

EVALUATION OF THE AGILENT 2100 BIOANALYZER AS A TOOL FOR DNA ANALYSIS IN FORENSIC GENETICS

Marta GORZKIEWICZ, Anna DULEBA, Edyta RYCHLICKA, Marcin WOŹNIAK,
Tomasz GRZYBOWSKI, Karol ŚLIWKA

Chair of Legal Medicine, Ludwik Rydygier Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, Bydgoszcz, Poland

Abstract

Quantitation and qualification of DNA is crucial for DNA profiling in forensic cases. In this report, we have evaluated the application of the 2100 Bioanalyzer to these initial steps of DNA analysis. On the basis of electropherograms, sizing and quantitation of DNA isolated from reference material and real biological traces was performed. The concentration values obtained using the 2100 Bioanalyzer were compared to Quantifiler results. We concluded that the 2100 Bioanalyzer can be used to analyse a large amount of nondegraded genomic DNA. However, this system is not suitable for analysis of forensic samples.

Key words

Agilent 2100 Bioanalyzer; Quantitative and qualitative analysis; Genomic DNA.

Received 18 January 2010; accepted 16 February 2010

1. Introduction

Determination of quantity and quality of DNA present in samples subjected to genetic examinations is very important for the selection of appropriate conditions of amplification and genotyping reactions. Commercial kits applied to STR profiling are very sensitive to excess of template DNA – in order to obtain reliable results each reaction should contain not more than 0.5–2 ng [11]. Determination of the most appropriate concentration of template DNA often enables one to avoid unnecessary repetitions of PCR reactions and thus decreases the total cost of genetic analysis of biological traces. Many different methods have been applied to quantitative and qualitative analysis of nucleic acids: spectrophotometric measurements, electrophoretic methods with staining, hybridization techniques and quantitative PCR. A comparative analysis of advantages and disadvantages associated with particular methods can be found in Nielsen et al. and Nicklas et

al. [11, 12]. At present, the quantitative real-time PCR method (RT PCR) is considered to be the most accurate method of evaluation of DNA concentration. Due to the fact that this method is based on the same principles as the later stages of STR genotyping, it is very informative in terms of quantity and quality of amplified DNA. In contrast to most other methods, RT PCR method is species specific and thus is free of falsely elevated results caused by the presence of nucleic acids originating from other species as well as other interfering compounds [11, 12]. Moreover, analysis of RT PCR data is fully automated and this practically eliminates differences in interpretation of results that could be caused by the subjectivity of examiners. Additionally, application of internal control to each reaction supplies information on potential inhibitors that can affect PCR reaction. Quantitative real-time PCR has been found to be an accurate, reliable and repeatable method [8]. In consequence, commercial products have appeared on the market based on RT PCR which have

been confirmed to be useful for quantitative DNA analysis of biological traces by numerous forensic genetics laboratories [1, 6, 8, 17].

Technological progress has been accompanied by automation of systems of electrophoretic separation of biomolecules that have enabled determination of their size and concentration faster and more accurately. One of the directions of development in this field is creating techniques based on chip capillary electrophoresis. The history of the development of this technique and its application has been reviewed by Dolnik et al. [3, 4]. One of the first commercially available systems based on the technology of chip separation of nucleic acids is the 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, MA). There are already many applications of this apparatus in analysis of DNA, RNA and proteins [2, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 16]. Appropriate kits and chips have been designed for examination of various types of molecules that differ in size. Many studies have focused on validation of particular kits for analysis of relatively short fragments of nucleic acids, for example PCR products, products of restriction enzyme digestion of plasmids and RNA transcripts [9, 10, 13, 15, 18]. These studies have confirmed that chip electrophoresis can be applied to these examinations and that it performs as well as previous methods. Two unquestionable advantages of chip electrophoresis are: speed of analysis of a relatively high number of samples simultaneously (in the case of 2100 Bioanalyzer, 12 samples per half an hour) and the lower price of analysis of a sample compared to commercial kits used for personal identification. The largest DNA fragments that can be examined using the Agilent 2100 system do not exceed several thousand base pairs. The Agilent DNA 12000 LabChip kit has been designed for determination of size and concentration of double stranded DNA fragments in the range from 1000 to 12000 base pairs. Since the size of DNA molecules obtained using the standard organic extraction method is in the range from 10000–15000 bp [14], and using the DNA IQ System extraction method (Promega Corporation, Madison, WI) is in the range of 60–10000 bp (data from the manufacturer), in this work we have evaluated the usefulness of the chip electrophoresis system for initial analysis of DNA that is the subject of forensic examinations. DNA fragment sizes and their concentration were examined in samples extracted from liquid blood, buccal swabs and real biological traces. Results of quantitative analysis obtained with chip electrophoresis were compared to results obtained with the Quantifiler Human Identification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2. Materials and methods

The study material consisted of 65 samples of genomic DNA: 10 samples of DNA extracted from blood with the standard organic method, 11 DNA samples extracted from buccal swabs using the commercial kit DNA IQ, 11 DNA samples extracted from buccal swabs using the organic method, and 33 DNA samples extracted from biological traces (11 bloodstains, 10 semen stains and 12 cigarette stubs) using the organic method. For the organic DNA extraction method, a mixture of phenol-chloroform was applied. The final stage of the procedure was purification and concentration of DNA extract using Microcon 100 columns (Millipore, Bedford, MA). In the case of semen, spermatozoa were additionally subjected to lysis in the presence of sarcosyl, proteinase K and DTT and the procedure was followed by extraction of two fractions i.e. containing sperm cells and containing female epithelial cells using the phenol-chloroform method as mentioned above. DNA extraction using the DNA IQ kit was carried out in accordance with the manufacturer's recommendations. RT PCR with Quantifiler kit was used as a reference method of evaluation of DNA concentration in all examined samples. Reactions were set up according to the manufacturer's instructions and performed on ABI PRISM 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems). Analyzed samples were subjected to electrophoretic separation on the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Agilent DNA 12000 LabChip kit according to the procedure recommended by the manufacturer. Statistical parameters: average DNA concentration, variance, standard deviation (*SD*) and coefficient of variance (*CV*%) were calculated using MsOffice 2007 Excel computer software.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of fragment size and DNA quality

The organic DNA extraction method gives DNA fragments ranging in size from 10 to 15 kbp [14]. Undegraded DNA is visible on an electropherogram as an extended peak located just before an upper marker or partially overlapping with an upper marker area (Figure 1a, 1b). In turn, a picture showing many short peaks (Figure 1c) is characteristic for degraded samples. As was mentioned in the introduction, DNA extraction performed with the DNA IQ kit generates DNA fragments ranging in size more widely compared to the organic DNA extraction method – DNA fragments are spread along the whole size range and there-

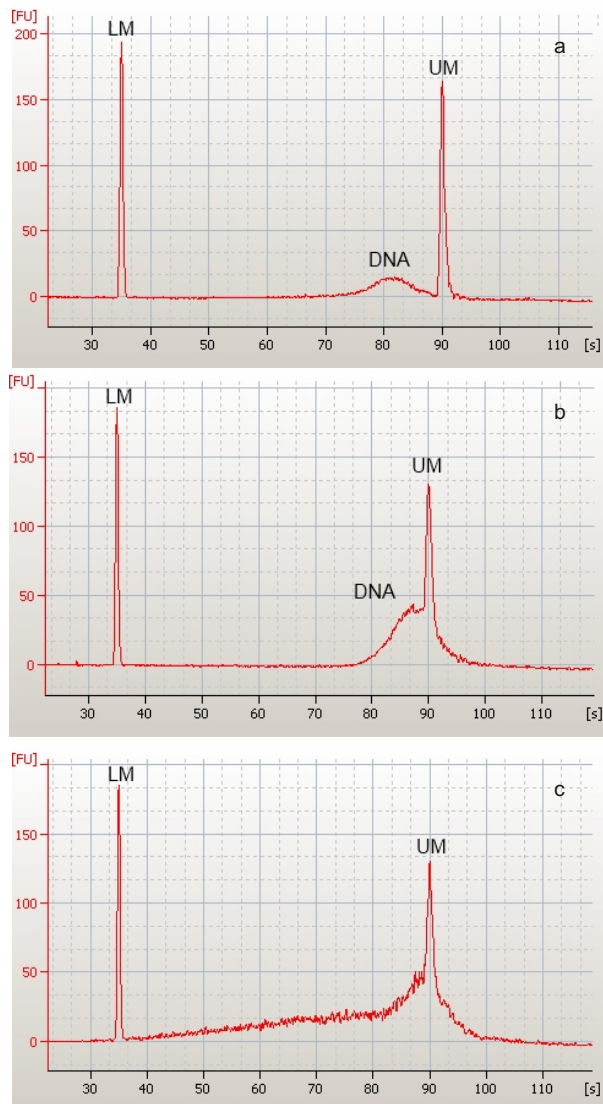


Fig. 1. Qualitative assessment of genomic DNA samples isolated from blood with the organic extraction method: a, b – electropherograms of undegraded DNA samples, c – electropherogram of degraded DNA sample; LM – lower marker, UM – upper marker.

fore there are no visible peaks on the electropherogram. Inspection of the gel view reveals only smooth bands indicating the presence of DNA.

3.2. Repeatability of electrophoresis

In order to evaluate the repeatability of the method, 10 samples of genomic DNA extracted from blood with the organic method were subjected to electrophoresis in three repetitions. For each sample, the average value from three measurements (of DNA concentration), and the variance, standard deviation (*SD*) and coefficient of variance (*CV*%) were calculated. Re-

sults are shown in Table I. Values of coefficient of variance vary from 2.5% to 37.7%; in the case of most samples, the value of *CV*% is less than 25%. The obtained data are similar to values of *CV*% which have been calculated for repeatability of electrophoresis in the case of restriction fragments analysed with the same kit (*CV* ranged from 4–31% depending on the procedure of sample loading) [13] and values given by the manufacturer (25%). These relatively high deviations may result from the low precision of manual loading of samples on the plate (both examined samples and marker). Panaro et al. [13] have shown that the procedure of sample preparation and sample loading affects repeatability of the results. Moreover, the extent of deviations for results of quantitative analysis of genomic DNA originating from the same samples may also be significantly affected by the necessity of manual description of peaks. Software which automatically defines explicit, sharp peaks, needs user intervention in the case of an extended genomic DNA peak. Size determination of electrophoresed DNA fragments seems to be repeatable to a high degree. Because of the fact that DNA examined in these experiments was a mixture of fragments of various sizes, which had been incompletely separated, accurate size determination was impossible. However, as can be seen from Figure 2, the position of the peak that reflects the analyzed DNA is very similar. This result is concordant with results obtained by Panaro et al. [13], who examined repeatability of measurements of restriction fragments and noted a value of coefficient of variance at the level of 1%.

3.3. Evaluation of genomic DNA concentration extracted with the organic method and the DNA IQ system from various biological samples

The 2100 Bioanalyzer was used to determine DNA concentration in 32 DNA samples extracted from reference material (blood and buccal swabs) and 33 DNA samples extracted from real biological traces (bloodstains, semen stains, cigarette stubs). The DNA concentration in all analyzed samples was determined using the Quantifiler kit. A comparison of the results of quantitative analysis using both the methods tested is given in Tables IIA and IIB, respectively.

For most of the samples, DNA concentration determined with the Quantifiler kit was higher than measured with the 2100 Bioanalyzer apparatus. Significant differences (of several to several hundred times) were associated with samples which, according to the reference method, contained more than several dozen ng/ l. Lowered results obtained with the 2100 Bioanalyzer

TABLE I. VALIDATION OF REPRODUCIBILITY OF DNA QUANTIFICATION

Sample	Chip 1	Chip 2	Chip 3	Average	Variance	<i>SD</i>	<i>CV</i> (%)
B_1	3.11	3.36	3.11	3.193	0.014	0.118	3.7
B_2	5.99	5.99	12.52	8.167	9.476	3.078	37.7
B_3	3.14	2.58	2.07	2.597	0.191	0.437	16.8
B_4	10.98	9.97	10.86	10.603	0.203	0.451	4.2
B_5	6.56	6.66	5.83	6.350	0.137	0.370	5.8
B_6	2.92	2.47	3.57	2.987	0.204	0.452	15.1
B_7	5.17	5.00	4.87	5.013	0.015	0.123	2.5
B_8	1.60	2.19	2.69	2.160	0.198	0.445	20.6
B_9	1.13	0.93	1.49	1.183	0.054	0.232	19.6
B_10	1.61	1.51	1.93	1.683	0.032	0.179	10.6

Abbreviations of terms: B – blood, *SD* – standard deviation, *CV*% – coefficient of variance.

could be caused by a too high amount of DNA in the examined samples. The manufacturer recommends that the apparatus should be used for determination of concentrations within the range of 0.5–50 ng/ l; measuring of higher amounts can be unreliable. In the case of sample K_1 (Table IIB), the DNA concentration determined with the 2100 Bioanalyzer was higher than the result obtained using the Quantifiler kit. This result can be explained by the presence of inhibitors in the analysed sample, which negatively affected PCR efficiency (this was confirmed by the result for IPC, where *CT* equalled 35.12), but had no influence on quantitative analysis using the electrophoretic method. A higher concordance between the 2100 Bioanalyzer system and the Quantifiler kit was found for samples which, according to the reference method, had a concentration of approximately several to twenty ng/ l. Only two samples: WP_22 (Table IIA) and NAS_7 (Table IIB) showed a slightly higher concentration when measured with the 2100 Bioanalyzer (4-times and 2-times, respectively), and this could have been caused by a pipetting error or insufficient sample mixing. In general, concentration values measured with the Quantifiler method were higher than after electrophoretic separation on the 2100 Bioanalyzer apparatus for corresponding samples. It is worth considering results of determination of DNA concentration in samples extracted with the DNA IQ kit (Table IIA). Using 2100 Bioanalyzer apparatus, no DNA was determined in these samples, although results obtained with the Quantifiler kit indicated that the amount of DNA is within the detection range of this apparatus. This can be explained by the fact that isolation with the DNA IQ method generates DNA fragments which are very different in size

(60–10000 bp). During electrophoretic separation, no single and wide peak is observed as in the case of DNA extracted with the organic extraction method, and fragments can be spread throughout the entire separation distance. Finally, assuming generally low extraction efficiency (0.5–2.5 ng/ l: data from the manufacturer) in the electropherogram view, there is no single peak which exceeds cut-off value, which is necessary for the detection system to measure fluorescence and on this basis detect DNA. Example peak images from both isolation methods are shown in Figures 3a and 3b. Very high DNA concentration in a sample may lead to disturbances of electrophoretic separation, which, in consequence, lead to incorrect determination of both quantity and size of analyzed DNA fragments (Figures 4a, 4b).

4. Concluding remarks

- The 2100 Bioanalyzer system with the Agilent DNA 12000 LabChip may be successfully applied to quantitative analysis of genomic DNA, but only in samples with a limited DNA concentration range and is not appropriate for accurate determination of DNA concentration in samples containing degraded DNA and very high amounts of DNA;
- The 2100 Bioanalyzer can be used for overall evaluation of DNA fragment size in samples containing relatively high DNA amounts of good quality;
- The 2100 Bioanalyzer can be applied to initial analysis of DNA samples extracted from reference material. The obtained results are sufficient for making a decision as to whether the subsequent stage of analysis should be PCR amplification of

TABLE IIA. RESULTS OF DNA QUANTIFICATION WITH THE 2100 BIOANALYZER AND QUANTIFILER KIT

Sample Reference material	Extraction method	Bioanalyzer 2100	Quantifiler
		Concentration [ng/ l]	Concentration [ng/ l]
B_1	Organic	3.19	32.34
B_2	Organic	8.17	234.64
B_3	Organic	2.6	136.61
B_4	Organic	10.6	137.09
B_5	Organic	6.35	70.62
B_6	Organic	2.99	33.69
B_7	Organic	5.01	28.52
B_8	Organic	2.16	11.28
B_9	Organic	1.18	12.62
B_10	Organic	1.68	8.44
BS_1	IQ	0	9.98
BS_2	IQ	0	48.44
BS_3	IQ	0	78.1
BS_4	IQ	0	21.05
BS_5	IQ	0	14.83
BS_6	IQ	0	26.65
BS_7	IQ	0	23.36
BS_8	IQ	0	6.43
BS_9	IQ	0	4.63
BS_10	IQ	0	6.95
BS_11	IQ	0	2.8
BS_12	Organic	61.98	490.52
BS_13	Organic	13.36	240.61
BS_14	Organic	55.99	137.51
BS_15	Organic	7.01	74.15
BS_16	Organic	55.12	305.68
BS_17	Organic	1.73	353.47
BS_18	Organic	1.1	323.26
BS_19	Organic	15.44	122.92
BS_20	Organic	35.31	641.44
BS_21	Organic	6.78	87.06
BS_22	Organic	2391	507.52

Abbreviations of terms: B – blood; BS – buccal swab; IQ – DNA IQ extraction method.

TABLE IIB. RESULTS OF DNA QUANTIFICATION WITH THE 2100 BIOANALYZER AND QUANTIFILER KIT

Sample Biological trace	Extraction method	Bioanalyzer 2100	Quantifiler
		Concentration [ng/ l]	Concentration [ng/ l]
B_1	Organic	2.98	0.622
B_2	Organic	0	0.938
B_3	Organic	2.42	13.08
B_4	Organic	1.61	10.17
B_5	Organic	0	4.45
B_6	Organic	0	1.22
B_7	Organic	0	9.27
B_8	Organic	0	0.589
B_9	Organic	2	14.92
B_10	Organic	269.88	2693.95
B_11	Organic	1.47	5.15
S_1	Differential	526.67	2365.13
S_2	Differential	83.3	696.7
S_3	Differential	0	8.47
S_4	Differential	0	0.00742
S_5	Differential	0	0.417
S_6	Differential	0	0.0359
S_7	Differential	66.84	38.61
S_8	Differential	0	6.23
S_9	Differential	37.66	214.04
S_10	Differential	10.77	398.09
BE_1	Organic	0	5.97
BE_2	Organic	0	3.06
BE_3	Organic	0	6.42
BE_4	Organic	0	2.31
BE_5	Organic	0	4.6
BE_6	Organic	3.94	25.58
BE_7	Organic	0	1.69
BE_8	Organic	4.4	18.06
BE_9	Organic	0	6.27
BE_10	Organic	0	1.86
BE_11	Organic	0	2.69
BE_12	Organic	2.39	12.29

Abbreviations of terms: B – blood stain; S – semen; BE – butt end.

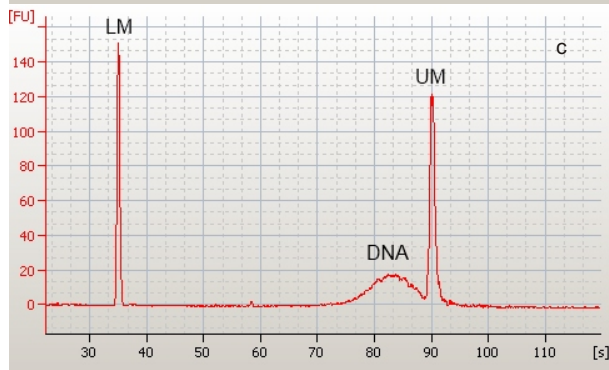
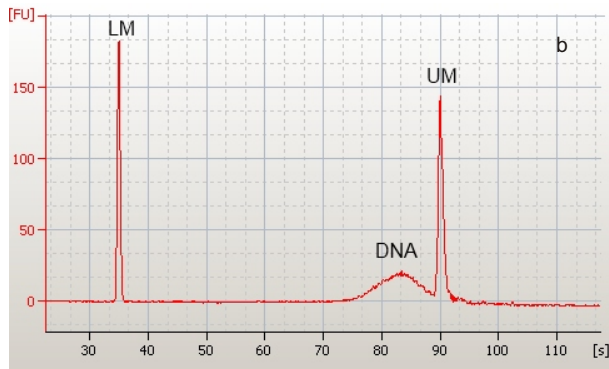
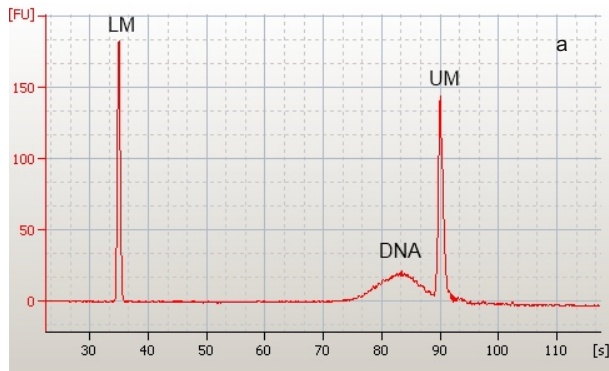


Fig. 2a, b and c. Reproducibility of electrophoretic analysis. Electropherograms of DNA sample with the lowest $CV\%$ value; LM – lower marker, UM – upper marker.

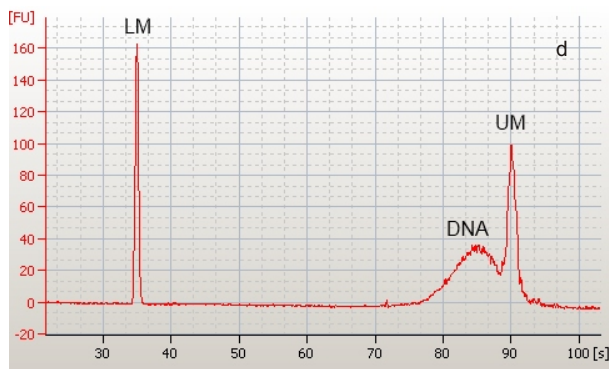


Fig. 2d. Reproducibility of electrophoretic analysis. Electropherogram of DNA sample with the highest $CV\%$ value; LM – lower marker, UM – upper marker.

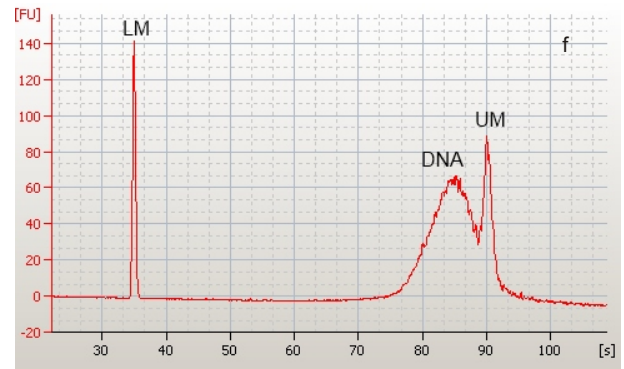
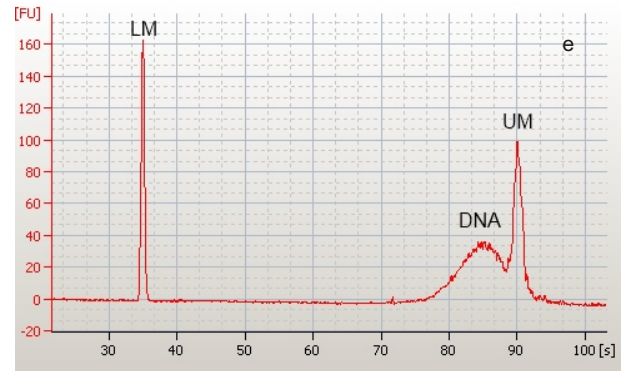


Fig. 2e and f. Reproducibility of electrophoretic analysis. Electropherograms of DNA sample with the highest $CV\%$ value; LM – lower marker, UM – upper marker.

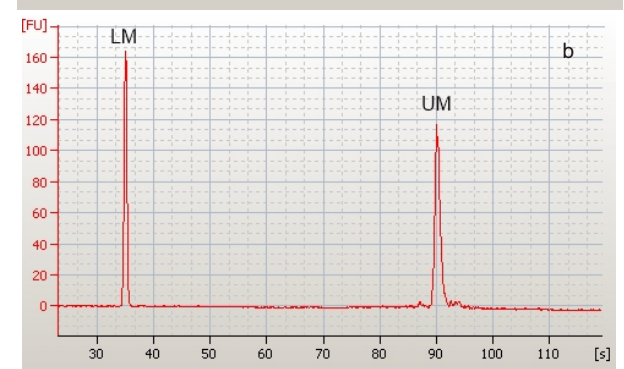
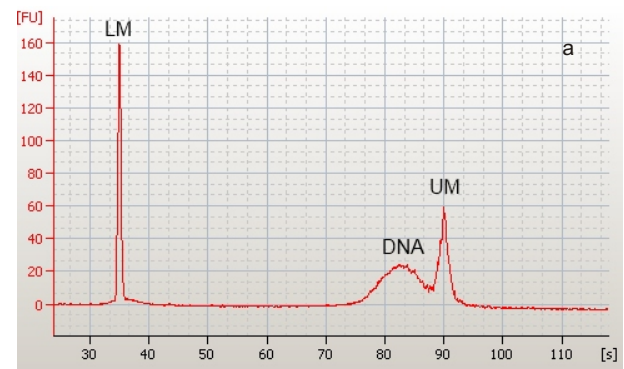


Fig. 3. Comparison of electropherograms of a DNA sample isolated with the organic extraction method (a) and DNA IQ kit (b); LM – lower marker, UM – upper marker.

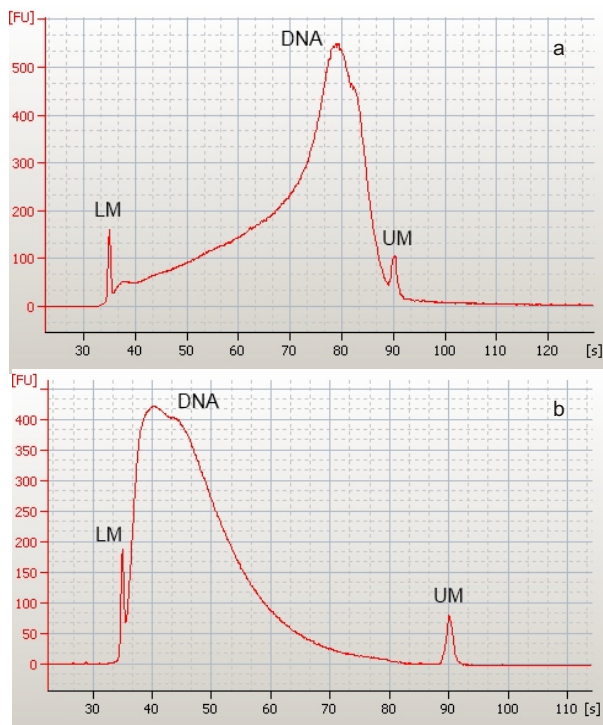


Fig. 4. Aberrations in electrophoresis due to high concentration of DNA ($c > 2000 \text{ ng}/\mu\text{l}$, measured with the Quantifiler). 4a – DNA isolated from bloodstain, b – DNA isolated from semen; LM – lower marker, UM – upper marker.

STR markers (in the case of high amounts of DNA), or whether it is necessary to perform RT PCR (in the case of no detection of DNA based on chip electrophoresis data);

- The 2100 Bioanalyzer is not suitable for evaluation of DNA concentration in biological traces where concentration and quality of DNA is difficult to assess (predict).

References

1. Barbisin M., Fang R., O'Shea C. E. [et al.], Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples, *Journal of Forensic Sciences* 2009, 54, 305–319.
2. Brena R. M., Auer H., Kornacker K. [et al.], Accurate quantification of DNA methylation using combined bisulfite restriction analysis coupled with the Agilent 2100 Bioanalyzer platform, *Nucleic Acids Research* 2006, 7, 34–37.
3. Dolnik V., Liu S., Jovanovich S., Capillary electrophoresis on microchip, *Electrophoresis* 2000, 21, 41–54.
4. Dolnik V., Liu S., Applications of capillary electrophoresis on microchip, *Journal of Separation Science* 2005, 28, 1994–2009.
5. Goetz H., Kuschel M., Wulff T. [et al.], Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2004, 60, 281–293.
6. Green R. L., Roinestad I. C., Boland C. [et al.], Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples, *Journal of Forensic Sciences* 2005, 50, 809–825.
7. Jabasini M., Zhang L., Dang F. [et al.], Analysis of DNA polymorphisms on the human Y-chromosome by microchip electrophoresis, *Electrophoresis* 2002, 23, 1537–1552.
8. Koukoulas I., O'Toole F. E., Stringer P. [et al.], Quantifiler observations of relevance to forensic casework, *Journal of Forensic Sciences* 2008, 53, 135–141.
9. Mueller O., Hahnenberger K., Dittmann M. [et al.], A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation, *Electrophoresis* 2000, 21, 128–134.
10. Nachamkin I., Panaro N. J., Li M. [et al.], Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene, *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39, 754–757.
11. Nicklas J. A., Buel E., Quantification of DNA in forensic samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, 376, 1160–1167.
12. Nielsen K., Mogensen H. S., Hedman J. [et al.], Comparison of five DNA quantification methods, *Forensic Science International Genetics* 2008, 2, 226–230.
13. Panaro N. J., Yuen P. K., Sakazume T. [et al.], Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer, *Clinical Chemistry* 2000, 46, 1851–1853.
14. Sambrook J. I., Russell D., Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.
15. Scott M., Knight A., Quantitative PCR analysis for fruit juice authentication using PCR and laboratory-on-a-chip capillary electrophoresis according to the Hardy-Weinberg law, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 4545–4551.
16. Sodowich B. I., Fadl I., Burns C., Method validation of in vitro RNA transcript analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer, *Electrophoresis* 2007, 28, 2368–2378.
17. Westring C. G., Kristinsson R., Gilbert D. M. [et al.], Validation of reduced-scale reactions for the Quantifiler Human DNA kit, *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52, 1035–1043.

Corresponding author

Marta Gorzkiewicz
 Collegium Medium im. Ludwika Rydygiera
 Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej
 ul. Curie-Skłodowskiej 9
 85-094 Bydgoszcz
 e-mail: gorzkiewiczmarta@cm.umk.pl

OCENA PRZYDATNOŚCI SYSTEMU AGILENT 2100 BIOANALYZER W ANALIZIE DNA NA POTRZEBY GENETYKI SĄDOWEJ

1. Wstęp

Oznaczenie ilości i jakości DNA obecnego w ekstraktach poddawanych badaniom genetycznym ma kluczowe znaczenie dla doboru właściwych warunków reakcji amplifikacji i genotypowania. Komercyjne zestawy używane do profilowania STR są bardzo wrażliwe na zbyt wysokie stężenie matrycowego DNA – by uzyskać wiarygodne wyniki, do reakcji należy dodać go nie więcej niż 0,5–2 ng [11]. Odpowiednio dobrana ilość matrycy DNA często zapobiega niepotrzebnym powtórkom reakcji PCR, co znacznie obniża koszty analizy genetycznej śladów biologicznych.

Do ilościowej i jakościowej analizy kwasów nukleinowych wykorzystywano wiele różnych metod: pomiary spektrofotometryczne, rozdziały elektroforetyczne z barwieniem, techniki hybrydizacyjne i ilościowy PCR. Porównania wad i zalet poszczególnych rodzajów analiz dokonali Nielsen i in. oraz Nicklas i in. [11, 12].

Obecnie za najbardziej dokładną metodę do pomiaru stężenia DNA uważa się ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT PCR, ang. Real-Time PCR). Ze względu na fakt, iż jest on oparty na tych samych zasadach, co prowadzone w dalszych etapach analizy genotypowanie STR, technika ta dostarcza szczególnie cennych informacji na temat ilości i jakości amplifikowanego DNA. W przeciwieństwie do większości innych metod, RT PCR charakteryzuje się specyficnością gatunkową, nie dając fałszywie zawyżonych wyników spowodowanych obecnością domieszki obcych kwasów nukleinowych czy innych interferujących związków [11, 12]. Ponadto analiza danych RT PCR jest całkowicie zautomatyzowana, co praktycznie niweluje zróżnicowanie rezultatów badań wynikające z subiektywnych ocen badaczy. Dodatkowo stosowanie kontroli wewnętrznej reakcji dostarcza informacji na temat obecności inhibitorów reakcji PCR. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym został uznany za metodę dokładną, wiarygodną i powtarzalną [8]. W związku z tym na rynku pojawiły się komercyjne produkty wykorzystujące metodę RT PCR, których przydatność do ilościowej analizy DNA ze śladów biologicznych została oszacowana przez liczne laboratoria genetyki sądowej [1, 6, 8, 17].

Wraz z postępem technologicznym nastąpiła automatyzacja systemów rozdziały elektroforetycznego biocząsteczek pozwalającego określić ich wielkość i stężenie szybciej i precyzyjniej. Jednym z elementów tego rozwoju jest pojawienie się technik opartych na elektroforezie kapilarnej w tzw. mikrochipach (ang. chip capillary electrophoresis). Przeglądu historii rozwoju tej techniki

oraz jej zastosowań dokonał Dolnik i in. [3, 4]. Jednym z pierwszych komercyjnie dostępnych systemów wykorzystujących technologię rozdziały kwasów nukleinowych opartą na chipach jest 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, MA). Znalazł on szereg zastosowań w analizie DNA, RNA i białek [2, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 16]. Do analizy różnego rodzaju cząsteczek o różnej wielkości zaprojektowano odpowiednie zestawy odczynników i płytek chipowych. Wielu badaczy przeprowadziło walidację poszczególnych zestawów do analizy stosunkowo krótkich fragmentów kwasów nukleinowych, takich jak produkty PCR, produkty trawienia plazmidów enzymami restrykcyjnymi czy transkryptów RNA [9, 10, 13, 15, 18]. Stwierdzili oni, że elektroforeza chipowa sprawdza się w tego typu analizach nie gorzej od wcześniej wykorzystywanych metod. Niewątpliwą zaletą elektroforezy chipowej jest szybkość analizy stosunkowo wielu próbek (w przypadku aparatu 2100 Bioanalyzer – 12 próbek w ciągu pół godziny) i niższa cena analizy jednej próbki w porównaniu do komercyjnych testów stosowanych w identyfikacji osobniczej.

Największe fragmenty DNA, jakie można analizować z wykorzystaniem systemu Agilent 2100, nie przekraczają kilkunastu tysięcy par zasad. Zestaw Agilent DNA 12000 LabChip został zaprojektowany do oznaczania wielkości i stężenia fragmentów dwuniciowego DNA w zakresie od 1000 do 12000 pz. Ponieważ wielkość cząsteczek DNA uzyskiwanych podczas izolacji klasyczną metodą organiczną mieści się w zakresie 10000–15000 pz [14], a za pomocą zestawu DNA IQ System (Promega Corporation, Madison, WI) w zakresie 60–10000 pz (dane producenta), w ramach niniejszej pracy dokonano oceny przydatności systemu do elektroforezy chipowej do wstępnej analizy DNA badanego dla potrzeb sądowych. Oznaczano wielkość fragmentów i stężenie DNA wyizolowanego z krwi pełnej, wymazów z wewnętrznej ścianki policzka i rzeczywistych śladów biologicznych. Wyniki analizy ilościowej uzyskane podczas elektroforezy chipowej porównano z wynikami otrzymanymi za pomocą zestawu Quantifiler Human Identification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 65 próbek DNA genomowego: 10 próbek DNA izolowanego z krwi klasyczną metodą organiczną, po 11 próbek DNA izolowanego z wymazów policzkowych, odpowiednio komercyjnym zestawem DNA IQ oraz metodą organiczną, 33 próbki

DNA pochodzące ze śladów biologicznych w postaci 11 plam krwi, 10 plam nasienia i 12 niedopałków papierosowych, z których materiał wyizolowano metodą organiczną.

Izolację DNA metodą organiczną przeprowadzono z wykorzystaniem mieszaniny fenol-chloroform. Końcowym etapem procesu było oczyszczanie i zagęszczanie preparatu DNA na kolumnkach Microcon 100 (Millipore, Bedford, MA). W przypadku nasienia komórki plemnikowe poddano dodatkowej lizie w obecności sarkozyli, proteinazy K i DTT, następnie obie frakcje: plemnikową i nabłonkową ekstrahowano metodą fenol-chloroform jak wyżej. Izolacja DNA za pomocą zestawu DNA IQ została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami producenta.

Jako metodę referencyjną do oceny stężenia wszystkich badanych próbek DNA wykorzystano technikę RT-PCR z zastosowaniem komercyjnego zestawu Quantifiler. Reakcję przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta i wykonano, używając aparatu ABI PRISM 7000 Sequence Detection (Applied Biosystems).

Badane próbki poddano rozdziałowi elektroforetycznemu, stosując aparat Agilent 2100 Bioanalyzer oraz zestaw Agilent DNA 12000 LabChip zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Parametry statystyczne: średnią pomiarów stężenia DNA, wariancję, odchylenie standardowe (*SD*) i współczynnik zmienności (*CV*%) obliczono, posługując się oprogramowaniem Excel z pakietu MS Office 2007.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Ocena wielkości fragmentów i jakości DNA

W wyniku izolacji DNA metodą ekstrakcji organicznej uzyskuje się fragmenty DNA o wielkości 10–15 kpz [14]. Niezdegradowany DNA widoczny jest na elektroforegramie w postaci rozciągniętego piku znajdującego się tuż przed górnym markerem lub częściowo nachodzącego na obszar piku górnego markera (ryciny 1a, 1b). Z kolei obraz o wielu niskich pikach (rycina 1c) jest charakterystyczny dla próbek zdegradowanych. Jak wspomniano we wstępie, w wyniku izolacji DNA z wykorzystaniem zestawu DNA IQ generowane są fragmenty mieszczące się w znacznie większym zakresie rozmiarów w porównaniu do izolacji metodą organiczną – fragmenty te „rozkładają się” na całej długości drogi rozdziału, w efekcie czego na elektroforegramie brak jest widocznych pików. Na obrazie żelu można jedynie zaobserwować delikatne smugi świadczące o obecności DNA.

3.2. Powtarzalność elektroforezy

W celu oceny powtarzalności metody wykonano rozdział elektroforetyczny w trzech powtórzeniach 10 pró-

bek DNA genomowego izolowanego z krwi na drodze ekstrakcji organicznej. Dla każdej próbki obliczono wartość średnią pomiarów stężenia DNA, wariancję, odchylenie standardowe (*SD*) i współczynnik zmienności (*CV*%). Wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli I. Wartości współczynnika zmienności wahają się w granicach od 2,5% do 37,7%; w przypadku większości próbek wartość *CV*% jest niższa od 25%. Otrzymane dane są podobne do wartości *CV*% obliczonych w celu określenia powtarzalności elektroforezy dla fragmentów restrykcyjnych rozdzielanych z wykorzystaniem tego samego zestawu (*CV* w zakresie 4–31% w zależności od procedury nakładania próbki) [13] oraz do wartości podanych przez producenta (25%). Te dość znaczne odchylenia mogą wynikać z niedokładności podczas manualnego nanoszenia prób na płytkę zarówno próbek badanych, jak i markera. Panaro i in. [13] udowodnili wpływ sposobu przygotowania i nanoszenia próbek na powtarzalność wyników. Ponadto nie bez znaczenia dla odchylenia wyników ilościowej analizy genomowego DNA pochodzącego z tych samych próbek jest konieczność manualnego przypisywania pików. Oprogramowanie, które automatycznie definiuje wyraźne, ostre piki, w przypadku rozciągniętego piku genomowego DNA wymaga ingerencji użytkownika.

Określenie rozmiaru rozdzielanych fragmentów DNA wydaje się w dużym stopniu powtarzalne. Ze względu na fakt, że badany w niniejszej pracy DNA stanowi mieszaninę fragmentów o różnej długości, które nie uległy całkowitemu rozdziałowi, niemożliwe było dokładne określenie wielkości. Jednak jak widać na rycinie 2, pozycja piku odpowiadająca badanemu DNA jest bardzo podobna. Pozostaje to w zgodzie z wynikami powtarzalności oznaczeń wielkości fragmentów restrykcyjnych dokonanych przez Panaro i in. [13], którzy uzyskali współczynnik zmienności na poziomie 1%.

3.3. Ocena stężenia genomowego DNA izolowanego metodą organiczną i zestawem DNA IQ z różnego materiału biologicznego

Za pomocą systemu 2100 Bioanalyzer oznaczono stężenie DNA w 32 ekstraktach wyizolowanych z materiału referencyjnego w postaci krwi i wymazów policzkowych oraz w 33 ekstraktach wyizolowanych z rzeczywistych śladów biologicznych (plamy krwi, nasienia, niedopałki papierosów). Stężenie DNA we wszystkich badanych próbkach określono z wykorzystaniem zestawu Quantifiler. Porównanie wyników analizy ilościowej obiema metodami przedstawiają odpowiednio tabela IIA i tabela IIB.

Dla większości próbek stężenie DNA oznaczone zestawem Quantifiler było wyższe niż określone za pomocą aparatu 2100 Bioanalyzer. Znaczne różnice (rzędu od kilku do kilkuset razy) dotyczyły próbek, dla których stężenie określone za pomocą metody referencyjnej wynosiło powyżej kilkudziesięciu ng/ l. Zaniżone wyniki uzys-

kane za pomocą aparatu 2100 Bioanalyzer mogły być spowodowane zbyt dużą ilością DNA w badanych próbkach. Producent zaleca wykorzystanie sprzętu do analizy stężenia w zakresie 0,5–50 ng/ l; oznaczanie większych ilości może nie być wiarygodne. W przypadku próbki K_1 (tabela IIB) stężenie DNA oznaczone za pomocą aparatu 2100 Bioanalyzer było wyższe niż wynik otrzymany przy użyciu zestawu Quantifiler. Prawdopodobną przyczyną była obecność w badanym ekstrakcie inhibitorów, które hamowały reakcję PCR (potwierdza to wynik reakcji IPC, wartość CT równa 35,12), natomiast nie miały wpływu na analizę ilościową metodą elektroforetyczną. Najbardziej zbliżone wartości dla systemu 2100 Bioanalyzer i Quantifiler otrzymano dla próbek, które, według metody referencyjnej, posiadały stężenie rzędu kilka-, kilkanaście ng/ l. Jedynie dwie próbki: WP_22 (tabela IIA) i NAS_7 (tabela IIB) wykazały w teście niewiele wyższe stężenie mierzone aparatem 2100 Bioanalyzer (odpowiednio 4-krotnie i 2-krotnie), co może wynikać z błędów pipetowania lub niedokładnego wymieszania próbek. Generalnie wartości stężenia otrzymane w wyniku testu QF były wyższe dla danej próbki niż po rozdziale elektroforetycznym dokonany aparatem 2100 Bioanalyzer.

Warto zwrócić uwagę na wyniki pomiaru stężenia DNA izolowanego zestawem DNA IQ (tabela IIA). Za pomocą aparatu 2100 Bioanalyzer nie stwierdzono w próbkach analizowanych tą metodą obecności DNA, mimo iż wyniki testu Quantifiler wskazywały, że w badanych ekstraktach znajduje się DNA w ilości mieszczącej się w zakresie detekcji aparatu. Może to wynikać z faktu, że zestaw DNA IQ generuje fragmenty DNA o bardzo zróżnicowanej wielkości (60–10000 pz). Podczas rozdziału nie obserwuje się więc jednego szerokiego pików jak w przypadku protokołu izolacji organicznej, a fragmenty mogą „rozłożyć się” na całej długości drogi rozdziału. W efekcie przy ogólnie niskiej wydajności izolacji (0,5–2,5 ng/ l wg producenta) w obrazie elektroforetycznym żaden pik nie przekracza linii odcięcia, ponad którą aparat zlicza sygnał fluorescencyjny, co stanowi przyczynę braku odczytu stężenia. Przykładowy obraz pików z obu metod izolacji przedstawiają ryciny 3a, 3b.

W przypadku, gdy stężenie DNA w próbce jest bardzo duże, mogą pojawić się zaburzenia w rozdziale elektroforetycznym, które w konsekwencji prowadzą do nieprawidłowego oznaczenia zarówno ilości, jak i rozmiaru badanych fragmentów DNA (ryciny 4a, 4b).

4. Wnioski

- System 2100 Bioanalyzer w połączeniu z zestawem Agilent DNA 12000 LabChip z powodzeniem może być wykorzystywany do analizy ilościowej genomowego DNA jedynie w ograniczonym zakresie stężeń,

- natomiast nie nadaje się do dokładnej oceny stężenia ekstraktów zarówno zdegradowanego DNA, jak i ekstraktów zawierających bardzo duże ilości DNA;
- System 2100 Bioanalyzer można wykorzystać do ogólnej oceny wielkości fragmentów DNA w próbkach o stosunkowo wysokim stężeniu DNA dobrej jakości;
- za pomocą aparatu 2100 Bioanalyzer można wstępnie analizować próbki DNA uzyskane z materiału referencyjnego. Otrzymane wyniki umożliwiają ewentualne podjęcie decyzji, czy kolejnym etapem analizy będzie od razu amplifikacja układów STR (w przypadku dużych ilości DNA), czy należy przeprowadzić analizę RT PCR (w przypadku niewykrycia DNA w elektroforezie chipowej);
- System 2100 Bioanalyzer nie znajduje większego zastosowania do oceny DNA ze śladów biologicznych, których stężenie i jakość trudna jest do przewidzenia.