

Procjena djelotvornosti klasične organske i nove komercijalne metode za izolaciju DNA iz uzoraka kosti primjenom Qubit fluorometra i qPCR uređaja

Žebčević, Dario

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:466901>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET
Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika

Dario Žebčević

PROCJENA DJELOTVORNOSTI
KLASIČNE ORGANSKE I NOVE
KOMERCIJALNE METODE ZA
IZOLACIJU DNA IZ UZORAKA KOSTI
PRIMJENOM QUBIT FLUOROMETRA
I QPCR UREĐAJA

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA

U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET

**Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska
dijagnostika**

Dario Žebčević

**PROCJENA DJELOTVORNOSTI
KLASIČNE ORGANSKE I NOVE
KOMERCIJALNE METODE ZA
IZOLACIJU DNA IZ UZORAKA KOSTI
PRIMJENOM QUBIT FLUOROMETRA
I QPCR UREĐAJA**

Završni rad

Osijek, 2018.

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

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Stana Tokić

Rad ima 36 listova, 2 tablice i 11 slika.

Zahvale

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na ogromnoj pomoći tijekom izrade ovog završnog rada. Hvala na svakom savjetu i strpljenju za sve moje upite.

Veliko hvala višoj tehničarki Ivani Jelavić na pomoći pri radu u laboratoriju.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na potpori i razumijevanju.

Sadržaj

1. UVOD	<i>1</i>
1.1. Građa koštanog sustava.....	1
1.1.1. Koštane stanice	2
1.1.2. Koštani matriks	3
1.1.3. DNA u koštanom tkivu	4
1.2. Izolacija DNA	4
1.3. Mjerenje koncentracije DNA	6
1.3.1. Mjerenje DNA primjenom UV spektrofotometra	6
1.3.2. Mjerenje DNA primjenom QUBIT fluorometra	7
1.3.3. Mjerenje DNA primjenom qPCR uređaja	7
1.4. Prednosti i nedostaci metoda	9
2. CILJEVI	<i>10</i>
3. MATERIJALI I METODE	<i>11</i>
3.1. Materijali	11
3.1.2. Uzorci kosti	11
3.1.3. Upotrijebljene kemikalije.....	11
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Izolacija koštanog praha.....	12
3.2.2. Klasična organska metoda	13
3.2.3. QIAmp DNA Blood Mini Kit	15
3.2.4. PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit.....	16
3.2.5. Mjerenje koncentracije DNA pomoću komercijalnog kompleta „Qubit High Sensitivity DNA“	19
3.2.6. Mjerenje koncentracije DNA pomoću komercijalnog kompleta „Quantifiler Human Quantification DNA Kit“	19
3.3. Statističke metode	20
4. REZULTATI	<i>22</i>
4.1. Analiza prinosa DNA iz koštanog praha na Qubit fluorometru ovisno o izboru	

metode za ekstrakciju DNA	22
4.2. Analiza prinosa DNA iz koštanog praha na QuantStudio 5 PCR uređaju ovisno o izboru metode za ekstrakciju DNA	23
4.3. Analiza podudarnosti mjerenja koncentracije DNA na Qubit fluorometru i QuantStudio 5 PCR uređaju	25
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČAK	30
7. SAŽETAK	31
8. SUMMARY	32
9. LITERATURA.....	33

POPIS KRATICA

PTH – paratireoidni hormon

PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. polymerase chain reaction)

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

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DNaza – deoksiribonukleaza

dsDNA – dvolančana DNA (engl. double stranded DNA)

STR – kratka tandemska ponavljanja (engl. short tandem repeats)

dNTP – slobodni deoksinukleozid trifosfat

DTT – ditiotreitol

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

KO – klasična organska metoda

KP – PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction komplet

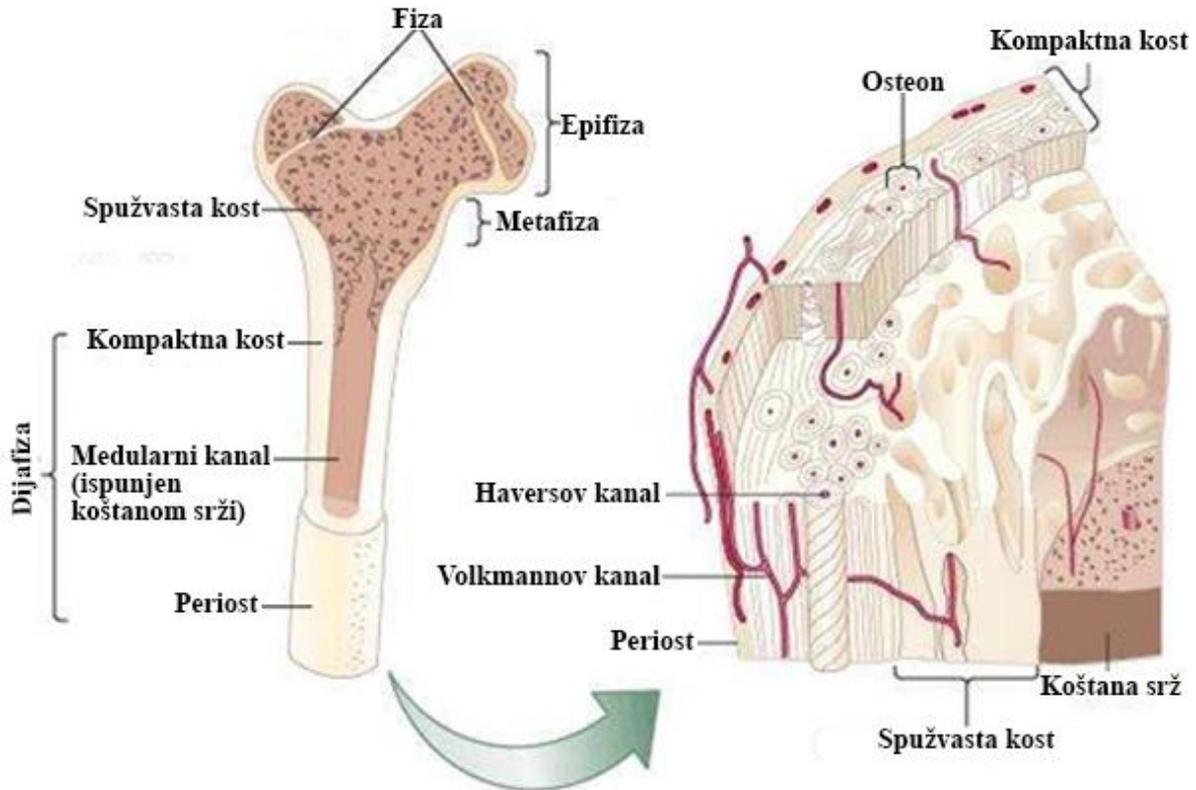
KQ – QIAamp Blood Mini komplet

1. UVOD

Molekularna analiza deoksiribonukleinske kiseline (DNA) iz koštanog tkiva znatno je napredovala od njezinih početaka osamdesetih godina prošlog stoljeća. Ranije se izolacija DNA iz arheoloških kostiju ili kostiju nedavno preminulih osoba smatrala nemogućom. Danas se tipizacija DNA iz kostiju primjenjuje u forenzičkoj identifikaciji, arheologiji, paleopatologiji, taksonomiji, a najznačajniju ulogu odigrala je u istraživanju evolucije čovjeka. Nove, naprednije metode sekvenciranja DNA pomogle su rasvijetliti genetičku informaciju ljudskih predaka, uključujući i evolucijski najbližeg rođaka današnjeg čovjeka, neandertalca (1).

1.1. Građa koštanog sustava

Kostur odrasle osobe sastoji se od 206 kostiju koje pružaju potporu i zaštitu organizmu, omogućuju kretanje, čine važan dio endokrinog sustava, proizvode krvne stanice i pohranjuju anorganske, mineralne elemente. Arhitekturu i sposobnost prilagodbe koštanog tkiva na vanjsko opterećenje prvi je opisao njemački embriolog Wilhelm Roux (1850. – 1924.) uočivši ekonomičnost građe kostiju koja uz minimum građivnog materijala pruža maksimalnu otpornost prema djelovanju vlačnih sila (2). Kost se makroskopski dijeli na dva oblika, kompaktnu (lat. *substantia compacta*) i spužvastu kost (lat. *substantia spongiosa s. trabecularis*). Kompaktna je kost solidne strukture, nema šupljina ispunjenih koštanom srži i prekriva površinske dijelove kosti, gdje se naziva kortikalna kost. Osteon ili Haversov sustav osnovna je građivna jedinica kompaktne kosti, a sastoji se od središnjeg (Haversova) kanala, koji je obložen endostom te sadrži krvne žile i živce, koncentričnih koštanih lamela i lakuna s osteocitima među lamelama. Volkmannovi kanali nalaze se položeni okomito na osteone i povezuju individualne osteone. U kompaktnoj kosti, lamele su pravilno raspoređene u četiri sustava: Haversove lamele, vanjske, rubne, kružne lamele pod vezivnom ovojnicom kosti (periost), unutrašnje kružne lamele na granici prema koštanoj srži (endost) i intersticijske ili prijelazne lamele koje se nalaze među trima spomenutim sustavima (3). S druge strane, u spužvastoj kosti, koštano tkivo oblikuju koštane gredice građene od unutrašnjih osnovnih lamela u kojima nema žilnih kanala (4). Spužvasta koštana tvar najviše je zastupljena u području epifize, a u tankom sloju ispunjava prostor dijafize. Koštane gredice grupiraju se u smjeru djelovanja sila tlaka i vlaka na kost (5), a prostore između koštanih gređica ispunjava koštana srž (Slika 1.).



Slika 1. Građa kosti (preuzeto i prilagođeno s izvora na internetu (6)).

Nadalje, kosti se dijele temeljem oblika na duge, široke i kratke. Epifiza je krajnji dio duge kosti i građena je od spužvaste kosti te je prekrivena tankim slojem kompaktne kosti. Dijafiza čini cilindričan središnji dio duge kosti većinom građen od kompaktne kosti s malo spužvaste kosti. Po mikroskopskoj građi koštano se tkivo dijeli na primarno ili nezrelo i sekundarno ili zrelo tkivo. Primarno je koštano tkivo prisutno u embrionalnom razdoblju, nakon prijeloma i u drugim reparacijskim procesima, a sekundarno koštano tkivo prevladava u odraslih. Koštano tkivo sastoji se od stanica i koštanog matriksa.

1.1.1. Koštane stanice

U koštano tkivu nalazi se nekoliko različitih tipova stanica: osteoblasti, osteociti, osteoklasti i pokrovne stanice. Pokrovne su stanice izduženi i zreli osteoblasti koji pokrivaju endostalnu površinu kosti. Osteoblasti su stanice koštanog tkiva koje proizvode, odlažu i mineraliziraju koštani matriks. Nastaju iz pluripotentnih mezenhimalnih stanica koje se nalaze u periostu, endostu, sinovijalnoj membrani, perihondriju i krvi. Osteoblasti s ostalim stanicama u koštano tkivu čine bazičnu metaboličku jedinicu (engl. basic metabolic unit, BMU) koja održava homeostazu koštanog tkiva (4).

Osteoklasti su velike stanice s nekoliko desetaka staničnih jezgara koje nastaju iz stanica monocitno/makrofagne linije. Njihova je glavna uloga resorpcija kosti lučenjem kolagenaze i drugih enzima koji razgrađuju kolagen i kristale kalcijevih soli.

Osteociti su terminalno diferencirane i najbrojnije stanice koštanog tkiva, a nastaju ukopavanjem osteoblasta u koštani matriks. Smješteni su u lakunama između koštanih lamela i svaka lakuna sadrži jedan osteocit. Svaki osteocit ima brojne citoplazmatske izdanke koji se nalaze u koštanim kanalićima (kanalikulima). Tako su osteociti dobro umreženi s ostalim stanicama koštanog tkiva. Osteociti registriraju promjene u koštanom tkivu temeljem kojih se regulira aktivnost osteoklasta i osteoblasta (5). U odnosu na ostale stanice koštanog tkiva, osteociti izražavaju receptor za karboksilni kraj paratireoidnog hormona (PTH) koji je značajan u intracelularnom prijenosu signala i proapoptotičkoj aktivnosti osteocita (4).

1.1.2. Koštani matriks

Koštani se matriks dijeli na organski i anorganski dio. Organski dio koštanog matriksa sadrži 90 % kolagena tipa I, a ostalih 10 % čine proteoglikani, elastin, glikoproteini, male peptidne signalne molekule i mikrofibrilarni proteini. Kolagen tipa I najzastupljeniji je kolagen koštanog tkiva i nositelj je njegovih biomehaničkih svojstava (4). Sinteza kolagena započinje prepisivanjem gena koji kodiraju α lanac prekursorske molekule preprokolagena koja se zatim pomoću vodeće sekvence usmjerava u lumen endoplazmatskog retikuluma. Slijedi hidrosilacija ostataka lizina i prolina te glikozilacija hidrosilizina u molekuli prokolagena. U toj fazi prokolagen na svojim aminokrajevima i karboksilnim krajevima sadrži polipeptide za produljenje lanca (engl. extension peptide) koji će, zbog svojih cisteinskih ostataka, stvarati disulfidne veze unutar lanca i među lancima. To će pomoći u prepoznavanju molekula kolagena i stvaranju trostruke uzvojnice. Nadalje, prokolagen se izlučuje iz stanice egzocitozom, a prokolagenska aminoproteinaza i karboksiproteinaza kidaju polipeptide za produljenje lanca pri čemu nastaje tropokolagen. Tropokolagen se sastoji od tri polipeptidne α -uzvojnice koje se isprepleću jedna oko druge u desnu stranu te čine jedinstvenu kolagensku trostruku uzvojnica (7). Polimerizacijom tropokolagena nastaju kolagenske fibrile koje se unakrsnim kovalentnim vezama lateralno udružuju u kolageno vlakno tako da je svaka molekula tropokolagena longitudinalno premještena od susjedne za četvrtinu svoje dužine. Među tropokolagenskim molekulama, koje su unutar kolagenog vlakna posložene u četvrtinu razmaknut prored, javljaju se prazni prostori u kojima se smještaju nekolageni proteini i minerali (4,7). Pri djelovanju mehaničke sile na kost,

kovalentne veze u kolagenu mogu biti raskinute i pri tome osloboditi potrebnu energiju za svladavanje energije djelujućeg stresora uz očuvanje strukture koštanog tkiva (4). Za razliku od organskog dijela koji daje elastičnost kosti, anorganski je dio zaslužan za čvrstoću kosti. Anorganski dio 95 % čini kalcijev fosfat ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) u obliku kristala hidroksiapatita, kalcijev fluorid, kalcijev citrat i magnezijev citrat. Kristal hidroksiapatit kompleksna je sol s kalcijem kao središnjim ionom, ima oblik kvadra, a dimenzije su mu određene dimenzijama slobodnog prostora među molekulama kolagena (4). Smatra se da je mehanizam koji dovodi do vezanja DNA na anorganski dio kosti utemeljen na privlačnim ionskim vezama pri čemu se monovalentni i bivalentni kationi unutar kosti ponašaju kao most među negativno nabijenim ionima minerala i DNA. Hidroksiapatit ima snažnu ulogu u zaštiti DNA od prirodne razgradnje i degradacije pod utjecajem vanjskih čimbenika (8).

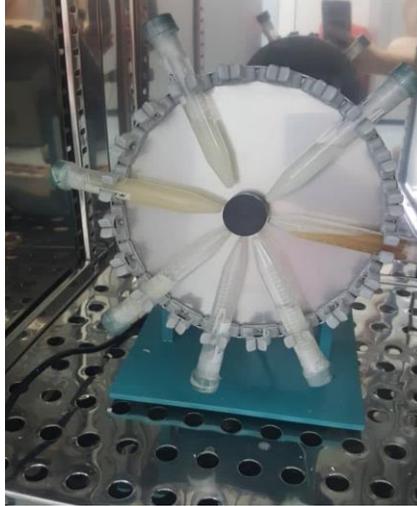
1.1.3. DNA u koštanom tkivu

Kost je dinamičko tkivo koje prate procesi koštanog oblikovanja i preoblikovanja te se počinje razvijati u osmom tjednu embrionalnog razvoja (5). Koštanim oblikovanjem kosti mijenjaju svoj oblik u razdoblju embrionalnog rasta i razvoja pa sve do zrele dobi, ovisno o fiziološkim utjecajima ili mehaničkoj sili. Koštanim se preoblikovanjem održava struktura kosti, popravljaju oštećenje koštanog tkiva i održava homeostaza kalcija i fosfora (5). DNA se obično nalazi unutar koštanih stanica, ali se može naći i u krvi i limfatičkim stanicama. U izvanstanični matriks DNA dopijeva tijekom apoptoze stanica koštanog matriksa prilikom remodeliranja kosti te nakon smrti organizma kao posljedica razgradnih procesa (9). Jedna od najčešće prihvaćenih teorija o očuvanju DNA u kostima obrazlaže opstanak DNA u organskom dijelu koštanog matriksa stvaranjem veze molekule DNA s hidroksiapatitom, kolagenom ili proteinima (10). Kolagen osigurava zaštitu hidroksiapatita što ga čini manje podložnim otapanju, a biomineralizacija s hidroksiapatitom osigurava stabilnost molekule kolagena i usporava kemijsku i biološku degradaciju DNA (9).

1.2. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz koštanog praha najčešće se primjenjuju klasične metode kao što su neafinitetna izolacija organskim otapalima ili afinitetna ekstrakcija vezanjem DNA za čvrstu fazu poput silika kolonica komercijalnog kompleta QIAamp DNA Mini. Neovisno o izboru klasične metode, procesu ekstrakcije DNA iz kosti obavezno prethodi dekalifikacija

koštanog uzorka postupkom višednevnog otapanja koštanog praha u otopini etilendiamintetraoctene (EDTA) kiseline koja veže slobodne katione Ca^{++} i Mg^{++} te inaktivira deoksiribonukleaze (DNaze) (Slika 2.).



Slika 2. Dekalcifikacija uzoraka koštanog praha.

Klasična organska fenol/kloroform metoda temelji se na miješanju fenola i kloroforma u otopini s DNA i proteina u omjeru 1:1. Fenol i voda ne miješaju se pa će stvoriti dvije faze, gornju vodenu i donju organsku. Kloroform u otopini pospješuje razdvajanje dviju faza jer u kombinaciji s fenolom tvori homogenu smjesu veće gustoće, a manje polarnosti u odnosu na vodenu otopinu. Stanične se makromolekule, koje lizom stanice dospijevaju u vodenu otopinu fenola i kloroforma, razdvajaju temeljem polarnosti. Stoga negativno nabijene, hidrofilne molekule DNA reagiraju s molekulama vode, a hidrofobne proteinske regije i lipidne komponente stvaraju komplekse s fenolom. Nakon centrifugiranja dolazi do razdvajanja vodene i organske faze pri čemu lipidi zaostaju u donjoj organskoj fazi, proteini precipitiraju na granici dviju faza, a DNA molekule zaostaju u gornjem vodenom sloju. Vodeni se sloj zatim može prenijeti i organska faza odbaciti. Izolacija se DNA u konačnici postiže dodatkom alkohola koji pospješuje precipitaciju DNA molekula, stoga je DNA moguće istaložiti centrifugiranjem i resuspendirati u odgovarajućem puferu.

Ipak, danas se sve više koriste komercijalni kompleti, primjerice QIAamp Mini DNA i PrepFiler BTA kit, koji se temelje na afinitetnoj ekstrakciji DNA. QIAamp DNA Mini komercijalni komplet sadrži QIAamp silika kolonice koje se mogu postaviti u većinu današnjih mikrocentrifuga. Načelo vezanja DNA na silika kolonicu temelji se na razdvajanju spojeva različitom apsorpcijom i interakcijom između stacionarne i mobilne faze. U uvjetima povišenog pH i povećane koncentracije soli DNA se tijekom kratkog centrifugiranja veže za

QIAamp silika kolonice, a proteini, soli i ostatci organskih otapala ispiru se s kolone. Noviji izolacijski pristup u obliku PrepFiler BTA komercijalnog kompleta nudi mogućnost ekstrakcije DNA s manjim udjelom PCR inhibitora primjenom magnetskih čestica koje specifično vežu i selektivno fiksiraju DNA za površinu magneta tijekom ispiranja, kada se uklanjaju sve druge komponente izolacijske smjese (11). Načelo se rada temelji na nabijenim magnetskim česticama koje pokazuju afinitet za vezanje DNA. Sam proces izolacije DNA primjenom PrepFiler BTA kompleta ne zahtijeva prethodnu demineralizaciju koštanog praha pa je time postupak izolacije DNA iz kosti olakšan i ubrzan (12).

1.3. Mjerenje koncentracije DNA

Nakon izolacije DNA slijedi mjerenje koncentracije dobivenog izolata primjenom analitičkih uređaja poput UV spektrofotometra, QUBIT fluorometra ili qPCR uređaja.

1.3.1. Mjerenje DNA primjenom UV spektrofotometra

Spektrofotometar mjeri količinu zračenja određene valne duljine koju je apsorbirala mjerena otopina. Ovisnost apsorpcije nekog monokromatskog zračenja o koncentraciji tvari kroz koju zračenje prolazi opisuje Lambert-Beerov zakon. Prema tomu zakonu, intenzitet propuštenog zračenja eksponencijalno se smanjuje s povećanjem koncentracije neke homogene otopine. Lambert-Beerov se zakon prikazuje jednačinom:

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

koja označava da je apsorbancija (A) jednaka negativnom logaritmu omjera intenziteta propuštenog zračenja (I) i intenziteta upadnog zračenja (I_0). Nakon izmjerene apsorbancije, koncentracija tražene supstance određuje se formulom:

$$A = \epsilon cL$$

pri čemu je apsorbancija (A) jednaka umnošku molarnog koeficijenta apsorpcije (ϵ) koncentracije tvari u otopini (c) i promjene valne duljine pri prolasku kroz mjerenu otopinu (L). Mjerenje apsorbancije na valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm primjenjuju se za procjenu koncentracije i čistoće DNA u ispitivanim uzorcima. Niske vrijednosti omjera A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} upućuju na onečišćenje uzorka DNA proteinima i organskim otapalima, ali je metoda nedovoljno osjetljiva u uzorcima izrazito niske koncentracije DNA.

1.3.2. Mjerenje DNA primjenom QUBIT fluorometra

Fluorometrija je analitička metoda za kvantitativno određivanje koncentracije tvari temeljem intenziteta njihove fluorescencije pomoću fluorometra. Fluorescencija neke tvari može se izmjeriti nakon apsorpcije fotona čija energija uzrokuje prelazak elektrona iz osnovnog singlet stanja (S_0) u jedno od nekoliko razina vibracijskog stanja (S_1 , S_2) atoma ispitivane tvari. Unutar 10^{-13} do 10^{-11} sekundi pobuđeni elektroni spuštaju se iz viših vibracijskih razina (S_2) na nižu vibracijsku razinu S_1 . Iz vibracijske razine (S_1) elektron se vraća u osnovno singlet stanje (S_0) uz emisiju fotona zračenja (fluorescencija). Budući da se nešto apsorbirane energije utroši na stvaranje vibracijskog pobuđivanja, emisijsko, fluorescentno zračenje niže je energije i veće valne duljine od one apsorbiranog zračenja (Stokesov pomak). QUBIT fluorometar određuje koncentraciju DNA temeljem vezanja specifičnih fluorescentnih boja za dsDNA (od engl. double stranded DNA). Fluorescentne boje osiguravaju specifičnost i osjetljivost jer fluorescentni je signal lako identificirati i postoji mogućnost pojačavanja signala tako da se mogu detektirati manje količine uzorka i zabilježiti male razlike u koncentraciji. Ipak, metoda je neosjetljiva na prisutnost PCR inhibitora, ili fragmentiranih DNA molekula, stoga je manje prikladna za kvalitativnu analizu DNA (13).

1.3.3. Mjerenje DNA primjenom qPCR uređaja

Metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, qPCR (od engl. quantitative PCR), vrsta je PCR reakcije koja se temelji na mjerenju fluorescencijskog signala tijekom amplifikacije DNA u eksponencijalnoj fazi PCR reakcije. Uspješnu amplifikaciju DNA tijekom PCR reakcije osigurava prisutnost kratkih oligonukleotidnih početnica koje vežu ciljne sljedove DNA molekule i osiguravaju specifično umnažanje genskih odsječaka. Osim toga, PCR smjesi dodaju se slobodni deoksinukleozid trifosfati (dNTP), pufer i $MgCl_2$ koji je važan za polimeraznu aktivnost enzima Taq DNA polimeraze tijekom PCR reakcije. Porast broja kopija umnoženih DNA odsječaka u stvarnom vremenu moguće je pratiti TaqMan probom koja veže specifične regije DNA između dviju početnica. Na 5' kraju TaqMan probe pričvršćena je „reporter“ boja, a na 3' kraju nalazi se „quencher“ boja. Na početku PCR reakcije, kada je proba netaknuta, a „reporter“ boja u neposrednoj blizini „quencher“ boje, ne dolazi do pojave fluorescencije (14). Tijekom faze elongacije, Taq DNA polimeraza koristi svoju 5'-egzonukleaznu aktivnost za cijepanje vezane probe što rezultira emisijom fluorescentnog zračenja reporter fluorokroma s 5' kraja TaqMan probe (15). Sama

PCR reakcija odvija se u trima osnovnim koracima: inicijalna denaturacija dvolančane DNA na 95°C, pad temperature na 60°C i vezanje početnica (engl. annealing) za komplementaran jednolančani kalup, nakon čega tijekom posljednje faze elongacije, na optimalnoj radnoj temperaturi od 72 °C, enzim Taq DNA polimeraza sintetizira novi lanac DNA molekule. Tijekom više ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja PCR smjese dolazi do amplifikacije velikog broja DNA odsječaka.

U svrhu određivanja koncentracije DNA na uređaju real-time PCR često se primjenjuje metoda apsolutne kvantifikacije koja podrazumijeva usporedbu vrijednosti fluorescencije nepoznatih uzoraka s fluorescencijom uzoraka poznate koncentracije, tzv. standardima. Standardi se s nepoznatim uzorcima umnažaju tijekom PCR reakcije, a broj PCR ciklusa u kojem fluorescentni signal nadmašuje pozadinski signal ili prag fluorescencije označava se kao Ct vrijednost (od engl. threshold cycle) i proporcionalan je početnoj količini DNA materijala u ispitivanom uzorku. Izmjerene Ct vrijednosti i poznate koncentracije standardnih razrjeđenja koriste se za pripremu standardne krivulje koja zatim služi za određivanje koncentracije DNA u nepoznatim uzorcima. U PCR reakciji 100 %-tne učinkovitosti očekujemo linearan porast fluorescencije u odnosu na koncentraciju DNA u uzorcima serijskih razrjeđenja, stoga se učinkovitost PCR reakcije može izračunati iz vrijednosti nagiba pravca standardne krivulje prema jednadžbi:

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

Nagib pravca standardne krivulje određuje se usporedbom omjera Ct vrijednosti i koncentracije DNA izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje prema jednadžbi:

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

(16).

1.4. Prednosti i nedostatci metoda

Interakcije između mineralne matrice i DNA molekula u izvanstaničnom prostoru koštanog tkiva otežavaju proces izolacije DNA iz kosti jer za uspješnu je ekstrakciju i posljedične analitičke procese potrebno nadvladati veze između DNA, hidroksiapatita i kolagena tipa I. Izolaciju kvalitetnog genetičkog materijala dodatno otežava dugotrajna izloženost posmrtnih ostataka procesima razgradnje u tlu koji pospješuju oštećenje DNA molekula i kontaminaciju uzoraka kosti mikrobnom DNA. Rezultati su izolacije DNA iz koštanog tkiva stoga nerijetko niske kvalitete, s malom koncentracijom DNA i visokim udjelom zaostalih otapala i neproteinskih onečišćenja koja ometaju posljedičnu PCR analizu (17). EDTA tretmani koji prethode izolaciji DNA iz koštanog praha često rezultiraju viškom proteina i drugih biomolekula koje se u reakcijskoj smjesi mogu ponašati kao endogeni PCR inhibitori (17). Takve inhibitorne učinke posreduju primjerice produkti Maillardove reakcije, razgradni tkivni produkti poput hema i mioglobina, bakterijska DNA, sastojci tla poput fulvinske i humusne kiseline, tanini i kompleksirajući ioni željeza u fero obliku (Fe^{++}) (18). Humusna kiselina ima ista fiziokemijska svojstva kao fosfatne skupine nukleotida DNA zbog čega tijekom procesa izolacije dolazi do kompeticije s molekulom DNA za mjesta adsorpcije (17). Zanimljiv je podatak da minimalna koncentracija od 0,08 μ l/ml humusne kiseline može uzrokovati inhibiciju najosjetljivije Taq polimeraze (17).

Dosadašnji rezultati usporednih studija učinkovitosti izolacijskih tehnika pokazuju da afinitetne metode utemeljene na načelu ekstrakcije DNA vezanjem za silika gel, u odnosu na klasičnu, organsku metodu, daju veći prinos DNA s manjim udjelom PCR inhibitora (17). Međutim, velika raznolikost komercijalnih protokola koji primjenjuju silicijeve membrane, a u pretkoraku se dekalifikacije koriste različitim puferima za digestiju, u različitim temperaturnim i vremenskim intervalima otežava usporedbu i izbor optimalne metode za izolaciju DNA iz kosti. Nove afinitetne matrice u obliku magnetskih kuglica pružaju mogućnost izolacije DNA bez prethodne dekalifikacije, ali je početan unos koštanog materijala, pa i prinos DNA materijala, ograničen brojem i veličinom kuglica u jednoj reakciji.

U konačnici, koncentracija i strukturni integritet izolirane DNA imaju najvažniju ulogu na učinkovitost PCR reakcije i uspješnost forenzičke analize koštanih uzoraka. Analiza premale količine ili fragmentirane DNA može rezultirati gubitkom specifičnog PCR produkta. Suprotno tomu, u uvjetima prevelike koncentracije DNA česta je pojava neželjenih nespecifičnih PCR fragmenata (19). Zbog navedenog, mjerenje količine i kvalitete DNA izrazito je važno u svrhu postizanja optimalnih rezultata u forenzičkim analizama.

2. CILJEVI

Ciljevi su provedenog istraživanja:

- 1) ispitati i usporediti prinos i čistoću DNA iz koštanog praha nakon izolacije pomoću klasične organske metode, QIAamp Blood Mini kompleta i PrepFiler BTA komercijalnog seta,
- 2) utvrditi djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju mjerenjem podudarnosti koncentracije DNA izmjerene na Qubit fluorometru i qPCR uređaju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.2. Uzorci kosti

Istraživanjem je obuhvaćeno deset arhivskih uzoraka koštanog praha koji su temeljem ugovora između Ministarstva hrvatskih branitelja i Medicinskog fakulteta Osijek prethodno izuzeti u svrhu identifikacije posmrtnih ostataka osoba nestalih u Domovinskom ratu. Za potrebe istraživanja upotrijebljen je dio koštanog praha (0,1g/uzorku) preostao nakon provedene analize DNA, sukladno odobrenju Uprave za zatočene i nestale pri Ministarstvu branitelja. Tijekom postupka izolacije, analize i interpretacije rezultata upotrijebljeni su kodirani identifikacijski brojevi, a identitet posmrtnih ostataka nije otkriven ni u jednoj fazi istraživanja. Studiju je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku (potvrda br.602-01/18/08/07).

3.1.3. Upotrijebljene kemikalije

- Autoklavirana i deionizirana H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 0,5M EDTA, pH=8.0 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- SDS (10%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 500 mM DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Phenol – chloroform – isoamyl alcohol mixture, 100 mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- 1 M Tris-HCl, pH=8 (Ambion, Carlsbad, CA, SAD)
- Proteinaza K, 20 mg/mL (Ambion, Carlsbad, CA, SAD)
- Centrikon-100 filter tubice (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)
- QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka)
 - Proteinaza K
 - AL pufer (Buffer AL)
 - Etanol (96 – 100 %)
 - AW1 pufer (Buffer AW1)
 - AW2 pufer (Buffer AW2)
 - AE pufer (Buffer AE)

- PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)
 - PrepFiler Lysis Buffer
 - PrepFiler Magnetic Particles
 - PrepFiler BTA Lysis Buffer
 - PrepFiler Wash Buffer A Concentrate
 - PrepFiler Wash Buffer B Concentrate
 - PrepFiler Elution Buffer Proteinase K

- Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, SAD)
 - Qubit® dsDNA HS Reagent (Component A)
 - Qubit® dsDNA HS Buffer (Component B)
 - Qubit® dsDNA HS Standard #1 (Component C)
 - Qubit® dsDNA HS Standard #2 (Component D)

- Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)
 - Quantifiler PCR Reaction Mix (store at 2 to 8°C).
 - Quantifiler Human DNA Standard (store at -15 to -25°C).
 - Quantifiler Human Primer Mix (store at -15 to -25°C).

3.2. Metode

U radu su primijenjene tri metode za izolaciju DNA: klasična organska fenol/kloroform metoda, QIAamp DNA Blood Mini Kit i PrepFiler Forensic DNA Extraction Kit. Mjerenje koncentracije DNA provedeno je pomoću real-time PCR uređaja QuantStudio 5 (Applied Biosystems, SAD) i fluorometra Qubit (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.2.1. Izolacija koštanog praha

Uzorci su kosti očišćeni pod mlazom vode i nožem su mehanički uklonjene sve nečistoće poput zemlje, tkiva i koštane srži. Zatim su kosti oprane metalnom četkom i Kemexom dva puta te isprane destiliranom vodom. Slijedi pranje plastičnom četkom i varikinom (13 %) te ponovno ispiranje dva puta destiliranom vodom i dva puta etanolom (70 %). Kostu su ostavljene da se suše preko noći. Sljedeći dan, prije brušenja, kosti su prebrisane

etanolom (70 %) i stavljene pod UV svjetlo 15 – 20 minuta. U sterilnom je prostoru izbrušen i bačen površinski sloj kosti do dubine 2 mm. Nastavak je brusilice očišćen četkom i varikinom, ispran destiliranom vodom i etanolom (70 %) te je ostavljen da se osuši na zraku. Nakon toga nastavljeno je brušenje kosti na čist i UV tretiran A4 papir. Koštani je prah prebačen s papira u sterilne polipropilenske epruvete od 15 ml, do količine 0,1 g.

3.2.2. Klasična organska metoda

Fenol/kloroform klasična organska metoda neafinitetna je metoda izolacije DNA koja uklanja sve proteine iz otopine čime ujedno pročišćava DNA. Prednost je te metode mogućnost izolacije DNA iz širokog spektra uzoraka, ali je postupak dugotrajan, pojava zaostalih organskih otapala učestala, a upotrijebljene kemikalije izrazito toksične (18).

Izolacija DNA učinjena je pomoću klasične, organske metode prema sljedećem protokolu:

U sterilne tubice od 15 ml odvagano je 100 mg pripremljenog koštanog praha i dodana 3 ml 0,5 M otopine EDTA (pH 8.0). Nakon kratkog vorteksiranja uzorci su postavljeni u rotator i preko noći inkubirani na 37 °C pri brzini od 950 obr/min. Sljedeći su dan uzorci koštanog praha istaloženi centrifugiranjem tijekom tri minute na 5000 rpm/min, a supernatanti su odbačeni. Postupak je dekalifikacije ponovljen nakon dodatka 3 ml 0,5 M otopine EDTA u svaku tubicu koje su zatim vorteksirane i inkubirane pod istim uvjetima. Isti postupak dekalifikacije ponovljen je i treći dan. Četvrti su dan uzorci koštanog praha istaloženi centrifugiranjem, supernatant je uklonjen, a talog je ispran dodatkom 3 ml sterilne destilirane H₂O. Nakon kratkog miješanja na vorteksu uzorci su istaloženi centrifugiranjem tri minute na 5000 rpm/min. Postupak je ponovljen još jednom, a zatim je u preostao talog dodano 40 µl proteinaze K te 400 µl prethodno pripremljenog ekstrakcijskog pufera (1 M Tris-HCl pH=8, 0,5 M EDTA pH=8, 10 % SDS, 500 mM DTT, high pure H₂O). Pripremljena smjesa zatim je prebačena u novu tubicu od 2 ml i inkubirana uz miješanje 24 h na 60 °C. Sljedeći je dan u smjesu liziranih stanica dodano 500 µl otopine fenol-kloroform-izoamilnog alkohola (125:24:1) i tubice su promiješane izvrtanjem deset minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani deset minuta na 8000 rpm/min. Gornja vodena faza prebačena je u novu tubicu s 500 µl fenol-kloroform-izoamilnog alkohola te su uzorci izmiješani laganim okretanjem tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Postupak je centrifugiranja i prikupljanja vodene faze ponovljen te je u ukupan volumen vodene faze

dodano 500 μ l n-butanola. Smjesa je promiješana laganim okretanjem, a zatim razdvojena centrifugiranjem dvije minute na 5000 g. Nakon centrifugiranja donja je faza polako ispipetirana u novu tubicu, a gornja je faza bačena (Slika 3.).



Slika 3. Prikaz gornje i donje faze smjese kod fenol/kloroform metode koje nastaju zbog razlike u gustoći tekućina.

Dobiveni izolat dodatno je pročišćen centrifugiranjem pomoću Centrikon-100 filter kolonica (Applied Biosystems) koje su pripremljene za korištenje dodatkom 2 ml TE pufera i centrifugiranjem pet minuta na 2000 g. Postupak je ponovljen dva puta i po završetku drugog koraka ispiranja Centrikon su tubice izokrenute, a ostatak TE pufera spušten je u kapicu Centrikona centrifugiranjem dvije minute na 1000 g.

Vodena je donja faza svakog uzorka razrijeđena TE puferom do volumena 2 ml i zatim prebačena u Centrikon-100 tubice. Tubice su centrifugirane 30 minuta na 2000 g u fiksnom rotoru. Postupak ispiranja i centrifugiranja ponovljen je nakon dodatka 2 ml TE pufera u Centrikon-100 tubice. Prikupljeni su izolati zatim spušteni u kapicu Centrikona centrifugiranjem dvije minute na 1000 g, a potom su prebačeni u PCR tubice. Svaki je uzorak označen jedinstvenom identifikacijskom oznakom i pohranjen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. QIAamp DNA Blood Mini Kit

Izolacija DNA provedena je pomoću komercijalnog kompleta „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ prema sljedećem protokolu:

U svaku sterilnu tubicu od 15 ml odvagano je 100 mg koštanog praha i dodana su 3 ml 0,5 M otopine EDTA (pH 8.0). Nakon kratkog miješanja na vorteksu uzorci su preko noći inkubirani na 37 °C uz stalno miješanje na rotatoru pri brzini od 950 obr/min. Sljedeći dan uzorci su centrifugirani tri minute na 5000 rpm/min, a supernatant je odbačen. U talog svakog uzorka dodana su 3 ml 0,5 M otopine EDTA, smjesa je kratko promiješana, a zatim inkubirana preko noći na 37 °C u rotatoru pri brzini od 95 obr/min. Isti postupak ponovljen je sljedeći dan. Četvrti dan uzorci su istaloženi centrifugiranjem, supernatant je bačen, a u talog su dodana 3 ml sterilne destilirane H₂O. Nakon kratkog miješanja uzorci su ponovno istaloženi centrifugiranjem tri minute na 5000 rpm/min. Postupak je ispiranja vodom ponovljen. U preostali talog svake tubice dodano je 40 µl proteinaze K i 400 µl ATL pufera te su uzorci dobro promiješani na vorteksu tijekom jedne minute. Uzorci su zatim inkubirani 24 sata na 60 °C uz stalno miješanje na uređaju Eppendorf Thermomixer. U suspenziju liziranih stanica sljedeći je dan dodano 400 µl AL pufera te su uzorci inkubirani jedan sat na 70 °C uz miješanje. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pet minuta na 3000 rpm/min, a odvojeni supernatant prebačen je u novu tubicu od 2 ml i u sljedećem koraku pomiješan s jednakim volumenom apsolutnog etanola. Zatim je na svaku spin kolonicu QIAamp DNA Blood Mini komercijalnog kompleta naneseo 700 µl uzorka, zatvoreni su poklopci i spin su kolonice centrifugirane jednu minutu na 8000 rpm/min. QIAamp Mini kolonice potom su udružene s novim kolekcijским tubicama, ostatak je uzorka nanesen na spin kolonu koja je zatim centrifugirana jednu minutu na 8000 rpm/min (Slika 4.).



Slika 4. QIAamp Mini kolonica s tubicom nakon procesa centrifugiranja.

QIAamp Mini kolonice prebačene su u nove koleksijske tubice i dodano je 500 μ l pufera AW1 u svaki uzorak te su uzorci centrifugirani jednu minutu na 8000 rpm/min. Postupak ispiranja ponovljen je s 500 μ l pufera AW2 centrifugiranjem tri minute na 14000 rpm/min. Protok je odbačen i uzorci su još jednom centrifugirani jednu minutu na 14000 rpm/min. Kolonice su prebačene u nove tubice od 1,5 ml te je dodano 150 μ l AE pufera. Uzorci su inkubirani jednu minutu na sobnoj temperaturi i centrifugirani jednu minutu na 8000 rpm/min. Prethodni je korak ponovljen, a zatim je 300 μ l eluata svakog uzorka koncentrirano centrifugiranjem u centrikonu Amicon Ultra 4 (Merck Milipore, SAD) tijekom pet minuta pri 4000 rpm/min. Tipsom je zatim s dna membrane centrikona pažljivo pokupljen koncentrirani DNA izolat. Svaki je uzorak označen jedinstvenom identifikacijskom oznakom i pohranjen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit

PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction komercijalni komplet sadrži reagens za lizu stanica, uklanjanje PCR inhibitora, magnetske čestice za vezanje genomske DNA te eluiranje koncentrirane i pročišćene DNA (11). Dizajniran je za izolaciju DNA iz uzoraka kosti i zubi.

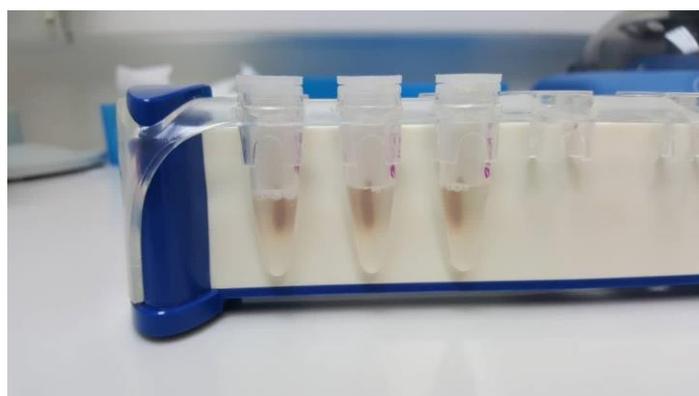
Izolacija DNA provedena je pomoću komercijalnog kompleta „PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit“ prema sljedećem protokolu:

Miješalica Eppendorf Thermalshaker zagrijana je na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. U svaku je sterilnu tubicu od 2 ml izvagano 100 mg koštanog praha i dodano 220 μ l PrepFiler BTA Lysis pufera, 3 μ l DTT (1,0 M) i 7 μ l proteinaze K. Nakon toga tubice su zatvorene i promiješane 5 s na short spin vorteksu. Tubice su zatim postavljene u zagrijanu miješalicu i inkubirane 2 h na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri brzini od 1100 rpm. Nakon inkubacije uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani 90 s pri maksimalnoj brzini od 14.000 rpm. Dobiveni bistri supernatanti otpipetirani su u nove 1,5 ml tubice te je svakom uzorku dodano 300 μ l PrepFiler BTA Lysis pufera. Magnetske su kuglice pripremljene za rad miješanjem na vorteksu tijekom 5 s. Svakom uzorku zatim je dodano 15 μ l PrepFiler Magnetic Particles reagensa te su tubice vorteksirane 10 s pri niskoj brzini (Slika 5.).



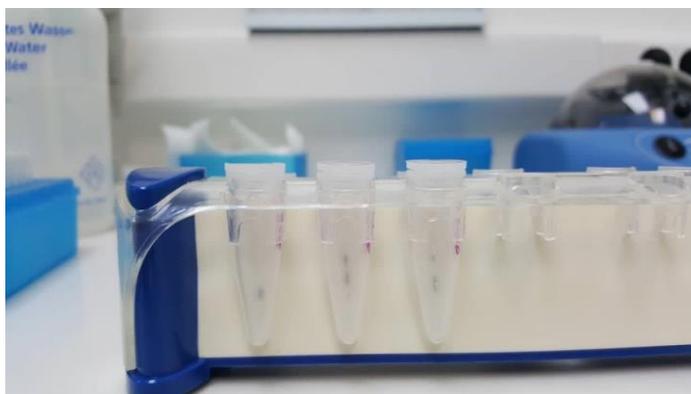
Slika 5. Tubica uzorka nakon dodanog PrepFiler Magnetic Particles reagensa i miješanja na uređaju vorteks.

Pri sljedećem koraku u svaku je tubicu otpipetirano 300 ul izopropanola (99,5 %), tubice su zatvorene i vorteksirane pri niskoj brzini. Pripremljeni su uzorci tijekom sljedećih deset minuta miješani na sobnoj temperaturi u termalnoj miješalici pri brzini od 700 rpm. Nakon inkubacije, uzorci su vorteksirani 10 s na maksimalnoj brzini. Tubice s uzorcima zatim su postavljene u magnetski stalak i inkubirane na sobnoj temperaturi 2 – 3 minute, sve do trenutka kad se magnetski pelet na stijenci tubice prestao povećavati (Slika 6.).



Slika 6. Tubice s uzorcima na magnetskom stalku. Na slici je vidljiv magnetski pelet na stijenkama tubica.

U sljedećem koraku tekuća faza u svakoj tubici pažljivo je aspirirana, bez dodirivanja magnetskog peleta, te je potom u tubice dodano 600 μ l A pufera za ispiranje. Nakon miješanja na vorteksu (15 s), tubice su ponovno postavljene u magnetski stalak. Nakon inkubacije tijekom jedne minute uslijedila je ponovna aspiracija tekuće faze. Postupak ispiranja ponovljen je u sljedećim dvama koracima, najprije primjenom A pufera u volumenu od 300 μ l, a zatim dodatkom B pufera u jednakom volumenu. Nakon ispiranja, tubice su ostavljene na magnetskom stalku s otvorenim poklopcem tijekom 7 – 10 minuta radi sušenja (Slika 7.)



Slika 7. Tubice s uzorkom na magnetskom stalku, ostavljene bez poklopca da se suše na zraku.

Tubice su uklonjene s magnetskog stalka te je svakom uzorku dodano 50 μ l PrepFiler Elution pufera. Vidljivi je magnetski pelet resuspendiran vorteksiranjem 5 s pri maksimalnoj brzini. Nakon deset minuta inkubacije na 70 °C pri brzini od 900 rpm, uzorci su vorteksirani 2 s pri maksimalnoj brzini te ponovno postavljeni u magnetski stalak. Vezanjem magnetskih kuglica za stijenke tubica u tekućoj fazi ostaje slobodna DNA koja je u sljedećem koraku prenesena u nove 1,5 ml PCR tubice, bez dodirivanja magnetskog peleta na stijenci. Svaki je uzorak označen jedinstvenom identifikacijskom oznakom i pohranjen na – 20 °C.

3.2.5. Mjerenje koncentracije DNA pomoću komercijalnog kompleta „Qubit High Sensitivity DNA“

Mjerenje koncentracije DNA na Qubit fluorometru provedeno je Qubit HS DNA komercijalnim kompletom prema uputama proizvođača:

Pripremljena je Qubit radna otopina za trideset uzoraka DNA i dva standarda miješanjem 6,368 ml Qubit dsDNA HS pufera i 32 μ l Qubit dsDNA HS reagensa, u omjeru 1:200. Nakon toga, Standard 1 pripremljen je miješanjem 190 μ l Qubit radne otopine i 10 μ l reagensa Qubit dsDNA HS Standard 1. Standard 2 pripremljen je miješanjem 190 μ l Qubit radne otopine i 10 μ l reagensa Qubit dsDNA HS Standard 2. U sljedećem koraku u svaku tubicu otpipetirano je 5 μ l DNA izolata i 195 μ l Qubit radne otopine. Pripremljeni su uzorci vorteksirani 2 – 3 sekunde, a potom inkubirani dvije minute na sobnoj temperaturi. Nakon toga, na uređaju QUBIT redom su izmjerene vrijednosti fluorescencije uzoraka poznate DNA koncentracije, tj. standarda 1 i 2, a zatim su temeljem dobivenih standardnih krivulja utvrđene vrijednosti koncentracije DNA u ispitivanim uzorcima DNA izolata.

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

Komercijalni komplet QuantiFiler Human Quantification DNA dizajniran je za umnažanje i kvantifikaciju ljudske DNA. Kit sadrži 2 kompleta početnica i TaqMan proba (QuantiFiler Human Primer Mix) koje služe za istovremenu amplifikaciju humanih i umjetno proizvedenih oligonukleotidnih sekvenci (IPC, od eng. Internal PCR control), a u svrhu kontrole prisutnosti PCR inhibitora (14). U PCR reakciji, bez primjesa PCR inhibitora, očekuje se pojava 2 PCR produkta koje specifično vežu dvije različite TaqMan probe pa je umnažanje humanih i umjetno proizvedenih genskih odsječaka tijekom PCR reakcije moguće pratiti u stvarnom vremenu. Komercijalni kompleti, poput QuantiFiler Human DNA Quantification seta, često se primjenjuju u svrhu kvantifikacije DNA materijala iz koštanog tkiva. Mjerenje koncentracije DNA QuantiFiler Human DNA Quantification kompletom provedeno je prema uputama proizvođača.

Postupak: Prvo su pripremljeni Standard 1 (50 ng/ul) i Standard 2 (16,7 ng/ul) koji se dobiva trostrukim razrjeđenjem Standarda 1. Zatim je napravljena PCR smjesa za 72 jažice na mikrotitarskoj ploči, miješanjem 0,756 mL QuantiFiler Human Primer Mix-a i 0,9 mL QuantiFiler PCR Reaction Mix-a. U sljedećem koraku u svaku je jažicu mikrotitarske ploče

pipetirano 23 µl pripremljene PCR smjese, a potom je dodano 2 µl standarda ili DNA uzorka sukladno shemi koja je prikazana u Tablici 1. Amplifikacija ciljnih genskih odsječaka provedena je tijekom ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja PCR smjese prema unaprijed zadanom temperaturnom protokolu (Tablica 2.).

Tablica 1. Shema pipetiranja standarda i uzoraka na mikrotitarskoj ploči Quantifiler Human DNA Quantification kompleta

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	ZRKQ.1	ZRKQ.2	ZRKQ.3	ZRKQ.4	ZRKQ.5	ZRKQ.6	ZRKQ.7	ZRKQ.8	ZRKQ.9	ZRKQ.10
B	Std2	Std2	ZRKQ.1	ZRKQ.2	ZRKQ.3	ZRKQ.4	ZRKQ.5	ZRKQ.6	ZRKQ.7	ZRKQ.8	ZRKQ.9	ZRKQ.10
C	Std1	Std1	ZRKP.1	ZRKP.2	ZRKP.3	ZRKP.4	ZRKP.5	ZRKP.6	ZRKP.7	ZRKP.8	ZRKP.9	ZRKP.10
D	Std2	Std2	ZRKP.1	ZRKP.2	ZRKP.3	ZRKP.4	ZRKP.5	ZRKP.6	ZRKP.7	ZRKP.8	ZRKP.9	ZRKP.10
E	Std1	Std1	ZRKO.1	ZRKO.2	ZRKO.3	ZRKO.4	ZRKO.5	ZRKO.6	ZRKO.7	ZRKO.8	ZRKO.9	ZRKO.10
F	Std2	Std2	ZRKO.1	ZRKO.2	ZRKO.3	ZRKO.4	ZRKO.5	ZRKO.6	ZRKO.7	ZRKO.8	ZRKO.9	ZRKO.10
G												
H												

Std1 – Standard 1, Std2 – Standard 2, ZRKQ – Završni rad kost QIAamp,

ZRKP – Završni rad kost Prepfiler, ZRKO – Završni rad kost Organska

Tablica 2. Temperaturni uvjeti real-time PCR reakcije u uređaju Quant Studio 5.

		Temperatura ^a	Vrijeme ^e
Hold		95 °C	10 min
PCR	Denature	95 °C	15 s
	Anneal/extend	60 °C	1 min
Hold		4 °C	∞

3.3. Statističke metode

Omjerne varijable prikazane su medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije procijenjena je Shapiro-Wilkovim, a homogenost varijanci Levenovim testom. Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama ispitana je neparametrijskim Kruskal-Wallisovim testom, s *post hoc* Bonferroni-Dunnovom poredbom. Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Podudarnost mjerenja ocijenjena je Linovim (20, 21) koeficijentom konkordancije korelacija s pripadnim 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (<https://www.niwa.co.nz/node/104318/concordance>).

Bland-Altmanovi grafovi rekonstruirani su u Microsoft Excel programu. Ako nije drugačije naznačeno, dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti, a testovi su provedeni u

NCSS2007 programu (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, SAD). Za grafički je prikaz upotrijebljen *ggpubr* paket za R program v3.4.1 (<http://www.R-project.org>).

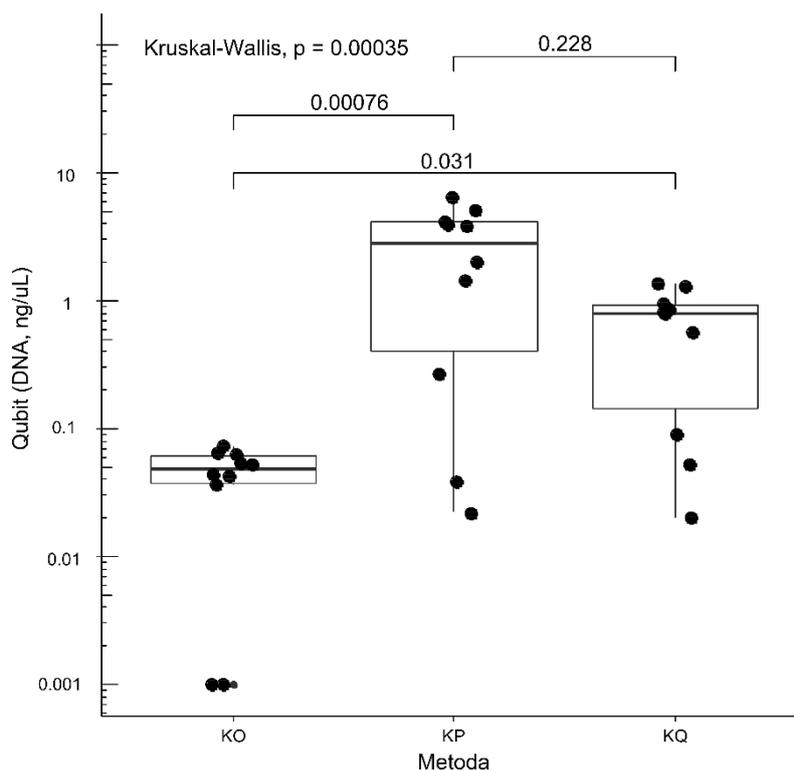
4. REZULTATI

Nakon izmjerene koncentracije DNA analiziran je prinos DNA iz koštanog praha na Qubit fluorometru i QuantStudio 5 PCR uređaju, ovisno o izboru metode za ekstrakciju DNA. Također je provedena analiza podudarnosti mjerenja koncentracije DNA na Qubit fluorometru i QuantStudio 5 PCR uređaju.

4.1. Analiza prinosa DNA iz koštanog praha na Qubit fluorometru ovisno o izboru metode za ekstrakciju DNA

Mjerenjem koncentracije DNA iz koštanog praha na Qubit fluorometru zabilježena je značajna razlika u prinosu DNA ovisno o izboru metode za izolaciju (Kruskal-Wallisov test; $P = 0,00035$).

Primjenom klasične organske metode za izolaciju DNA iz koštanog praha (KO) dobiven je najmanji prinos DNA [median; $M_e=0,048$ ng/ μ l (IQR (0,027-0,063))] u odnosu na količinu ostvarenu upotrebom PrepFiler BTA Forensic (KP) [$M_e=2,94$ ng/ μ l (IQR (0,21-4,41); $P = 0,00076$)] i QIAamp Blood Mini kompleta (KQ) [$M_e=0,8$ ng/ μ l (0,08-1,04); $P = 0,031$]. Najveći prinos DNA izmjeren Qubit fluorometrom zabilježen je u uzorcima koji su izolirani pomoću PrepFiler BTA kompleta, ali značajna razlika u odnosu na količine dobivene primjenom QIAamp Blood Mini nije zabilježena ($P = 0,228$) (Slika 8.).



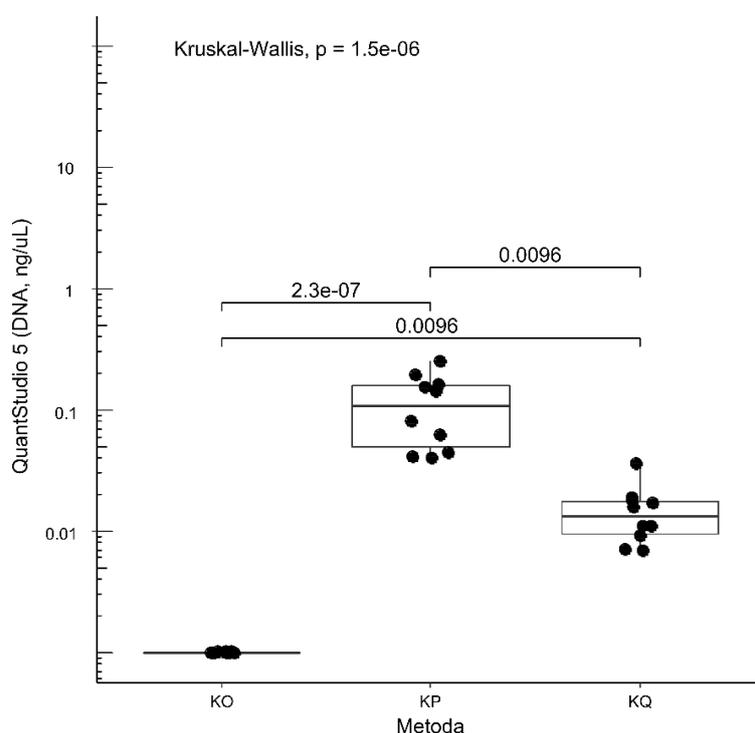
Slika 8. Prinos DNA materijala iz uzoraka koštanog praha nakon izolacije DNA klasičnom organskom metodom (KO), PrepFiler BTA Forensic DNA (KP) i QIAamp Blood Mini (KQ) kompleta. Koncentracija DNA određena je mjerenjem na Qubit fluorometru, a zabilježene vrijednosti prikazane su pravokutnim ili box-plot dijagramom. Gornje i donje vertikalne crte box-plot dijagrama predstavljaju granice 1,5 x interkvartilnog raspona. Prema Tukeyju, ekstremne vrijednosti označene su točkom, a prag je značajnosti definiran kao $P < 0,05$ (Kruskal-Wallisov test s *post hoc* Bonferroni-Dunnovom poredbom). Ordinata je log-os.

4.2. Analiza prinosa DNA iz koštanog praha na QuantStudio 5 PCR uređaju ovisno o izboru metode za ekstrakciju DNA

Mjerenjem koncentracije DNA iz koštanog praha na real-time PCR uređaju QuantStudio 5 zabilježena je statistički značajna razlika u količini DNA izolata dobivenog primjenom triju različitih metoda za ekstrakciju DNA (Kruskal-Wallisov test; $P = 0,0000015$).

Primjenom QuantiFiler Human Quantification DNA kompleta na real-time PCR uređaju u uzorcima DNA koji su izolirani klasičnom organskom metodom (KO) nije zabilježena amplifikacija humanih ciljnih sekvenci. Istovremeno, u istim uzorcima i uvjetima PCR reakcije umnažanje IPC kontrole uspješno je provedeno, stoga je negativan učinak endogenih PCR inhibitora isključen kao mogući uzrok izostanka amplifikacije humanog DNA materijala.

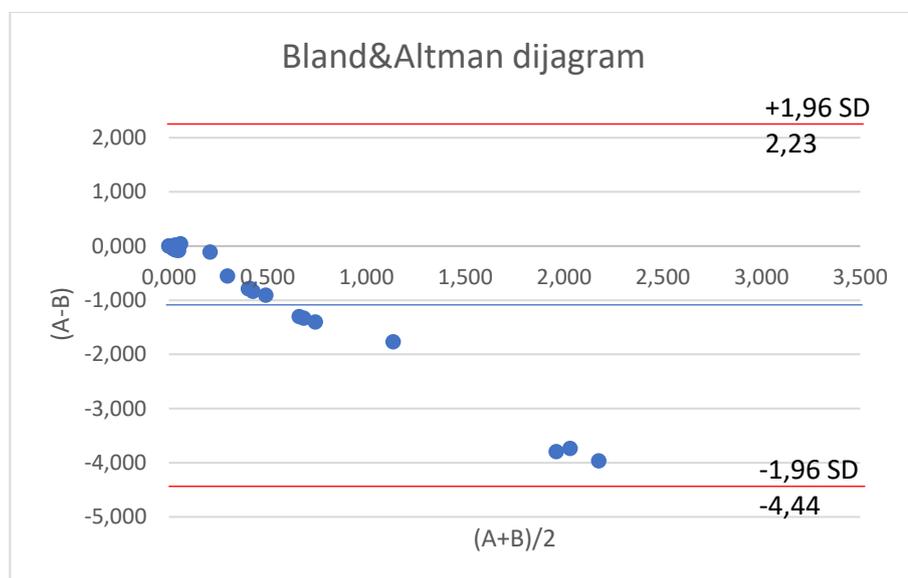
Jednako tako, u uzorcima DNA koji su izolirani primjenom PrepFiler BTA (KP) i QIAamp Blood Mini kompleta (KQ), prisutnost endogenih PCR inhibitora nije zabilježena. Najveći prinos DNA zabilježen je u uzorcima koji su ekstrahirani primjenom KP metode [$M_e = 0,11 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (IQR (0,044 - 0,17))], ne samo u odnosu na količine dobivene KO metodom [$P=0,00000023$], već i u odnosu na prinose ostvarene primjenom KQ metode [KP vs KQ; $0,11 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (0,044 - 0,17) vs $0,014 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (0,009 - 0,018); $P = 0,0096$] (Slika 9.). Jednako kao i rezultati zabilježeni na Qubit fluorometru, mjerenja ostvarena na QuantStudio 5 uređaju potvrđuju najveću učinkovitost KP metode u izolaciji DNA iz koštanog praha.



Slika 9. Prinos DNA materijala iz uzoraka koštanog praha nakon izolacije DNA klasičnom organskom metodom (KO), PrepFiler BTA Forensic DNA (KP) i QIAamp Blood Mini (KQ) kompleta. Koncentracija DNA određena je mjerenjem na qPCR uređaju Quant Studio 5, a zabilježene vrijednosti prikazane su pravokutnim ili box-plot dijagramom. Gornje i donje vertikalne crte box-plot dijagrama predstavljaju granice 1,5 x interkvartilnog raspona. Prema Tukeyju, ekstremne vrijednosti označene su točkom, a prag je značajnosti definiran kao $P < 0,05$ (Kruskal-Wallisov test s *post hoc* Bonferroni-Dunnovom poredbom). Ordinata je log-os.

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

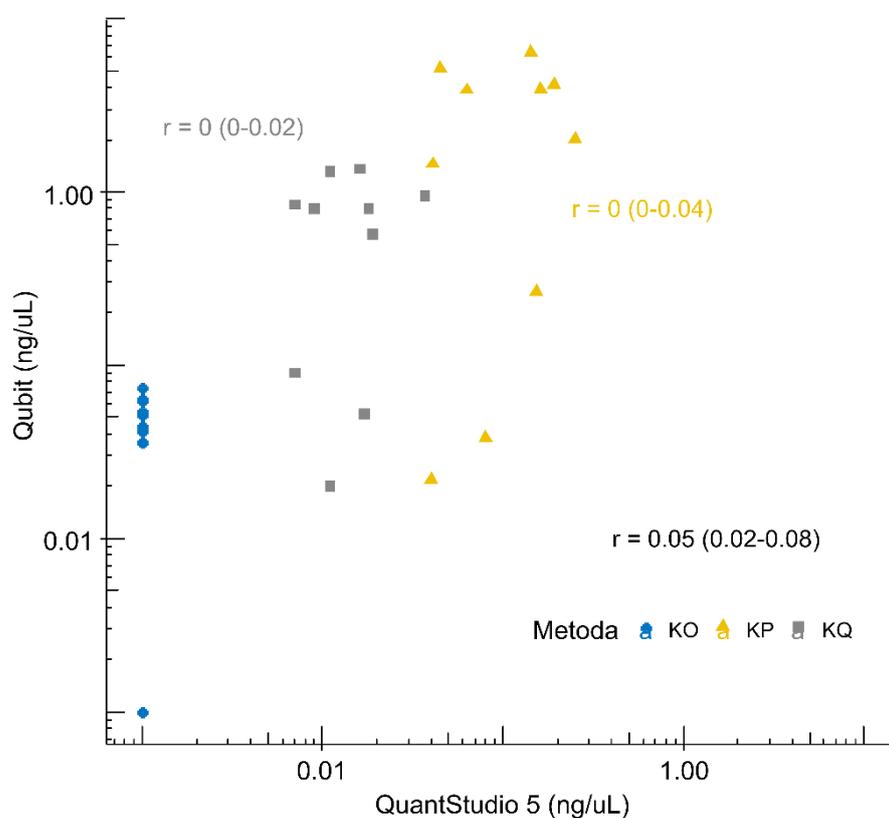
Bland&Altman test služi za procjenu podudarnosti između dvaju mjerenja dobivenih primjenom različitih kvantitativnih metoda. U svrhu kvantifikacije podudarnosti određuje se interval sporazumijevanja koji se izračunava pomoću srednje vrijednosti i standardne devijacije razlika između dvaju mjerenja. Razlika izmjerenih vrijednosti (A-B) i aritmetička sredina uparenih mjerenja ($\text{Mean } (A+B)/2$) služe za izradu Bland-Altmanova dijagrama (Slika 10.). Analizom zabilježenih vrijednosti koncentracije DNA izmjerenih na uređaju Qubit i Quant Studio 5 utvrđena je srednja vrijednost razlike mjerenja koja iznosi -1,104 jedinica. Taj rezultat znači da Qubit u prosjeku mjeri 1,104 jedinica više u odnosu na qPCR. Rezultati na grafu, međutim, pokazuju izrazito heterogena odstupanja duž intervala podudarnosti, definiranog kao $\pm 1,96 \times \text{SD}$ razlike dvaju mjerenja, da Bland-Altman test gubi svaki smisao (Slika 10.). To je uvelike posljedica izostanka qPCR mjerenja koncentracije DNA u uzorcima koji su izolirani klasičnom organskom metodom, a koji uzrokuju pojavu velike razlike između mjerenja ostvarenih na uređaju Qubit i Quant Studio 5.



Slika 10. Bland-Altmanov graf raspršenja gdje svaka točka predstavlja odnos srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) razlika između dvaju mjerenja. Srednja vrijednost razlike mjerenja od -1,104 označena je horizontalnom osi. Granice intervala sporazumijevanja dviju metoda definirane su rasponom od $\pm 1,96 \times \text{SD}$ razlike mjerenja.

Linov je koeficijent konkordancije test kojim se mjeri podudarnost mjerenja zabilježenih primjenom nove metode i referentne metode. Stupanj korelacije između dvaju mjerenja opisuje vrijednost Linova koeficijenta koji se može kretati od -1 do 1. Očekivana vrijednost Linova koeficijenta konkordancije savršeno podudarnih mjerenja približava se 1.

Linov koeficijent konkordancije upotrijebljen je za prikaz podudarnosti mjerenja DNA koncentracije zabilježenih pomoću Qubit fluorometra i qPCR uređaja. Graf Linova koeficijenta konkordancije (Slika 11.) pokazuje raspršene, izrazito male vrijednosti rezultata. To je dokaz jako malog stupnja korelacije i podudarnosti [$r = 0,05$ (0,02 – 0,08)] između mjerenja ostvarenih pomoću Qubit fluorometra i Quant Studio 5 qPCR uređaja.



Slika 11. Analiza podudarnosti izmjerenih vrijednosti koncentracije DNA uzoraka izoliranih klasičnom organskom metodom (KO), PrepFiler BTA Forensic (KP) i QIAamp Blood Mini (KQ) kompletom na uređaju Qubit i Quant Studio 5. Linov koeficijent konkordancije – r .

5. RASPRAVA

Izolacija DNA iz kostiju delikatan je postupak koji zahtijeva primjenu visoko učinkovitih ekstrakcijskih metoda koje omogućuju izolaciju DNA materijala s malim udjelom nečistoća koje mogu inhibirati nizvodne analitičke procese. Svrha je ovog istraživanja bila procijeniti učinkovitost klasične fenol/kloroform metode, QIAamp Blood Mini i PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction kompleta mjerenjem koncentracije DNA na qPCR uređaju i Qubit fluorometru. Najveći prinos DNA materijala, potvrđen mjerenjem na obama analitičkim uređajima, zabilježen je u uzorcima koji su dobiveni primjenom PrepFiler BTA komercijalnog kompleta. Učinkovitost PrepFiler BTA komercijalnog kompleta nedavno je uspoređena s novim, alternativnim pristupom koji kombinacijom postupka dekalifikacije i DNA-vezujućih magnetskih kuglica pospješuje posljedičnu amplifikaciju kratkih nukleotidnih ponavljanja (STR, od engl. Short Tandem Repeats) te time olakšava identifikaciju posmrtnih ostataka. Međutim, značajna razlika u prinosu DNA materijala usporedbom uzoraka koji su izolirani novom, alternativnom metodom i PrepFiler BTA komercijalnim kompletom nije uočena (22). Nastavak istraživanja u vidu analize STR fragmenata u uzorcima izolata koji su dobiveni ovim istraživanjem mogao bi ponuditi dodatne spoznaje o prednostima i ograničenjima ispitivanih ekstrakcijskih metoda.

U ovom je istraživanju upotrijebljena jednaka količina početnog materijala (0,1 g koštanog praha) svakog uzorka, ali je količina dobivenog DNA materijala značajno varirala ovisno o izboru ekstrakcijske metode. Najmanje, qPCR metodom čak nemjerljive količine DNA, dobivene su primjenom klasične organske metode koja osigurava izdvajanje genetičkog materijala u otopini fenola, kloroforma i izoamilnog alkohola. Suprotno tomu, Jakubowska J. i sur. primjenom klasične organske metode ostvarili su prinos od 2803 ng iz 0,5 g koštanog praha što je pet puta više od početne količine koštanog praha koja je upotrijebljena u ovom istraživanju (23). Ipak, klasična fenol/kloroform metoda sve se više nadomješta primjenom novih, bržih, po zdravlje manje štetnih metodoloških rješenja. Primjerice, upotrebom Biorobot EZ1 uređaja za strojnu izolaciju DNA iz 0,5 g koštanog praha posmrtnih ostataka iz Drugoga svjetskoga rata Zupanič Pajnič i sur. bilježe širok raspon DNA prinosa, od nemjerljivih koncentracija sve do maksimalnog prinosa od 2,5 ng DNA/g koštanog praha (24).

Nadalje, u odnosu na klasičnu organsku metodu, Marshall i sur. opisali su bolju učinkovitost Hi-Flow filter kolonice koje omogućavaju procesiranje veće količine koštanog praha po uzorku. Hi-Flow metodom moguće je izolirati podjednake ili veće količine DNA

materijala bez primjesa toksičnih organskih otapala (25). Prednosti metoda utemeljenih na silika kolonama uočili su i Davoren i sur. usporedbom prosječnog prinosa Qiagen Blood Maxi komercijalnog kompleta veličine 1,94 ng DNA/g koštanog praha, s prosječnom količinom DNA od 0,68 ng/g koja je dobivena primjenom fenol/kloroform metode (26). Prednosti Qiagen silika kolonica u odnosu na klasičnu organsku metodu zabilježene su i ovom studijom (Slika 8. i Slika 9).

Demineralizacija koštanog praha značajno povećava količinu i kvalitetu DNA dobivene izolacijom iz uzoraka kosti (22,27,28,29). Postupak je demineralizacije dugotrajan pa se i dalje traga za alternativnim, vremenski manje zahtjevnim rješenjima za izolaciju DNA iz kosti. Harrel i sur. analizirali su učinkovitost TBone Ex pufera namijenjenog za digestiju komadića kosti te su usporedili prinos DNA koji je moguće dobiti TBone digestijom komadića kosti s količinom DNA iz demineraliziranog koštanog praha. Iako je veći prinos DNA ostvaren demineralizacijom koštanog praha, analiza STR genetičkog profila bila je podjednako uspješna iz obiju vrsta uzoraka. Sukladno našim rezultatima, značajne razlike u količini DNA iz demineraliziranog koštanog praha primjenom PrepFiler BTA i MinElute PCR Purification kompleta na bazi silika kolona nisu zabilježene (30).

Analizom podudarnosti mjerenja DNA koncentracije na uređaju Qubit i Quant Studio 5 zabilježena su značajna neslaganja. Izostanak je očekivane korelacije moguća posljedica povećane osjetljivosti PCR reakcije na prisutnost endogenih PCR inhibitora ili fragmentiranih DNA odsječaka. Ipak, u svim ispitivanim uzorcima zabilježene su podjednake Ct vrijednosti IPC kontrole pa se općenito može zaključiti da izostanak DNA kvantifikacije u pojedinim uzorcima nije rezultat inhibicije PCR reakcije, već je jednostavno posljedica premale količine odgovarajućeg DNA kalupa.

Donja granica detekcije Qubit fluorometra iznosi 0,01 ng/μl, a koeficijent varijacije ponovljenih mjerenja značajno raste smanjenjem količine DNA u uzorku. Niske vrijednosti koncentracije DNA koje su Qubit fluorometrom zabilježene u uzorcima izoliranim klasičnom organskom metodom približavaju se granici detekcije pri kojoj su moguća veća odstupanja od stvarne koncentracije. Suprotno, u odnosu na Qubit fluorometar, qPCR metoda mnogo je osjetljivija na prisutnost pocijepanih DNA odsječaka koji mogu imati negativne učinke na učinkovitost i uspješnost amplifikacije ciljnih sekvenci. Primjena agarozne gel elektroforeze trebala bi dati bolji uvid u stupanj degradacije ispitivanih DNA izolata.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju prednost novih komercijalnih pristupa u izolaciji DNA iz kosti. U usporedbi s klasičnom organskom metodom, silika kolone, i selektivne magnetske čestice osiguravaju veću količinu i kvalitetu DNA materijala iz uzoraka

kosti. U kombinaciji s afinitetnim metodama utemeljenim na silika kolonama, korak dekalifikacije ključan je za povećanje DNA prinosa, ali može se izostaviti prilikom primjene PrepFiler BTA komercijalnog kompleta.

6. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje i dobiveni rezultati doveli su do sljedećih zaključaka:

- U odnosu na klasičnu organsku metodu i QIAamp Blood Mini Kit, najveći prinos DNA materijala iz 0,1 g koštanog praha postiže se primjenom PrepFiler BTA komercijalnog kompleta.
- Klasična organska metoda nije prihvatljiva tehnika za izolaciju optimalnih količina DNA iz male količine koštanog praha ($\leq 0,1$ g).
- Tijekom izolacije DNA iz koštanog praha, PrepFiler BTA i QIAamp Blood Mini DNA komercijalni kompleti jednako učinkovito pročišćavaju DNA i uklanjaju PCR inhibitore.
- Vrijednosti DNA koncentracije izmjerene na Qubit fluorometru i Quant Studio 5 qPCR uređaju pokazuju nizak stupanj podudarnosti.

7. SAŽETAK

UVOD: DNA u kosti nalazimo unutar stanica osteoblasta, osteocita i osteoklasta. Tijekom resorpcije kosti i stanične apoptoze, DNA dospijeva u izvanstanični matriks i veže molekule kolagena i hidroksiapatita. Za uspješnu izolaciju DNA iz kosti potrebno je primijeniti metode i reagense koji će osigurati specifično izdvajanje malih količina DNA materijala iz smjese drugih bioloških molekula, ostataka soli i organskih otapala. U tu svrhu ispitivana je učinkovitost klasične organske metode te QIAamp DNA Blood Mini i PrepFiler BTA Forensic Extraction komercijalnih kompleta.

CILJ: Odrediti djelotvornost ispitivanih metoda za izolaciju DNA iz koštanog praha mjerenjem količine i kvalitete DNA na Qubit fluorometru i qPCR uređaju.

MATERIJAL I METODE: Za istraživanje su upotrijebljeni poolirani uzorci koštanog praha. Izolacija DNA provedena je primjenom klasične organske fenol/kloroform metode te QIAamp DNA Blood Mini i PrepFiler Forensic DNA Extraction komercijalnih kompleta. Koncentracija DNA izmjerena je na Qubit fluorometru i qPCR uređaju pomoću Qubit High Sensitivity DNA i QuantiFiler Human Quantification DNA setova.

REZULTATI: Najveći prinos DNA primijećen je u uzorcima izoliranim PrepFiler BTA komercijalnim kompletom. Slijedi ga QIAamp DNA Blood Mini komplet s nešto manjim koncentracijama DNA, a najmanje koncentracije DNA dobivene su klasičnom organskom metodom. Graf Linova koeficijenta konkordancije pokazuje jako mali stupanj korelacije i podudarnosti između mjerenja na Qubit fluorometru i Quant Studio 5 qPCR uređaju.

ZAKLJUČAK: U usporedbi s klasičnom organskom metodom, silika kolone i selektivne magnetske čestice osiguravaju veću količinu i kvalitetu DNA materijala iz uzoraka kosti.

KLJUČNE RIJEČI: lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu; kost i kosti; DNA

8. SUMMARY

Efficiency evaluation of the classic organic and new commercial approach in DNA extraction from bone samples using Qubit fluorometer and qPCR

INTRODUCTION: DNA in the bone is found in osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. During bone resorption and cell apoptosis, DNA ends up in the extracellular matrix and binds to the molecules of collagen and hidroxyapatite. For a successful isolation of DNA from the bones, highly efficient methods and reagents should be employed to ensure the specific extraction of small amounts of DNA material, free from other biological molecules, residues of salts and organic solvents. For this purpose, we investigated the efficiency of the classic organic method, QIAamp DNA Blood Mini kit and PrepFiler BTA Forensic Extraction kit.

GOAL: To determine the efficiency of the investigated methods for DNA isolation from bone powder, by measuring the amount and quality of DNA on the Qubit fluorometer and qPCR.

MATERIALS AND METHODS: Pooled samples of bone powder were used for this study. DNA isolation was done using classical organic phenol / chloroform method, QIAamp DNA Blood Mini and PrepFiler Forensic DNA Extraction commercial sets. The concentration of DNA was measured on Qubit fluorometer and qPCR using Qubit High Sensitivity DNA and QuantiFiler Human Quantification DNA Kit.

RESULTS: The highest DNA yield was found in samples isolated with PrepFiler BTA commercial kit. The QIAamp DNA Blood Mini Kit follows with slightly lower DNA concentrations, and the lowest DNA concentrations were obtained by classical organic method. Graph of Lin's concordance coefficient shows a very small correlation and correlation between Qubit fluorometer and Quant Studio 5 qPCR.

CONCLUSION: Compared to the classical organic method, silica columns and selective magnetic particles provide greater quantity and quality of DNA material from bone samples.

KEYWORDS: real-time polymerase chain reaction; bone and bones; DNA

9. LITERATURA

1. Hagelberg E. Analysis of DNA from bones: Benefits versus losses. U: Fossheim H, urednik. *More Than Just Bones: Ethical Reflections on Research Involving Human Remains*. Oslo: Rolf Ottesen As; 2012. str. 95-112.
2. Paripović E. *Biomehanika u ortopediji [diplomski rad]*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu; 2015. 33 str.
3. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije*. 10. izdanje. Zagreb: Školska knjiga 2005.
4. Đudarić L, Zoričić Cvek S, Cvijanović O, Fužinac-Smojver A, Čelić T, Martinović D. *Osnove biologije koštanog tkiva*. *Medicina Fluminensis [Internet]*. 03.03.2014. [pristupljeno 03.09.2018.];50(1):21-38. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/118495>.
5. Vrkić N, Rod E, Krpan D, Hudetz D, Primorac D. *Koštane bolesti*. U: Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović, urednici. *Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 205-225.
6. *Encyclopaedia Britannica*. Bone morphology. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/bone-anatomy/Bone-morphology#ref470918>. Datum pristupa:20.09.2018.
7. Murray RK, Beder DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28. izd. Zagreb: Medicinska Naklada; 2011.
8. Brundin M, Figdor D, Sundqvist G, Sjögren U. DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *J Endod*. 2013;39(2):211-6
9. Sosa C, Vispe E, Núñez C, Baeta M, Casalod Y, Bolea M, i sur. Association Between Ancient Bone Preservation and DNA Yield: A Multidisciplinary Approach. *Am J Phys Anthropol*. 2013;151(1):102-9.
10. Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MT. DNA in ancient bone – where is it located and how should we extract it?. *Ann Anat*. 2012;194(1):7-16.
11. Thermo Fisher Scientific. *PrepFiler and PrepFiler BTA forensic DNA extraction kits user guide*. Waltham, MA: ThermoFisher Scientific 2012.
12. Harrel M, Mayes C, Gangitano D, Hughes-Stamm S. Evaluation Of A Powder-Free DNA Extraction Method For Skeletal Remains. *J Forensic Sci*. 2018.

13. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150528.
14. Applied Biosystems. Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits user guide. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation 2014.
15. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. 1. izd. Gaithersburg: Academic Press; 2011. str 49-67.
16. Timken MD, Swango KL, Orrego C, Chong MD, Buoncristiani MR. Quantitation of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR (quantitative PCR): Singleplex and Multiple Modes for Nuclear and Mitochondrial Genomes, and the Y Chromosome [Internet]. Rockville: NCJRS Photocopy Services; 2005 [citirano 03.09.2018.]. Dostupno na: <https://www.ncjrs.gov/App/Publications/abstract.aspx?ID=210302>.
17. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(3):297-305.
18. Cattaneo C, i sur. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons. 2006. pp. 1-19. doi: 10.1002/9780470027318.a1104m.
19. Putkonen MT, Palo JU, Cano JM, Hedman M, Sajantila A. Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples. *Investig Genet*. 2010;1:9.
20. Lin LI-K. (1989). A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* 45: 255–268.
21. Lin LI-K. (2000). A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics* 56: 324–325.
22. Liu Q, Liu L, Zhang M, Zhang Q, Wang Q, Ding X, i sur. A Simple and Efficient Method of Extracting DNA from Aged Bones and Teeth. *J Forensic Sci*. 2018;63(3):824-828.
23. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med*. 2012;126(1):173–178.
24. Pajnič IZ, Zupanc T, Balažić J, Geršak ŽM, Stojković O, Skadrić I, i sur. Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;27:17-26.

25. Marshall PL, Stoljarova M, Schmedes SE, King JL, Budowle B. High volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;12:155-60.
26. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J.* 2007;48:478–485.
27. Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):191-5.
28. Amory S, Huel R, Bilić A, Loreille O, Parsons TJ. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(3):398-406.
29. Pajnič IZ. Extraction of DNA from Human Skeletal Material. *Methods Mol Biol.* 2016;1420:89-108.
30. Harrel M, Mayes C, Gangitano D, Hughes-Stamm S. Evaluation Of A Powder-Free DNA Extraction Method For Skeletal Remains. *J Forensic Sci.* 2018. doi: 10.1111/1556-4029.13749.