 15, 17]. Pojawienie się metod izolacji kwasów nukleinowych wykorzystujących separację magnetyczną stworzyło możliwość automatyzacji procesu ekstrakcji materiału genetycznego [9, 15]. Rozwiązanie to zastosowano w urządzeniu BioRobot M48, automatycznej stacji roboczej przeznaczonej między innymi do ekstrakcji DNA ze śladów biologicznych analizowanych w badaniach sądowych [12, 13, 14, 15] oraz do ekstrakcji materiału genetycznego w badaniach z zakresu mikrobiologii i wirusologii [6, 10, 18]. Podczas izolacji magnetycznej do kuleczek magnetycznych pokrytych powłoką z krzemionki przyłączają się izolowane cząsteczki kwasu DNA. W obecności pola magnetycznego wykorzystuje się magnetyczne właściwości tych struktur. Następuje ich odseparowanie wraz z przyłączonym do nich DNA od pozostałych składników komórkowych i ewentualnych zanieczyszczeń mogących znajdować się w próbce poddanej izolacji. W dalszym etapie po kilkukrotnym płukaniu otrzymuje się DNA zawieszony w buforze elu-

cyjnym. Pełna automatyzacja tego procesu pozwala w ciągu zaledwie 2,5 godziny otrzymać 48 ekstraktów czystego DNA [1, 13].

Zastosowanie metod automatycznej ekstrakcji DNA do analizy próbek o dobrej jakości materiału genetycznego nie budzi kontrowersji [1, 2, 4, 5, 7]. Jednak często specyfika badań sądowych polega na konieczności ekstrakcji DNA z próbek, które ulegają procesom degradacyjnym. Celem pracy było poznanie zalet oraz wad izolacji DNA przy zastosowaniu magnetycznej ekstrakcji z użyciem aparatu BioRobot M48 i porównanie wyników badań otrzymanych za pomocą tej metody ze standardowo stosowaną w laboratoriach sądowych metodą fenolową. W wykonanych eksperymentach sprawdzono efektywność metody podczas analizy materiału o dobrej jakości DNA, jednocześnie kładąc nacisk na ocenę działania urządzenia BioRobot M48 przy ekstrakcji próbek biologicznych narażonych na silne procesy degradacyjne.

2. Materiał i metody

2.1. Badane próbki

2.1.1. Typowe ślady biologiczne oraz próbki materiału porównawczego

Materiał do badań stanowiły typowe ślady biologiczne najczęściej zabezpieczane podczas wykonywanych ekspertyz sądowych oraz próbki materiału porównawczego. Pobrano 25 śladów krwi, 12 śladów nasienia, 14 śladów śliny ujawnionych na różnorodnych podłożach, 5 próbek krwi płynnej i 5 wymazów z jamy ustnej. Badaniom poddano również 10 śladów dotykowych zawierających nieznaczną ilość materiału genetycznego (wymaz z karty magnetycznej, portfela, obrączki, uchwytów z szuflad, zegarka, telefonu, klawiatury komputera, długopisu). Od 4 osób zabezpieczono włosy wraz z cebulkami. Wszystkie próbki podzielono na dwie części. Jedną poddano magnetycznej izolacji z użyciem aparatu BioRobot M48 (Qiagen, Hilden, Niemcy), natomiast drugą fenolowej metodzie ekstrakcji.

2.1.2. Zdegradowane ślady biologiczne

Ślady zawierające zdegradowany materiał genetyczny zabezpieczono z 5 kości, z 5 tkanek miękkich zatopionych w bloczkach parafinowych, z 5 fragmentów tkanek miękkich i 10 próbek krwi, w których wystąpiły znaczne procesy gnilne. Materiał kostny poddano wstęp-

nemu oczyszczaniu i dekontaminacji poprzez płukanie w 15% roztworze podchlorynu sodu, w wodzie destylowanej i w 70% alkoholu etylowego. Metodę oczyszczania materiału kostnego zmodyfikowano na podstawie danych zawartych w literaturze [3]. Proszkowanie kości wykonano przy zastosowaniu młyna do kości Freezer/Mill 6750 (Spex CertiPrep, Metuchen, Stany Zjednoczone). Proszek kostny oraz próbki zabezpieczone z tkanek i krwi podzielono na dwie części. Jedną poddano magnetycznej izolacji z użyciem aparatu BioRobotM48, natomiast drugą fenolowej metodzie ekstrakcji.

2.1.3. *Próbki użyte do testu czułości izolacji magnetycznej*

Od dwóch osób pobrano krew obwodową w obecności antykoagulantu oraz wykonano rozcieńczenia tych próbek 1:10 i 1:100. Do badań pobrano po 50 µl krwi i przygotowanych rozcieńczeń. Taki sam zestaw próbek pobrano do izolacji fenolowej.

2.1.4. *Próbki użyte do testu powtarzalności izolacji magnetycznej*

Do izolacji magnetycznej pobrano 5 próbek krwi płynnej (po 50 µl), 5 próbek krwi wylanej na bibułę filtracyjną Whatman 1MM (około 0,25 cm²) oraz wymazy zabezpieczone z jamy ustnej od 5 osób. Eksperyment powtórzono dwukrotnie. Wszystkie pobrane próbki były dobrej jakości i prawidłowo przechowywane.

Dodatkowo powtarzalność izolacji magnetycznej badano, podając próbkę krwi płynnej (50 µl) i krwi wylanej na bibułę filtracyjną Whatman 1MM (około 0,25 cm²) sześciokrotnej analizie.

2.1.5. *Próbki użyte do testu sprawdzającego wydajność izolacji magnetycznej w zależności od czasu inkubacji*

Badaniom podano próbki krwi płynnej (50 µl) i krwi wylanej na bibułę filtracyjną Whatman 1 (około 0,25cm²). Próbki inkubowano w temperaturze 56°C przez 15 minut, 1 h, 2 h, 3 h i 24 h, a następnie poddano izolacji magnetycznej.

2.2. Izolacja magnetyczna

Izolację magnetyczną wszystkich śladów wykonano przy użyciu aparatu BioRobot M48 (Qiagen, Hilden, Niemcy) i zestawu odczynników MagAttract DNA Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z metodyką zalecaną przez producenta [11].

Ślady zawierające krew i ślinę inkubowano przez 15 minut w 190 µl buforu G2 i 10 µl proteiny K (10 mg/ml) w temperaturze 56°C. Tkanki miękkie i ce-

bulki włosowe inkubowano całą dobę w 190 µl buforu G2, 10 µl proteiny K (10 mg/ml) i 10 µl 1 M DTT (Sigma Chemical, Steinheim, Niemcy) w temperaturze 56°C. Bloczki parafinowe poddano inkubacji przez 5 minut w 190 µl buforu G2 w temperaturze 75°C, a następnie całą dobę w temperaturze 56°C w obecności proteiny K (10 mg/ml).

W śladach zawierających nasienie wykonano lizę preferencyjną. Do próbek dodano 190 µl buforu G2 oraz 10 µl proteiny K (10 mg/ml). Próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze 56°C. Po odwirowaniu z każdej próbki pobrano po 200 µl nadsącza zawierającego komórki epitelialne. Frakcję plemnikową przemywano trzykrotnie buforem G2, a następnie inkubowano 24 godziny w 180 µl buforu G2, 10 µl proteiny K (10 mg/ml) i 10 µl 1 M DTT w temperaturze 56°C.

Proszek kostny inkubowano przez 48 godzin w 700 µl 0,5M EDTA pH 8,3 w temperaturze 37°C. Dodano 20 µl proteiny K (10 mg/ml) i wykonano inkubację w temperaturze 56°C.

Wszystkie próbki po inkubacji odwirowano, pobrano po 200 µl nadsącza do nowych probówek i umieszczono w stacji roboczej BioRobot M48.

2.3. Izolacja fenolowa (organiczna)

Próbki zawierające krew i ślinę inkubowano przez całą dobę w temperaturze 56°C w 500 µl buforu lizującego (10 mM Trisbase, 100 mM NaCl, 0,5 M EDTA, 2% SDS) i 15 µl proteiny K (10 mg/ml). Tkanki miękkie i cebulki włosowe traktowano w ten sam sposób, dodając dodatkowo 10 µl 1 M DTT.

W śladach zawierających nasienie wykonano lizę preferencyjną. Do próbek dodano 500 µl buforu lizującego (j.w.) i 15 µl proteiny K (10 mg/ml). Próbki inkubowano przez 60 minut w temperaturze 56°C. Po odwirowaniu z każdej próbki pobrano nadsącz zawierający komórki epitelialne. Frakcję plemnikową przemywano trzykrotnie buforem lizującym, a następnie próbki przeniesiono do łąźni wodnej i inkubowano całą dobę w 500 µl buforu lizującego, 10 µl proteiny K (10 mg/ml) i 10 µl 1 M DTT w temperaturze 56°C.

Fragmety tkanek zatopione w bloczkach parafinowych inkubowano w ksylenie przez 30 minut w temperaturze 65°C. Próbki przepłukano w 100% i 75% etanolu oraz w wodzie destylowanej. Po wysuszeniu tkanki przeniesiono do probówek i inkubowano całą dobę w 500 µl buforu lizującego, 15 µl proteiny K (10 mg/ml) i 20 µl 1 M DTT.

Proszek kostny inkubowano 24 godziny w 3 ml buforu (0,5 M EDTA, 10% SDS), 225 µl proteiny K i 120 µl 1 M DTT w temperaturze 56°C.

Wszystkie próbki po inkubacji poddano podwójnej ekstrakcji DNA w zbuforowanej mieszaninie fenol-chloroform-alkohol izoamylowy (Sigma Chemical, Stein-

heim, Niemcy). Ekstrakty zagęszczano na kolumnkach celulozowych typu Microcon 100, a w przypadku kości zastosowano zagęszczanie na kolumnkach Centricon 100 (Millipore, Billerica, Stany Zjednoczone).

2.4. Pomiar stężenia DNA

Stężenie DNA w badanych śladach mierzono metodą fluorymetryczną przy użyciu barwnika Pico Green (Molecular Probes, Eugene, Stany Zjednoczone) i aparatu Fluoroscanner Ascent FL (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

2.5. Amplifikacja i elektroforeza próbek

Próbki zabezpieczone z materiału kostnego poddano amplifikacji przy wykorzystaniu zestawu Identifiler (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Pozostałe ślady amplifikowano za pomocą zestawu SGM Plus (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Reakcję amplifikacji wykonano w objętości 25 μ l przy stężeniu ekstraktu DNA 2 ng. Amplifikację wykonywano, używając termocyklera 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Produkty PCR analizowano przy użyciu aparatu ABI Prism 3100A (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone). Do opracowania wyników rozdziału elektroforetycznego wykorzystano programy komputerowe GenScan Analysis 3.7 i Genotyper 3.7.

2.6. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne (statystyki opisowe, test T-studenta) przeprowadzono z zastosowaniem programu SPSS v. 12.01.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Porównanie skuteczności izolacji magnetycznej i organicznej w śladach biologicznych i próbkach materiału porównawczego

Dla badanych próbek obliczono średnie stężenia DNA w grupach, odchylenia standardowe oraz wariancję w obrębie poszczególnych grup. Przeprowadzone badania wykazały, że w ekstraktach otrzymywanych po izolacji magnetycznej z użyciem aparatu BioRobot M48 występują niższe stężenia DNA w porównaniu do próbek poddanych izolacji fenolowej. Test T-studenta wykazał, że prawidłowość ta jest istotna statystycznie ($p < 0,05$) dla wszystkich badanych grup próbek (dane nieprezentowane). Jednak analiza wariancji wykazała, że metoda magnetyczna izolacji DNA charakteryzuje się większą precyzją niż metoda organiczna (tabela I). Rycina 1

przedstawia porównanie wydajności dwóch testowanych metod izolacji DNA.

Niższe wartości stężeń DNA w próbkach po ekstrakcji magnetycznej mogły wynikać z krótszego czasu inkubacji w porównaniu z izolacją fenolową. W przypadku typowych śladów biologicznych zaobserwowane różnice nie miały negatywnego wpływu na oznaczania markerów mikrosatelitarnych. Otrzymywane wyniki badań genetycznych z ekstraktów pozyskiwanych dwiema odmiennymi metodami izolacji były porównywalne.

Wszystkie ekstrakty DNA po izolacji magnetycznej były klarowne, podczas gdy niektóre ekstrakty po izolacji fenolowej były nadal zanieczyszczone barwnikami. Pochodziły one najprawdopodobniej z podłoża, z którego zabezpieczono do badań ślady biologiczne. Obserwacje te wskazują, że magnetyczna izolacja pozwala skutecznie usunąć z próbek niektóre barwniki chemiczne mogące mieć wpływ na zahamowanie właściwego przebiegu reakcji amplifikacji i otrzymanie negatywnych wyników badań podczas oznaczania profili genetycznych (rycina 2).

Zautomatyzowana metoda izolacji DNA wykazywała również dużą skuteczność w przypadku badania starych śladów biologicznych. Otrzymywano pozytywne wyniki analizy markerów mikrosatelitarnych z kilkunastoletnich plam nasienia, śliny i krwi.

Odmierna sytuacja wystąpiła podczas badania śladów narażonych na procesy degradacyjne (zgniła krew, tkanki miękkie, materiał kostny). Pośród przebadanych 25 próbek jedynie dla 3 ekstraktów po izolacji magnetycznej udało się oznaczyć niepełny profil genetyczny. Dla pozostałych próbek otrzymano negatywne wyniki badań. Natomiast w próbkach po izolacji organicznej w 3 izolatach oznaczono pełny profil genetyczny, a w 14 próbkach profil niekompletny. Wyniki otrzymane dla śladów narażonych na procesy degradacyjne pokazują, iż przypadku tego typu próbek zdecydowanie lepszą i wydajniejszą metodą izolacji jest izolacja fenolowa. Uzyskane wyniki badań można przynajmniej częściowo wytłumaczyć tym, że podczas izolacji z użyciem aparatu BioRobot M48 do kuleczek magnetycznych przyłącza się DNA o bardzo zróżnicowanej jakości. Występuje tutaj pewnego rodzaju „konkurencja” o kuleczki magnetyczne pomiędzy DNA dobrej jakości i DNA zdegradowanym. Negatywne wyniki badań genetycznych w zakresie oznaczania markerów typu STR w ekstraktach uzyskanych po izolacji na aparacie BioRobot M48 mogą być spowodowane niewystarczającym stężeniem w otrzymywanych izolatach materiału genetycznego odpowiedniej jakości i zbyt wysokim stężeniem DNA zdegradowanego, które może stanowić czynnik hamujący właściwy przebieg reakcji PCR (rycina 3).

W śladach dotykowych zawierających nieznaczące stężenia materiału genetycznego (wymaz z karty magnetycznej, portfela, obrączki, uchwytów z szuflad, zegarka, klawiatury komputera, długopisu) pozytywne wyniki ba-

dań otrzymano w trzech spośród dziesięciu próbek poddanych izolacji magnetycznej. W żadnym z ekstraktów otrzymanych po izolacji fenolowej nie udało się oznaczyć profilu genetycznego. Otrzymanie w większości przypadków negatywnych wyników badań genetycznych wynikało z obecności śladowych ilości DNA w izolatach. Pomiarzy stężenia DNA w większości próbek wynosiły poniżej 100 pg/ μ l.

3.2. Czułość metody izolacji magnetycznej

Badania czułości izolacji magnetycznej wykazały, że wyniki badań genetycznych próbek krwi płynnej i ich rozcieńczeń są nieznacznie lepsze od wyników tych samych próbek poddanych izolacji fenolowej. Z próbki A po izolacji magnetycznej oznaczono niepełny profil genetyczny przy rozcieńczeniu 1:100, podczas gdy w tej samej próbce poddanej izolacji fenolowej niepełny zestaw cech genetycznych otrzymano już przy rozcieńczeniu 1:10. Badania rozcieńczeń próbki B także wskazują, że z ekstraktów uzyskanych po izolacji magnetycznej otrzymano lepsze wyniki analizy markerów mikrosatelitarnych (tabela II).

3.3. Powtarzalność izolacji magnetycznej

Dwukrotna izolacja magnetyczna próbek pobranych z krwi płynnej, krwi wylanej na bibułę filtracyjną i wymazów z jamy ustnej pozwoliła otrzymać porównywalne wyniki badań. Wartości pomiaru stężenia DNA zarówno przy pierwszej, jak i drugiej izolacji, były zbliżone i we wszystkich próbkach oznaczono pełne profile genetyczne.

Wyniki pomiaru stężenia DNA w ekstraktach uzyskanych po sześciokrotnej izolacji próbki krwi płynnej i próbki krwi wylanej na bibułę filtracyjną wskazują, że metoda izolacji magnetycznej dokonanej przy użyciu aparatu BioRobot M48 pozwala na otrzymywanie powtarzalnych wyników badań. Uzyskane wartości testowanych parametrów statystycznych (wartości średnie, odchylenia standardowe, wariancja) dla krwi płynnej wynoszą: $\bar{x} = 4,72$; $SD = 1,24$; $s^2 = 1,5$. W przypadku krwi wylanej na bibułę filtracyjną uzyskane wartości są równe: $\bar{x} = 0,35$; $SD = 0,05$; $s^2 = 0,002$. Wyniki z wskazują, że metoda magnetyczna jest powtarzalna. Różnice w precyzji obserwowane dla próbek krwi wylanej na bibułę filtracyjną i krwi płynnej mogą wynikać ze specyfiki badanego materiału. We wszystkich ekstraktach oznaczono pełne profile genetyczne.

3.4. Porównanie wydajności izolacji magnetycznej w zależności od czasu inkubacji

Wyniki badań otrzymane dla próbek krwi płynnej i krwi wylanej na bibułę wykazały, że wraz z wydłużeniem czasu inkubacji przed właściwym etapem izolacji

magnetycznej następuje wzrost stężenia DNA w otrzymanych ekstraktach (rycina 4). Wydłużenie czasu inkubacji do 24 godzin przyczyniło się do znacznego wzrostu wydajności ekstrakcji w próbce, w której po 15-minutowej inkubacji odnotowano bardzo niską wartość stężenia DNA.

Doświadczenie to pokazuje, że w prosty sposób można przynajmniej częściowo zniwelować efekt przedstawiony na rycinie 1, czyli znaczną dysproporcję pomiędzy stężeniami DNA próbek po izolacji magnetycznej i fenolowej. Na podstawie tej obserwacji wykonano powtórne badania 5 śladów krwi wylanej na bibułę filtracyjną, z których przy 15 minutowej inkubacji podczas izolacji magnetycznej otrzymywano niepełne profile genetyczne. Ponownie pobrano 0,25 cm² bibuły z wylaną krwią i inkubowano przez całą dobę w temperaturze 56°C. Wydłużenie czasu inkubacji spowodowało wzrost stężenia DNA w ekstraktach i pozwoliło na otrzymanie pełnych profili genetycznych w badanych śladach (tabela III).

4. Wnioski

Automatyczna metoda izolacji DNA przy użyciu aparatu BioRobot M48 pozwala w ciągu zaledwie 2,5 godziny otrzymać 48 ekstraktów DNA, co zdecydowanie usprawnia proces pozyskiwania materiału genetycznego ze śladów biologicznych. Wykazano, że w przypadku typowych śladów biologicznych ekstrakcja magnetyczna może w pełni zastąpić metodę izolacji fenolowej. Jednak w sytuacjach, gdy dysponujemy materiałem biologicznym, w którym nastąpiły procesy gnilne uszkadzające znacznie strukturę DNA (ślady zabezpieczone z kości, zgnitych tkanek), skuteczniejszą i wydajniejszą metodą ekstrakcji jest izolacja fenolowa. Pomimo znacznie niższych wartości stężenia DNA w próbkach wyizolowanych metodą magnetyczną otrzymuje się porównywalne wyniki badań w zakresie oznaczania markerów mikrosatelitarnych dla tych próbek i ekstraktów pozyskanych za pomocą izolacji fenolowej. Jednak w celu uwzględnienia znacznego zróżnicowania jakości próbek, które poddaje się procesowi izolacji, celowe jest wydłużenie czasu inkubacji powyżej 2 godzin, a w przypadku dysponowania śladami biologicznymi słabej jakości nawet do 24 godzin. Wpływa to na otrzymywanie wyższych stężeń DNA próbek poddanych izolacji przy użyciu aparatu BioRobot M48, a przez to zwiększa się szansę otrzymywania pozytywnych wyników badań genetycznych. Wprowadzenie automatyzacji ekstrakcji materiału genetycznego zdecydowanie usprawni proces izolacji DNA śladów analizowanych w laboratorium, zwiększy wydajność i zminimalizuje możliwości wystąpienia kontaminacji.