

UNIwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Farmaceutyczny
Oddział Medycyny Laboratoryjnej

STUDIA JEDNOLITE MAGISTERSKIE
KIERUNEK: Analityka medyczna

Katarzyna Szymańska

Nr albumu: 100673

**Walidacja zestawu Quant-iT HS i fluorometru Qubit do
detekcji dwuniciowego DNA w aspekcie genetyczno-
sądowym**

**Validation of Quant-iT HS and Qubit Fluorometer set to
detection of dsDNA in forensic genetics practice**

Praca magisterska
napisana pod kierunkiem
dr hab. n. med. Renaty Jacewicz
Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej

Łódź 2015

Serdecznie dziękuję

Dr hab. med. Renacie Jacewicz

oraz

Dr n. med. Maciejowi Jędrzejczykowi

za poświęcony czas i okazaną pomoc przy pisaniu pracy.

Spis treści

1. Wstęp	5
1.1. Spektrum badań oraz źródła materiałów w genetyce sądowej	5
1.2. Narzędzia i metody badań genetyczno-sądowych	6
1.3. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną	10
1.4. Walidacja metod analitycznych	16
2. Cel pracy	18
3. Materiał i metodyka badań	19
3.1. Materiał	19
3.2. Metodyka badań	19
3.2.1. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną	19
3.2.2. Ocena powtarzalności pomiarów	21
3.2.3. Ocena odtwarzalności pomiarów	22
3.2.4. Zestawienie uzyskanych wyników pomiarów prób kontrolnych z wartościami ich stężeń podanymi przez producenta	23
3.2.5. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą Real Time PCR	23
3.2.6. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej	25
4. Wyniki	27
4.1. Pomiar stężenia DNA do oceny powtarzalności i odtwarzalności metody fluorymetrycznej	27
4.2. Zestawienie uzyskanych wyników pomiarów prób kontrolnych z wartościami ich stężeń podanymi przez producenta	31

4.3. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą Real Time PCR	34
4.4. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej	38
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	41
6. Wnioski.....	45
7. Streszczenie	46
8. Piśmiennictwo.....	47
9. Spis tabel i rycin	49

1. Wstęp

Po zakończonej izolacji kwasów nukleinowych jednym z pierwszych, kluczowych etapów, jaki wykonuje się przed przystąpieniem do ich dalszej analizy jest pomiar stężenia wyizolowanego materiału genetycznego. Stanowi on punkt wyjścia do prawidłowej amplifikacji DNA, jego rozdziału oraz poprawnej interpretacji otrzymanych wyników. Zbyt mała ilość DNA prowadzi do wystąpienia zjawisk niepożądanych w reakcji PCR takich jak wypadanie (ang. drop-out) alleli czy detekcja przypadkowych alleli, co skutkuje powstawaniem niekompletnych lub trudnych w interpretacji profili genetycznych. W przypadku użycia nadmiaru DNA obserwuje się zjawisko częściowej adenylacji, wzrost udziału pików typu stutter, a nawet brak możliwości odczytu badanej sekwencji DNA.

Głównym problemem w badaniach z zakresu genetyki sądowej jest mała ilość materiału biologicznego lub jego degradacja, co skutkuje znikomą ilością matrycy DNA. Dlatego niezbędne jest stosowanie przez laboratoria bardzo czułych metod służących do pomiarów stężenia DNA przeprowadzonych w oparciu o minimalną ilość próby badanej. Metody te muszą być poddawane regularnym kontrolom i procesom walidacji w celu sprawdzenia ich pod względem sprawności i niezawodności działania. Sposobem na potwierdzenie dokładności i wiarygodności tych metod jest wymóg wdrożenia przez laboratoria genetyczno-sądowe systemu zarządzania jakością zgodnie z normą ISO/IEC 17025 [22,33].

1.1 Spektrum badań oraz źródła materiałów w genetyce sądowej

Na przełomie ostatnich lat, w wyniku postępu technicznego i powstawania coraz to nowszych i doskonalszych metod badawczych doszło do gwałtownego rozwoju nauki w zakresie genetyki medyczo-sądowej. Badania DNA są obecnie podstawowym, powszechnym narzędziem wykorzystywanym w szerokim spektrum spraw związanych z przestępczością, taką jak np. gwałt czy morderstwo [3].

Jako materiał dowodowy w wielu tych sprawach może posłużyć tzw. ślad biologiczny, czyli substancja organiczna pozostawiona przez sprawcę na miejscu zbrodni, w tym na ciele osób, pod paznokciami, na częściach garderoby, przedmiotach (niedopałkach papierosów, gumach do żucia) oraz narzędziach zbrodni [12,14]. Do śladów biologicznych poddawanych analizie genetycznej zalicza się między innymi ślady pochodzenia tkankowego, w tym krew (płynną, plamy), włosy, fragmenty tkanek, a także wydzieliny (nasienie, ślinę, pot), oraz wydaliny (mocz, kał). W przypadku silnego rozkładu ciała, gdy nie ma możliwości pozyskania od ofiary tkanek miękkich, jedynym źródłem DNA pozostają kości, w tym szczególnie zęby. Każdy z tych materiałów może być wykorzystany w celu ustalenia i odnalezienia w bazie danych charakterystycznego i niepowtarzalnego profilu genetycznego osoby, od której pochodzi zabezpieczony materiał [15].

Genetyka sądowa oprócz badań będących pomocnymi w walce z przestępczością zajmuje się również identyfikacją zwłok oraz szczątków ludzkich, w tym pochodzących z katastrof masowych, takich jak katastrofy lotnicze, katastrofy związane z atakami terrorystycznymi czy też spowodowane działaniem żywiołów (powódź, tsunami, trzęsienie ziemi). Zajmuje się także badaniami rodzinnymi, które wykorzystuje się między innymi w celu ustalenia tożsamości osoby zaginionej oraz w sprawach spadkowych. Jednakże do najczęściej przeprowadzanych analiz pokrewieństwa należy badanie ojcostwa, które można potwierdzić lub wykluczyć nawet w sytuacji, gdy domniemany ojciec nie żyje [2,10].

1.2 Narzędzia i metody badań genetyczno-sądowych

Współczesna genetyka sądowa ma do dyspozycji szeroki wachlarz możliwości, który wynika z dostępności coraz czulszych, efektywniejszych metod i technik badawczych. W niniejszej pracy omówiono te metody, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia badań.

Podstawową techniką w zakresie genetyki sądowej jest technika PCR (ang. polymerase chain reaction), czyli reakcja łańcuchowej polimerazy, opracowana w połowie lat 80-tych przez Kary'ego Mullisa [25], który dostał za to odkrycie Nagrodę Nobla w 1993 roku. Technika ta umożliwia powielenie dowolnego fragmentu DNA o długości od kilku do kilkuset tysięcy nukleotydów. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi matrycowy DNA, startery (primery), trifosforany deoksyrybonukleotydów oraz termostabilna polimeraza DNA. Klasyczna reakcja PCR polega na przeprowadzeniu wielokrotnie powtarzalnego cyklu trzech etapów zachodzących w różnych temperaturach. W pierwszym etapie, przeprowadzanym w temperaturze około 95°C, dochodzi do pęknięcia wiązań wodorowych występujących między zasadami azotowymi i rozdzielenia matrycy DNA na dwa łańcuchy. W temperaturze optymalnej dla działania starterów (50-60 °C) zachodzi drugi etap, który polega na ich przyłączeniu do matrycy DNA. Ostatni etap reakcji DNA to jego wydłużanie. Podwyższenie temperatury do około 72 °C pozwala na przyłączenie się do matrycy polimerazy DNA i syntezę nici komplementarnej do matrycy [29]. W celu skrócenia czasu reakcji stosuje się wersję PCR zredukowaną do dwóch etapów, gdzie przyłączanie starterów i wydłużanie matrycy przebiega jednocześnie.

Bogatym źródłem wysoce polimorficznych markerów, które mogą być wykrywane techniką PCR, są krótkie sekwencje o strukturze tandemowych powtórzeń, tzw. STR (ang. short tandem repeat). Wielkość cząsteczki tych markerów najczęściej wykorzystywanych w badaniach waha się w granicach 100-450 par zasad, a motyw repetytywny składający się od 2 do 6 nukleotydów powtarza się średnio kilka - kilkanaście razy w określonym miejscu genomu, w tzw. locus, dając wiele wariantów. Sekwencje te, zwane też mikrosatelitarnymi, są standardowo wykorzystywane w badaniach identyfikacyjnych, głównie ze względu na możliwość ich jednoczesnej analizy oraz na dużą zmienność w populacji, co umożliwia uzyskanie wysokiego stopnia polimorfizmu [6].

W przypadku silnej degradacji DNA detekcję jego polimorfizmu przeprowadza się za pomocą markerów, o mniejszych rozmiarach aplikonu. Są to markery typu mini-STR, dające produkty o wielkości cząsteczki w zakresie 100-200

par zasad oraz markery typu SNP (single nucleotide polymorphism) o zmienności w obrębie pojedynczych nukleotydów [27].

Minęła prawie dekada odkąd markery STR stanowią trzon systemu CODIS. Zostały one po raz pierwszy opisane jako skuteczne narzędzia do identyfikacji tożsamości ludzkiej na początku lat 90-tych przez Edwardsa i jego współpracowników [9]. Obecnie największą na świecie bazą profili w zakresie STR dysponuje brytyjska firma Forensic Science Service (ponad 5 milionów profili). Ze względu na swoje wykorzystanie w krajowych bazach danych DNA na całym świecie, markery STR odgrywają kluczową rolę w walce z przestępczością oraz w identyfikacji osób [5].

Obecnie podstawowym narzędziem genetyki sądowej w profilowaniu DNA jest multipleksowa reakcja PCR z wykorzystaniem systemu wielokolorowej detekcji fluorescencyjnej [4]. Multiplex PCR jest odmianą reakcji PCR polegającą na równoczesnej amplifikacji wielu loci mikrosatelitarnego DNA w tej samej mieszaninie reakcyjnej, przy czym startery dla loci o tym samym zakresie wielkości są znakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Dzięki temu metoda ta jest o wiele mniej czasochłonna, pozwala obniżyć koszty przeprowadzanych badań i zminimalizować ilość potrzebnej matrycy DNA, przy jednoczesnym uzyskaniu wysokiej wydajności oraz wysokiej wartości siły dyskryminacji [8,24].

Produkty reakcji multiplex PCR identyfikuje się na podstawie ich rozdziału elektroforetycznego przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej. Zazwyczaj przeprowadza się ją za pomocą służących do tego celu automatycznych sekwenatorów niewymagających przygotowywania żelu. Rozdział kwasów nukleinowych przeprowadzany jest w cienkiej kapilarze wypełnionej polimerem, w której migrują produkty reakcji PCR. Ich fluorescencja wzbudzana jest przez laser a następnie wychwytywana i mierzona jest przez specjalny system detekcji. Wyniki detekcji fluorescencyjnej otrzymujemy w postaci elektroforegramu, gdzie za pomocą względnego współczynnika fluorescencji (RFU) oceniamy otrzymany produkt.

Kolejną odmianą techniki PCR, którą wykorzystano do analizy materiału genetycznego w tej pracy badawczej, jest Real Time PCR. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym jest niezwykle przydatna w genetyce sądowej, gdy dysponuje się znikomą ilością matrycy DNA. Należy do bardzo czułych i specyficznych metod wykrywających stężenia DNA już na poziomie jednej haploidalnej komórki. Podczas pomiaru uwzględnia się zarówno ilość jak i jakość matrycowego DNA.

W przebiegu reakcji PCR możemy wyróżnić cztery fazy: wstępną, wykładniczą, logarytmiczną i plateau. Tradycyjny PCR pozwala na analizę produktu reakcji w fazie plateau, kiedy ilość produktu reakcji osiągnęła maksimum. Dzięki zastosowaniu wysoce czułych znaczników fluorescencyjnych, Real Time PCR umożliwia monitorowanie namnażania się DNA już w fazie wykładniczego wzrostu oraz przyrostu ilości produktu w czasie kolejnych cykli. Wyróżnia się znakowanie niespecyficzne z zastosowaniem barwników interkalujących podwójną nić DNA, jak np. barwnik SYBR Green oraz znakowanie specyficzne, które wykorzystuje sondy molekularne, jak np. sondy TaqMan.

Poziom fluorescencji zależy od stężenia amplikonu w próbce. W początkowych fazach jest on odczytywany jako tło, na którego poziomie DNA jest niewykrywalne. Cykl, w którym sygnał fluorescencji przekracza próg detekcji, a namnażający się produkt wchodzi w fazę wykładniczego wzrostu, świadczącego o obecności DNA w próbce, nazywamy cyklem progowym (ang. threshold cycle, Ct). Im wyższe stężenie wyjściowego DNA w próbce, tym przy niższych wartościach Ct poziom fluorescencji przekracza wartość progową [29,34].

W metodzie Real Time PCR do najczęściej stosowanych zestawów w genetyce sądowej zalicza się Quantifiler Duo DNA Quantification Kit, Quantifiler Trio DNA Quantification Kit oraz PowerQuant System. Wykrywalność tych metod producent szacuje na około 20 pg genomowego DNA, czyli około 3 komórek diploidalnych [23].

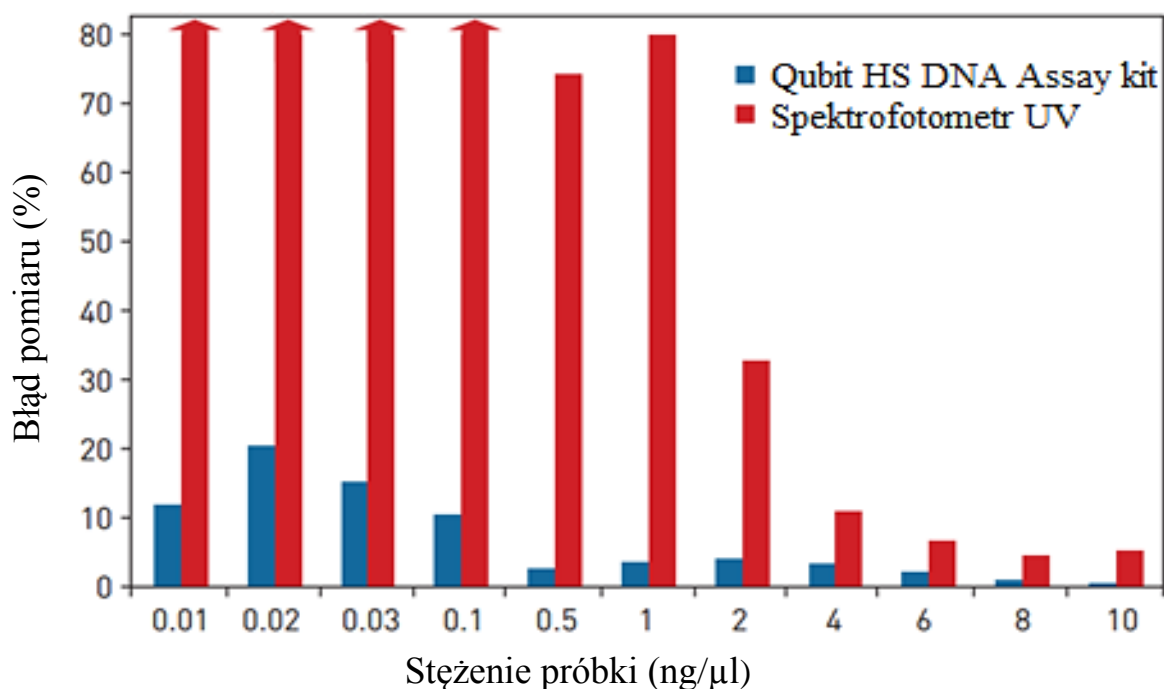
1.3. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną

Pomiar stężenia kwasów nukleinowych jest niezmiernie ważnym etapem w analizie DNA. Proces ten bowiem wpływa na prawidłowe wykonanie kolejnych etapów oznaczeń i na końcowy wynik badań. Reakcja multipleks PCR, która jest podstawowym etapem badań w zakresie genetyki sądowej, pracuje optymalnie w wąskim zakresie stężeń matrycowego DNA, co wymaga jego dokładnych oznaczeń.

Jedną z szybkich metod służących do określenia stężenia kwasów nukleinowych jest spektrofotometryczny pomiar absorbancji, wykonywany na przykład za pomocą systemu NanoDrop. Ilość światła pochłaniana przez próbkę jest wprost proporcjonalna do stężenia kwasu nukleinowego w tej próbce. DNA i RNA mają maksimum absorpcji przy 260 nm, natomiast większość białek absorbuje najsilniej przy 280 nm. Jednakże w przypadku złożonych mieszanin, metoda spektrofotometryczna ma wiele mankamentów w zastosowaniu genetyczno-sądowym. Gdy próbka zawiera zanieczyszczenia w postaci białek, może dochodzić do zawyżania wartości stężenia DNA. Ponadto, przy niskich stężeniach DNA czułość metody spektrofotometrycznej jest często niewystarczająca [32]. Problem ten można przezwyciężyć za pomocą alternatywnej metody, jaką jest użycie do ilościowej oceny kwasów nukleinowych fluorescencyjnych barwników, w oparciu o zastosowanie fluorymetru Qubit i zestawu dedykowanych do tego celu odczynników.

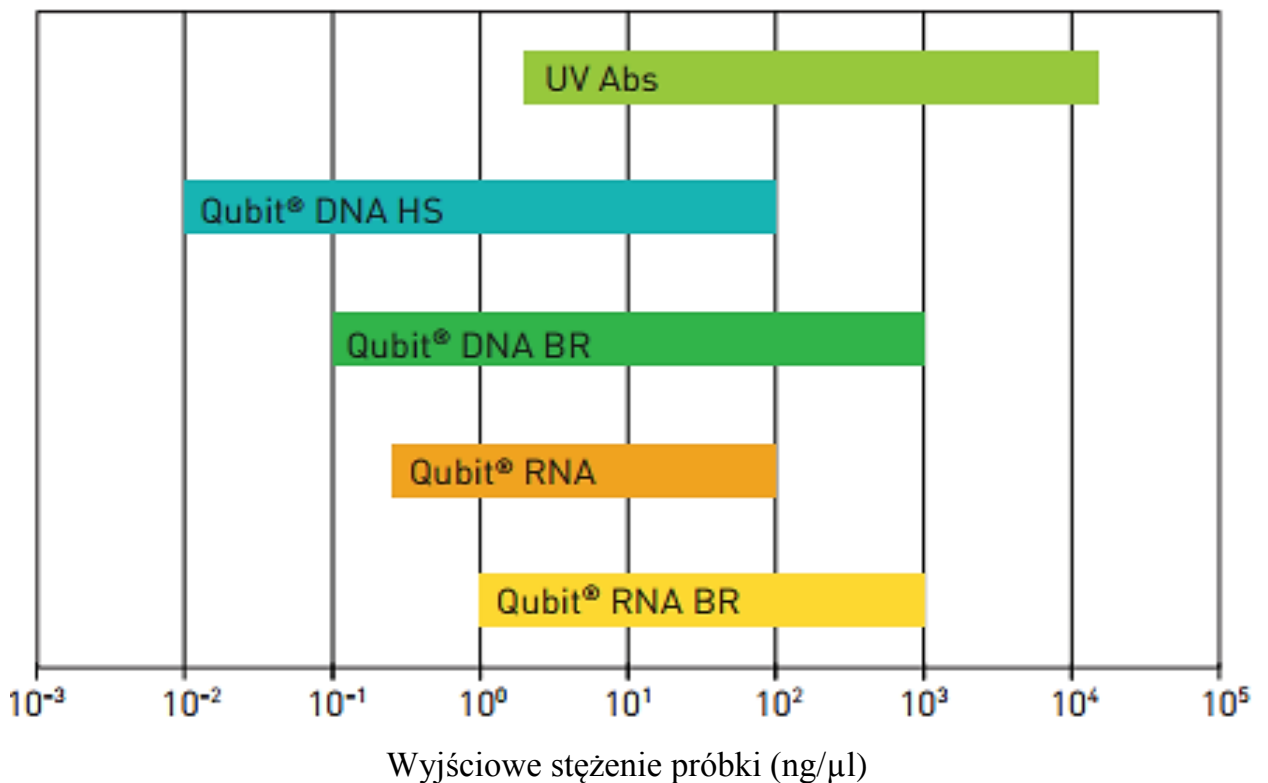
Fluorymetr Qubit zapewnia bardziej precyzyjne, czułe i selektywne pomiary stężenia wyizolowanego materiału niż absorpcja światła UV. Na podstawie analizy UV nie jesteśmy w stanie odróżnić wyników dla próbki zawierającej zarówno DNA, jak i RNA. Natomiast, fluorymetr Qubit jest w stanie dokonać niezależnego pomiaru DNA, RNA oraz białek w tej samej próbce w oparciu o specjalnie opracowane zestawy do ich detekcji. Do oznaczeń wystarczające jest użycie małych objętości próby (1-20 μ l), co jest istotne przy ograniczonej ilości DNA, którą często dysponujemy w praktyce genetyczno-sądowej. Na rycinie 1 porównano dokładność oznaczeń fluorymetru Qubit i spektrofotometru UV. Fluorymetr Qubit dokonuje

pomiaru DNA w próbie o tak niskim stężeniu jak 10 pg/ μ l, przy czym błąd pomiaru nie przekracza tutaj 20%, co wskazuje na wysoką dokładność oznaczeń. Dla porównania, przy pomiarze tak uzyskanego stężenia przez spektrofotometr, błąd pomiaru przekracza 80%. Metoda spektrofotometryczna daje w miarę dokładne wyniki (błąd pomiarowy nieprzekraczający 20%) dopiero przy stężeniu próby równym lub większym 4 ng/ μ l, przy czym nadal jej pomiary są o wiele mniej dokładne, niż te uzyskane na fluorymetrze Qubit. Przy wyższych zakresach stężeń ta zależność utrzymuje się. Przykładowo, błąd pomiaru dla próby o stężeniu 10 ng/ μ l wynosi zaledwie 1% dla oznaczeń metodą fluorymetryczną, w porównaniu do 5% dla oznaczeń na spektrofotometrze [18].



Rycina 1. Dokładność pomiarów fluorymetru Qubit i spektrofotometru UV przedstawiona jako zależność błędu pomiaru od rzeczywistego stężenia próby. Opracowano wg [18].

Na rycinie 2 porównano zakresy stężeń prób otrzymanych przy dokonaniu pomiarów za pomocą fluorymetru Qubit i zestawów do detekcji kwasów nukleinowych, z zakresami stężeń uzyskanymi podczas pomiarów absorbancji UV na spektrofotometrze. Łączny zakres stężeń dla Qubit dsDNA HS i Qubit dsDNA BR wynosi od 0,01 ng/μl do 1000 ng/μl. Natomiast dla spektrofotometru UV wynosi on od 2 ng/μl do 15 μg/μl. Wynika stąd, że metoda fluorymetryczna w zakresie stężeń nieprzekraczających 1000ng/μl jest zdecydowanie bardziej przydatna w aspekcie genetyki medyczo-sądowej, gdzie dysponuje się często śladowymi ilościami DNA, niż metoda spektrofotometryczna.



Rycina 2. Porównanie zakresu stężeń prób wyjściowych zmierzonych w oparciu o pomiar fluorymetryczny i spektrofotometryczny. Opracowano wg [18].

Możliwości detekcji i zakresy pomiarowe fluorymetru Qubit bazującego na zestawach opartych o pomiar fluorescencji zestawiono w tabeli 1. W zależności od tego, czy mierzymy stężenie DNA, RNA czy też białka oraz z jakim wyjściowym zakresem stężeń prób mamy do czynienia korzystamy z różnych odmian zestawu Quant-iT, takich jak HS (High Sensitivity) Assay Kit, BR (Broad Range) Assay Kit, Quant-iT RNA Assay Kit oraz Quant-iT Protein Assay Kit [19]. Fluorofory, wchodzące w skład poszczególnych zestawów Quant-iT Assay Kit, stają się silnie fluorescencyjne po związaniu z DNA, RNA lub białkiem. W przypadku analizy kwasu nukleinowego barwnik łączy się z materiałem genetycznym w kilka sekund i osiąga równowagę w mniej niż dwie minuty. Intensywność sygnału fluorescencyjnego otrzymanego kompleksu, zmierzona w odniesieniu do standardów o znanym stężeniu, jest wprost proporcjonalna do stężenia DNA w roztworze.

Tabela 1. Zakresy pomiarowe zestawów służących do fluorescencyjnej detekcji DNA, RNA i białek z zastosowaniem fluorymetru Qubit.

Rodzaj zestawu	Zakres odczytu (ilość DNA, RNA lub białka)*	Wyjściowe stężenie próby
Quant-iT dsDNA HS Assay Kit	0,2 ng –100 ng	10 pg/μl–100 ng/μl
Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	2 ng –1000 ng	100 pg/μl–1 μg/μl
Quant-iT RNA Assay Kit	5 ng –100 ng	250 pg/μl–100 ng/μl
Quant-iT Protein Assay Kit	0.25 μg – 5 μg	12,5 μg/ml–5 mg/ml

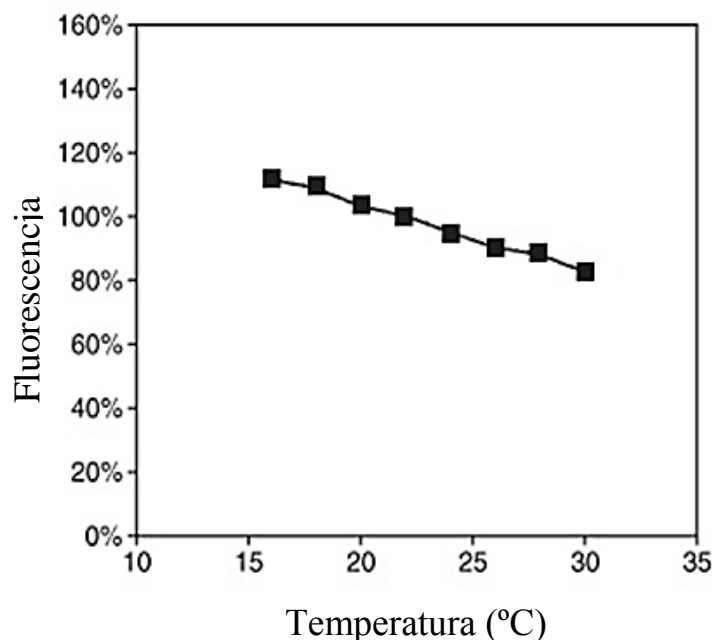
*Ilość DNA w próbach o objętości 1-20 μl. Opracowano wg [19].

Quant-iT RNA Assay Kit jest pierwszym, jednorodnym testem wykorzystanym do ilościowego pomiaru RNA w obecności DNA. Test ten wykazuje zakres detekcji dla ilości RNA wynoszącej od 5 ng do 100 ng, co odpowiada początkowemu stężeniu próby mieszczącemu się w zakresie od 250 pg/ μ l do 100 ng/ μ l. Technika ta przydatna jest do ilościowego oznaczania RNA dla metod takich jak mikromacierze, RT-PCR i Northern Blot [20].

Quant-iT BR DNA Assay Kit stosowany jest do pomiaru ilości DNA prób, o szerokim zakresie wykrywanej ilości DNA wynoszącej od 2 ng do 1000 ng, co odpowiada początkowemu stężeniu próby mieszczącemu się w zakresie od 100 pg/ μ l do 1000 ng/ μ l. Test ten jest wykorzystywany do oznaczeń genomowego jak i plazmidowego DNA [7].

Quant-iT HS dsDNA Assay Kit, będący przedmiotem badań w tej pracy, jest wysoce selektywny dla dwuniciowego DNA i dobrze toleruje wszelkie zanieczyszczenia takie jak sole, rozpuszczalniki, detergenty lub białka. Test ten jest odpowiedni dla zakresu wykrywanej ilości DNA wynoszącej od 0,2 ng do 100 ng, co odpowiada początkowemu stężeniu próby mieszczącemu się w zakresie od 10 pg/ μ l do 100 ng/ μ l. Wyżej wymieniony zakres pomiarowy pozwala na uzyskanie wyższej czułości pomiarów w porównaniu z zestawem Quant-iT BR DNA Assay.

Wysokiej czułości pomiarów walidowanego zestawu towarzyszą ograniczenia związane z wahaniami temperatury mogącymi wpłynąć na dokładność oznaczeń, co obrazuje rycina 3.



Rycina 3. Wpływ temperatury na różnice w odczycie pomiarów przez fluorometr Qubit. Opracowano wg [19]

W związku z istotnymi zmianami temperatury podczas pomiaru, może dochodzić do wahań poziomu fluorescencji, dlatego też wszystkie odczynniki należy przechowywać w temperaturze pokojowej, a pomiary na fluorymetrze Qubit powinny być przeprowadzane w możliwie jak najkrótszym czasie, w tych samych warunkach temperaturowych. Należy pamiętać, że w przypadku kilkukrotnego dokonywania pomiaru jednej próbki, czasowe zmniejszanie się fluorescencji jest właśnie skutkiem wzrostu temperatury mieszaniny. Z tego powodu, jeśli chcemy wykonać wiele odczytów jednej próby, należy przed każdym kolejnym pomiarem wyjąć ją z urządzenia, w celu wyrównania się jej temperatury z temperaturą pokojową.

Quant-iT HS DNA Assay Kit doskonale nadaje się do oceny stężenia kwasów nukleinowych w małych objętościach próby. Zestaw ten znalazł również swoje zastosowanie w przebiegu sekwencjonowania następnej generacji (NGS), które stanowi najnowocześniejszą technikę biologii molekularnej opartą na masowym, równoległym sekwencjonowaniu pofragmentowanej matrycy DNA [11,21,28].

Użycie w tej technice zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit stanowi obligatoryjny krok w procedurze badawczej [13,16].

1.4. Walidacja metod analitycznych

Walidacją metod analitycznych, według ISO, nazywamy proces ustalania parametrów charakteryzujących sprawność działania i ograniczeń metody oraz sprawdzenie jej przydatności. Walidacja określa wymogi, przy jakich uzyskany wynik może być uznany za wiarygodny, a ponadto obejmuje możliwość oszacowania wpływu różnych czynników, zarówno wynikających z pracy człowieka jak i wpływu środowiska na niepewność tego wyniku. Przeprowadzenie procesu walidacji daje pewność, że proces analizy przebiega w sposób rzetelny i precyzyjny, oraz że metoda jest wystandaryzowana i daje wiarygodne, niebudzące wątpliwości wyniki badań [26,30].

Parametry walidacyjne

Walidacja swoim zakresem obejmuje m.in. takie parametry jak precyzja (powtarzalność, odtwarzalność), dokładność, czułość metody, granica wykrywalności i oznaczalności, zakres i liniowość metody oraz selektywność (specyficzność) [31].

Precyzja to rozrzut poszczególnych wyników przy powtarzanych doświadczeniach w stosunku do średniego wyniku z oznaczeń. Im większa precyzja tym mniejszy rozrzut. Precyzja wiąże ze sobą dwa terminy takie jak powtarzalność i odtwarzalność. Z **powtarzalnością** oznaczeń mamy do czynienia, gdy analiza wykonywana jest tą samą metodą, przez tą samą osobę, na tych samych urządzeniach, w tych samych warunkach laboratoryjnych, w możliwie krótkim przedziale czasowym. Miarą powtarzalności jest odchylenie standardowe. **Odtwarzalność**

wyników jest sprawdzana tą samą metodą na tych samych próbach, ale przez różne osoby, w odstępie czasowym, przy użyciu tego samego sprzętu pomiarowego.

Dokładność jest to stopień zgodności pomiędzy wynikiem oznaczonym, a wartością rzeczywistą badanej próby.

Czułość określa stosunek zmiany sygnału analitycznego na skutek zmiany stężenia analitu lub jego ilości. Im większa zmiana sygnału przy małej zmianie stężenia analitu, tym większa czułość metody. Czułość metody określa również najmniejsze stężenie, jakie może być zmierzone daną metodą.

Granica wykrywalności jest to najmniejsza ilość substancji oznaczanej, jaką można wykryć daną metodą.

Granica oznaczalności jest to najmniejsza ilość lub stężenie substancji, którą można oznaczyć ilościowo daną metodą.

Selektywność to możliwość oznaczenia jednego składnika wśród innych, w złożonej próbce bez interferencji składników towarzyszących.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest walidacja metody pomiaru stężenia dwuniciowego DNA za pomocą fluorymetru Qubit oraz zestawu Quant-iT HS dsDNA Assay Kit wykorzystywanej do analiz przeprowadzanych w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej. Walidacja ta będzie polegała na:

1. Określeniu optymalnego zakresu pomiarowego metody
2. Ocenie powtarzalności walidowanej metody
3. Ocenie odtwarzalności walidowanej metody
4. Zestawieniu uzyskanych wyników pomiarów stężeń DNA z wartościami tych stężeń podanymi przez producenta
5. Zestawieniu pomiarów stężeń DNA uzyskanych walidowaną metodą z pomiarami przeprowadzonymi za pomocą metody Real Time PCR
6. Zestawieniu stężeń DNA prób kontrolnych z wartościami RFU uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej.

3. Materiał i metodyka badań

3.1. Materiał

Jako materiał do badań posłużyły próby (izolaty) DNA, zdeponowane w Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej, Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zawierające próby kontrolne oraz próby pochodzące z ekspertyz genetyczno-sądowych. Na ich wykorzystanie do badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (numer RNN/167/15/KB).

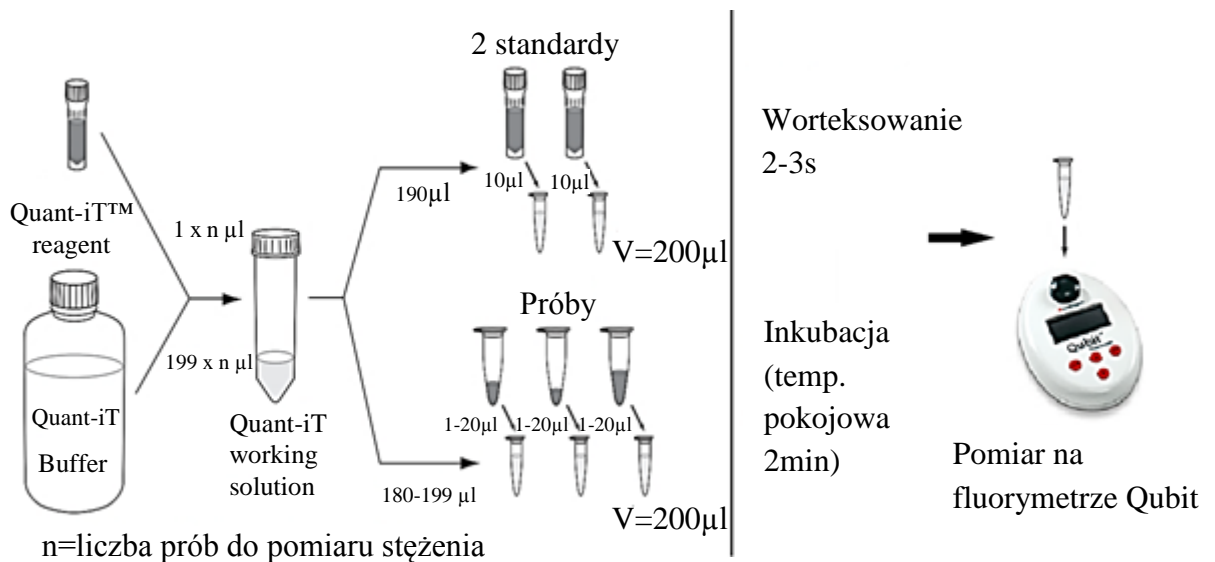
3.2 Metodyka badań

3.2.1. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną

Pomiaru stężenia DNA w próbach dokonano za pomocą fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS DNA Kit w oparciu o metodę fluorymetryczną (rycina 4). Do oznaczenia użyto po 1 μl badanych prób. W przypadku prób o wysokim stężeniu DNA, dla którego zakres odczytu przekraczał zasięg pomiarowy fluorymetru ($>120 \text{ ng}/\mu\text{l}$), wykonano pomiar powtórnie według własnej modyfikacji procedury badawczej, z użyciem pięciokrotnie mniejszej objętości próby (0,2 μl). Dotyczyło to prób: 2.6, 2.24, 3.6, 3.9, 7.6, 7.12, 7.18, 10.1, 74K15. Następnie próby mieszano z odpowiednią objętością buforu zawierającego fluoroforowy reagent w taki sposób, aby łączna objętość końcowa mieszaniny wynosiła 200 μl . Schemat postępowania pomiarowego przedstawiono na rycinie 5.



Rycina 4. Pomiary przeprowadzane za pomocą zestawu Quant-iT HS dsDNA Assay i fluorymetru Qubit, stanowiącego wyposażenie Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej (ZMS UM Łódź).



Rycina 5. Schemat postępowania pomiarowego z użyciem zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit. Opracowano wg. [19].

Pomiary przeprowadzono w odniesieniu do dwóch wzorców zawartych w zestawie, o stężeniach odpowiednio 0 ng/μl i 10 ng/μl, a stężenia DNA w badanych próbach obliczono według wzoru:

$$\text{Stężenie DNA [ng/μl]} = \text{odczyt pomiaru [ng/μl]} \times \frac{200 [\mu\text{l}]}{\text{objętość badanej próby [\mu\text{l}]}}$$

3.2.2. Ocena powtarzalności pomiarów

W celu oceny powtarzalności metody dokonano ośmiu pomiarów każdej próby, z czego pierwsze cztery pomiary wykonano pierwszego dnia, a cztery kolejne pomiary dnia następnego. Ocenę powtarzalności tych pomiarów przeprowadzono na podstawie oceny parametrów statystycznych takich jak: odchylenie standardowe (SD) oraz standardowy błąd średniej (SE).

Odchylenie standardowe (SD) obliczono według wzoru:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

gdzie, X- stężenie uzyskane w kolejnych pomiarach

\bar{X} - średnie stężenie

N-liczba pomiarów

Przyjęto, że graniczna wartość parametru SD, przy jakiej pomiary uznać można za powtarzalne wynosiła 0,2. Wartości SD powyżej 0,2 wskazywały na znaczny rozrzut wyników wokół średniej i tym samym na ich mniejszy stopień powtarzalności.

Standardowy błąd średniej (SE) obliczono według wzoru:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{N}}$$

gdzie, SD- odchylenie standardowe

N- liczba pomiarów

Przyjęto, że graniczna wartość parametru SE, dla której pomiary uznać można za powtarzalne wynosi 0,1.

3.2.3. Ocena odtwarzalności pomiarów

Odtwarzalność metody oceniono na podstawie porównania średnich stężeń prób uzyskanych w pierwszym dniu pomiarowym ze średnimi stężeniami tych prób uzyskanymi w drugim dniu pomiarowym. W każdym z tych dwóch dni, pomiary przeprowadzone były przez dwie różne osoby. W celu oceny odtwarzalności metody sprawdzano istotność różnic pomiędzy wynikami z obu dni pomiarowych, w oparciu o test Chi kwadrat. Liczba stopni swobody (df) wyrażona została wzorem $k-1$, gdzie k oznacza liczbę porównywanych pomiarów. Ze względu na to, że porównywano ze sobą dwie wartości, liczba stopni swobody, dla których uzyskano wyniki testu wynosiła 1. Przy wartości prawdopodobieństwa powyżej założonego poziomu istotności 0,05 różnice uznawano za statystycznie nieistotne. Opracowanie badań przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie komputerowe STATISTICA 12.0 StatSoft, Polska [26] oraz wykorzystanie arkusza kalkulacyjnego programu Microsoft Excel.

3.2.4. Zestawienie uzyskanych wyników pomiarów prób kontrolnych z wartościami ich stężeń podanymi przez producenta

Z wykorzystaniem zestawu Quant-iT HS DNA Kit i fluorymetru Qubit przeprowadzono pomiary stężenia DNA prób kontrolnych pochodzących z zestawów do amplifikacji DNA, kolejno:

- K1: AB AmpF ℓ STR Control DNA XY 007; 0,1 ng/ μ l,
- K2: AB AmpF ℓ STR Control DNA XY 007; 2,0 ng/ μ l,
- K3: QIAGEN Control DNA XY5; 2,0 ng/ μ l,
- K4: QIAGEN Control DNA XY 9948; 0,1 ng/ μ l,
- K5: AB AmpF ℓ STR Control DNA XX 9947A; 0,1 ng/ μ l,
- K6: AB AmpF ℓ STR Yfiler Control DNA XX 9947A; 10,0 ng/ μ l,
- K7: QIAGEN Control DNA XX 9947A; 0,1 ng/ μ l,

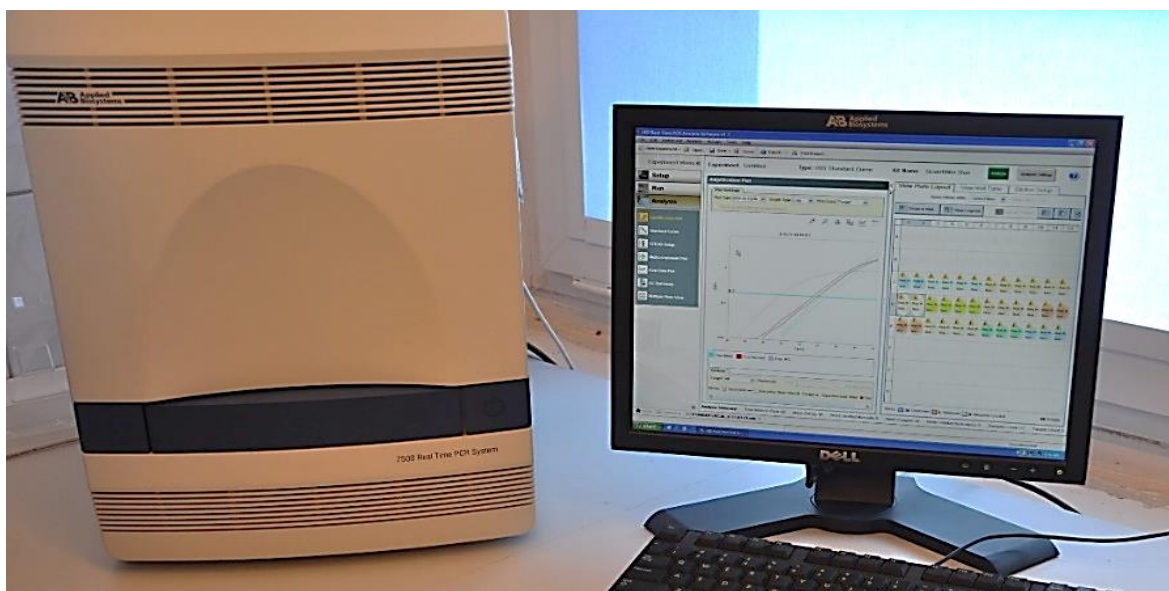
Na podstawie dwunastu pomiarów każdej próby kontrolnej wyliczono jej średnie stężenie, a następnie zestawiono je z wyżej wymienionymi stężeniami tych kontroli podanymi przez producenta. Przy użyciu testu Chi kwadrat sprawdzono, czy różnice między stężeniami zmierzonymi oraz podanymi przez producenta są istotne statystycznie ($P < 0,05$).

Dodatkowo, na podstawie dwunastu pomiarów każdej próby, które oznaczane były w trakcie kolejnych trzech dni, przez dwie różne osoby, dokonano oceny powtarzalności i odtwarzalności metody.

3.2.5. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą Real Time PCR

Zarówno próby pochodzące z ekspertyz genetyczno-sądowych jak i próby kontrolne poddano ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu systemu 7500 Real-Time PCR firmy Applied Biosystems, wyposażonego w laser

wzbudzający fluorescencję, kamerę CCD i oprogramowanie HID (rycina 6). W reakcji Real Time PCR wykorzystano zestaw Quantifiler Duo DNA Quantification Kit pozwalający na ocenę obecności stężenia ludzkiego DNA, męskiego DNA oraz inhibitorów w jednej reakcji. W analizie porównawczej wykorzystano wyniki detekcji wyłącznie ludzkiego DNA (Ct human), które zestawiono z wynikami pomiaru całkowitego DNA przeprowadzonego metodą fluorymetryczną.



Rycina 6. Termocykler 7500 Real-Time PCR System, stanowiący wyposażenie Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej (ZMS UM Łódź).

Do oznaczeń użyto po 2 μl każdej próby, które rozpipetowano do dołków zawierających po 23 μl wcześniej przygotowanej mieszaniny reakcyjnej, ściśle według instrukcji producenta [1]. Pomiary przeprowadzono w dwóch powtórzeniach dla każdej próby. Podstawę do obliczenia stężenia DNA w badanych próbach stanowił odczyt granicznej wartości cyklu amplifikacji Ct, przy którym ilość amplifikowanego produktu generowała sygnał fluorescencji przekraczający wartość progową (0,2). Otrzymaną wartość Ct odnoszono do krzywej standardowej, wykreślonej w oparciu o pomiary standardu DNA o kolejnych stężeniach: 200 ng/ μl , 100 ng/ μl , 50 ng/ μl , 25 ng/ μl , 5 ng/ μl , 0,5 ng/ μl , 0,05 ng/ μl , 0,005 ng/ μl .

Stężenia obliczono według wzoru wyznaczonego na podstawie uzyskanej krzywej, który ma postać:

$$Ct = m [\log(x)] + b$$

gdzie, m- nachylenie krzywej

x- stężenie DNA

b- punkt przecięcia krzywej z osią Y

W ten sposób otrzymane stężenia DNA prób i kontroli porównano ze stężeniami otrzymanymi w oparciu o pomiar fluorymetru Qubit z wykorzystaniem zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit. Na podstawie testu Chi kwadrat oceniono, czy różnice między pomiarami wykonanymi metodą fluorymetryczną oraz metodą Real Time PCR są statystycznie istotne.

3.2.6. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej

Wybrane próby kontrolne poddano amplifikacji przy użyciu zestawu AmpF1STR® NGM™ PCR Amplification Kit firmy Applied Biosystems. Charakterystykę markerów badanych za pomocą tego zestawu, tj. lokalizację chromosomalną locus, zakres alleli i rodzaj barwnika fluorescencyjnego przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka markerów wchodzących w skład zestawu AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit i fluorochromów użytych do ich detekcji.

Locus	Lokalizacja chromosomalna	Zakres alleli	Fluorochrom
D10S1248	10q26.3	8-18	6-FAM
vWA	12p13.3	11-24	6-FAM
D16S539	16q24.1	5;8-15	6-FAM
D2S1338	2q35	15-28	6-FAM
Amelogenina	X,Y	X,Y	VIC
D8S1179	8q24.13	8-19	VIC
D21S11	21q11.2-q21	24-38	VIC
D18S51	18q21.33	7;9-27	VIC
D22S1045	22q12.3	8-19	NED
D19S433	19q12	9-17.2	NED
TH01	11p15.5	4-13.3	NED
FGA	4q28	17-51.2	NED
D2S441	2p14	9-16	PET
D3S1358	3p21.31	12-19	PET
D1S1656	1q42.2	9-20.3	PET
D12S391	12p13.2	14-27	PET

Opracowano wg [17].

Amplifikacji poddano kontrolne DNA 007, o stężeniu wyjściowym 0,1 ng/μl i 2,0 ng/μl oraz ich rozcieńczenia odpowiednio: dwu-, trzy-, pięcio-, dziesięcio-, dwudziesto- krotne. Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta [17], a produkty PCR poddano rozdzielni elektroforetycznej za pomocą automatycznego sekwenatora AB 3500 Genetic Analyzer. Na podstawie wartości stężeń kontrolnego DNA 007 oraz objętości prób, jakich użyto do przeprowadzenia reakcji PCR (3 μl) wyliczono całkowitą wsadową ilość DNA wziętą do rozdzielni. Następnie, przy wykorzystaniu oprogramowania komputerowego GeneMapper® ID-X Software 1.2, dokonano oceny wysokości pików, którego miarę stanowił wskaźnik RFU (względny współczynnik

fluorescencji). Dla analizowanych układów odczytywano wartość RFU dla najwyższego pików w danym kolorze, a następnie obliczono średnią wartość RFU dla czterech kolorów, a tym samym dla całej próby. Oceniano korelację pomiędzy wsadową ilością DNA w reakcji multipleks PCR a poziomem detekcji fluorescencyjnie znakowanych markerów w elektroforezie kapilarnej. Określono także optymalny zakres stężenia DNA (ilości wsadowej DNA) i wartości RFU, dla których zależność między tymi zmiennymi była liniowa.

4. Wyniki

4.1. Pomiar stężenia DNA do oceny powtarzalności i odtwarzalności metody fluorymetrycznej

Przeprowadzone pomiary z wykorzystaniem zestawu Quant-iT HS DNA Kit i fluorymetru Qubit posłużyły do oceny powtarzalności metody. Wyniki kolejnych czterech pomiarów stężenia, uzyskanych w pierwszym oraz w drugim dniu badań zestawiono odpowiednio w tabelach 3 i 4. Zawarto w nich wartości wyliczonej średniej zmierzonych stężeń a także wartości parametrów mierzących rozrzut wyników wokół niej, tj. odchylenia standardowego (SD) i standardowego błędu średniej (SE). Dla prób, które przekraczały zakres pomiarowy fluorymetru Qubit (>120 ng/μl) zastosowano własną modyfikację procedury badawczej, w której rozcieńczano je do objętości 0,2 μl przed ponownym pomiarem.

W tabeli 3 oraz 4 kolorem czerwonym oznaczono próby, dla których uzyskano wartości $SD > 0,2$ i $SE > 0,1$ świadczące o zmniejszonym stopniu powtarzalności pomiarów.

Tabela 3. Stężenia DNA i parametry statystyczne służące do oceny powtarzalności metody fluorymetrycznej uzyskane pierwszego dnia pomiarowego.

Oznaczenie próby	Stężenie DNA (ng/μl)						
	I pomiar	II pomiar	III pomiar	IV pomiar	Śr. stężenie (ng/μl)	SD	SE
1.4	32,80	32,80	32,80	32,80	32,80	0,00	0,0
1.10	35,40	35,40	35,40	35,40	35,40	0,00	0,0
1.24	19,76	19,76	19,74	19,70	19,74	0,03	0,0
2.1	21,20	21,00	21,00	21,00	21,05	0,10	0,1
2.9	37,00	37,00	36,80	36,80	36,90	0,12	0,1
2.12	27,20	27,20	27,20	27,20	27,20	0,00	0,0
2.18	102,00	102,00	102,00	102,00	102,00	0,00	0,0
3.1	12,10	12,10	12,06	12,04	12,08	0,03	0,0
3.12	78,40	78,20	78,20	78,00	78,20	0,16	0,1
3.18	106,00	106,00	106,00	106,00	106,00	0,00	0,0
3.24	8,92	8,94	8,90	8,88	8,91	0,03	0,0
3.30	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00	0,00	0,0
4.1	7,74	7,74	7,70	7,74	7,73	0,02	0,0
4.3	5,52	5,50	5,50	5,50	5,51	0,01	0,0
4.6	11,94	11,92	11,90	11,86	11,91	0,03	0,0
4.12	50,20	50,00	50,00	50,00	50,05	0,10	0,1
6.8	116,00	116,00	116,00	116,00	116,00	0,00	0,0
10.6	70,2	70,4	70,4	70,4	70,35	0,10	0,1
6.12	43,6	43,6	43,8	43,8	43,70	0,12	0,1
7.3	2,58	2,64	2,58	2,58	2,60	0,03	0,0
10.2	17,62	17,60	17,58	17,56	17,59	0,03	0,0
10.12	51,00	50,80	50,60	50,60	50,75	0,19	0,1
17.120	112,00	112,00	112,00	112,00	112,00	0,00	0,0
7p	0,63	0,63	0,54	0,63	0,61	0,05	0,0
8dz	0,76	0,76	0,76	0,75	0,76	0,00	0,0
9m	0,97	0,97	0,96	0,97	0,97	0,01	0,0
10p	1,05	1,04	1,04	1,05	1,04	0,01	0,0
11dz	0,91	0,92	0,91	0,91	0,92	0,01	0,0
12m	1,28	1,28	1,28	1,30	1,28	0,01	0,0
14K15	22,2	22,2	22,2	22,2	22,20	0,00	0,0
2.6	79,50	79,50	78,50	79,00	79,13	0,48	0,2
2.24	325,50	324,50	324,50	323,50	324,83	0,58	0,3
3.6	282,50	281,50	281,00	280,50	281,38	0,85	0,4
3.9	225,00	224,00	223,50	223,50	224,00	0,71	0,4
7.6	483,50	481,00	480,50	482,00	481,75	1,32	0,7
7.12	356,00	356,00	355,00	355,00	355,50	0,58	0,3
7.18	1110,00	1105,00	1105,00	1105,00	1106,25	2,50	1,3
10.1	116,50	116,00	116,00	115,50	116,00	0,41	0,2
74K15	184,00	184,80	184,80	184,80	184,60	0,40	0,2

SD-odchylenie standardowe SE- standardowy błąd średniej

Tabela 4. Stężenia DNA i parametry statystyczne służące do oceny powtarzalności metody fluorymetrycznej uzyskane drugiego dnia pomiarowego.

Nr próby	Stężenie DNA (ng/μl)						
	I pomiar	II pomiar	III pomiar	IV pomiar	Śr. stężenie (ng/μl)	SD	SE
1.4	33,00	33,00	33,00	33,00	33,00	0,00	0,0
1.10	32,60	32,60	32,60	32,60	32,60	0,00	0,0
1.24	20,20	20,20	20,20	20,20	20,20	0,00	0,0
2.1	16,22	16,20	16,20	16,18	16,20	0,02	0,0
2.9	43,20	43,00	43,00	43,00	43,05	0,10	0,1
2.12	26,80	26,80	26,80	26,60	26,75	0,10	0,1
3.1	12,66	12,66	12,64	12,58	12,64	0,04	0,0
3.12	82,00	82,00	81,80	81,80	81,90	0,12	0,1
3.24	8,78	8,78	8,78	8,80	8,79	0,01	0,0
4.1	6,86	6,80	6,86	6,86	6,85	0,03	0,0
4.3	6,00	6,02	6,02	5,98	6,01	0,02	0,0
4.6	12,26	12,24	12,22	12,20	12,23	0,03	0,0
4.12	47,20	47,20	47,20	47,20	47,20	0,00	0,0
7.3	2,12	2,12	2,10	2,12	2,12	0,01	0,0
10.2	20,00	19,98	19,92	19,92	19,96	0,04	0,0
10.12	46,20	46,00	46,00	46,00	46,05	0,10	0,1
17.120	104,00	102,00	102,00	102,00	102,50	1,00	0,5
7p	0,63	0,63	0,67	0,63	0,64	0,02	0,0
8dz	0,71	0,72	0,70	0,69	0,70	0,01	0,0
9m	1,20	1,21	1,19	1,19	1,20	0,01	0,0
10p	0,87	0,88	0,88	0,87	0,87	0,00	0,0
11dz	0,94	0,95	0,93	0,97	0,95	0,02	0,0
12m	1,33	1,33	1,32	1,32	1,32	0,01	0,0
2.6	100,00	100,00	98,00	100,50	99,63	1,11	0,6
2.24	377,50	377,00	376,00	374,00	376,13	1,55	0,8
3.6	142,50	142,00	142,00	142,50	142,25	0,29	0,1
3.9	248,50	248,00	248,00	247,50	248,00	0,41	0,2
7.6	482,00	481,50	481,00	480,50	481,25	0,65	0,3
7.12	269,00	267,50	266,50	266,00	267,25	1,32	0,7
7.18	1110,00	1105,00	1105,0	1100,00	1105,00	4,08	2,0
10.1	97,50	97,50	97,50	97,00	97,38	0,25	0,1

SD-odchylenie standardowe SE- standardowy błąd średniej

Zerowe wartości odchylenia standardowego i standardowego błędu średniej lub ich niskie wartości, odpowiednio <0,2 (SD) i <0,1 (SE) wskazują na bardzo wysoką powtarzalność przeprowadzonych pomiarów, w zakresie stężeń nieprzekraczających około 100 ng/μl. Dla większości pomiarów powyżej tej wartości obserwuje się spadek precyzji pomiaru.

W celu oceny odtwarzalności metody zestawiono ze sobą średnie wyniki pomiarów z pierwszego i drugiego dnia pomiarowego (tabela 5). W tabeli tej podano również wyniki testu Chi kwadrat i wynikające z nich prawdopodobieństwo do oceny statystycznej znamienności różnic.

Tabela 5. Zestawienie uzyskanego w dwóch dniach pomiarowych stężenia DNA do oceny odtwarzalności metody fluorymetrycznej.

Oznaczenie próby	Średnie stężenie DNA (ng/μl) I dzień pomiarowy	Średnie stężenie DNA (ng/μl) II dzień pomiarowy	Wynik testu Chi kwadrat dla df=1	Wartość P
1.4	32,80	33,00	0,001	0,975
1.10	35,40	32,60	0,115	0,735
1.24	19,74	20,20	0,005	0,944
2.12	27,20	26,75	0,004	0,950
3.1	12,08	12,64	0,013	0,909
3.12	78,20	81,90	0,086	0,769
3.24	8,91	8,79	0,001	0,975
4.1	7,73	6,85	0,053	0,818
4.3	5,51	6,01	0,022	0,882
4.6	11,91	12,23	0,004	0,950
4.12	50,05	47,20	0,084	0,772
7.3	2,60	2,12	0,049	0,825
10.2	17,59	19,96	0,150	0,699
10.12	50,75	46,05	0,228	0,633
17.120	112,00	102,50	0,421	0,516
7p	0,61	0,64	0,001	0,975
8dz	0,76	0,70	0,002	0,964
9m	0,97	1,20	0,024	0,877
10p	1,04	0,87	0,015	0,903
11dz	0,92	0,95	0,000	1,000
12m	1,28	1,32	0,001	0,975
2.6	79,13	99,63	2,351	0,125
2.24	324,83	376,13	3,754	0,053
3.6	281,38	142,25	45,694	0,000
3.9	224,00	248,00	1,220	0,269
7.6	481,75	481,25	0,000	1,000
7.12	355,50	267,25	12,506	0,000
7.18	1106,25	1105,00	0,001	0,975
10.1	116,00	97,38	1,625	0,202

df-liczba stopni swobody

Kolorem czerwonym oznaczono próby, dla których uzyskano wyniki testu Chi kwadrat wskazujące na statystyczną znamienność różnic ($P < 0,05$).

Wyniki testu Chi kwadrat wyliczone w celu porównania uzyskanych wartości stężeń z dwóch dni pomiarowych wskazują na to, że pomiary są odtwarzalne dla większości prób (93%). Jedynie dwie próby (7%) wykazały istotne statystycznie różnice w pomiarach między pierwszym dniem pomiarowym a drugim.

4.2. Zestawienie uzyskanych wyników pomiarów prób kontrolnych z wartościami ich stężeń podanymi przez producenta

Z wykorzystaniem zestawu Quant-iT HS DNA Kit i fluorymetru Qubit przeprowadzono również pomiary stężenia DNA prób kontrolnych. Następnie porównano uzyskane pomiary stężeń z wartościami stężeń podanymi przez producenta. Obliczono wartości testu Chi kwadrat oceniające statystyczną znamienność różnic. Porównywane wartości i obliczone parametry zestawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie stężeń prób kontrolnych DNA oznaczonych na fluorymetrze Qubit ze stężeniami podanymi przez producenta.

Próba	Stężenie producenta ng/ μ l	Średnie stężenie Qubit ng/ μ l	Wynik testu Chi kwadrat dla df=1	Wartość P
K1	0,1	0,11	0,000	1,000
K2	2	1,26	0,168	0,682
K3	2	1,45	0,088	0,767
K4	0,1	0,17	0,018	0,893
K5	0,1	0,14	0,007	0,933
K6	10	9,73	0,004	0,950
K7	0,1	0,15	0,010	0,920

df-liczba stopni swobody

Wyniki testu Chi kwadrat wykazały, że różnice między stężeniem zmierzonym a podanym przez producenta dla prób kontrolnych są nieistotne statystycznie.

Dodatkowo, na podstawie dwunastokrotnych pomiarów każdej próby kontrolnej, przeprowadzanych przez kolejne trzy dni pomiarowe dokonano oceny powtarzalności i odtwarzalności metody. W tabeli 7 zestawiono ze sobą przeprowadzone pomiary wraz z wartościami średnich tych pomiarów oraz z wartościami ich odchyłeń standardowych. Niskie wartości SD potwierdziły wysoką powtarzalność i odtwarzalność pomiarów dla wszystkich prób z wyjątkiem kontroli K6.

Tabela 7. Seria pomiarów stężeń prób kontrolnych przeprowadzonych w trakcie kolejnych trzech dni z wykorzystaniem fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit.

Kontrola	Pierwszy dzień pomiarowy				Drugi dzień pomiarowy				Trzeci dzień pomiarowy				Średnie stężenie DNA [ng/μl]	SD
	Stężenie DNA [ng/μl]				Stężenie DNA [ng/μl]				Stężenie DNA [ng/μl]					
	I pomiar	II pomiar	III pomiar	IV pomiar	V pomiar	VI pomiar	VII pomiar	VII pomiar	IX pomiar	X pomiar	XI pomiar	XII pomiar		
K1	0,08	0,08	0,08	0,06	0,12	0,12	0,13	0,13	0,10	0,12	0,19	0,15	0,11	0,04
K2	1,31	1,33	1,32	1,32	1,17	1,17	1,18	1,16	1,28	1,28	1,30	1,25	1,26	0,07
K3	1,42	1,44	1,42	1,42	1,44	1,45	1,45	1,47	1,56	1,43	1,43	1,43	1,45	0,04
K4	0,12	0,12	0,12	0,12	0,16	0,16	0,16	0,16	0,23	0,25	0,20	0,21	0,17	0,05
K5	0,14	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16	0,16	0,18	0,12	0,12	0,12	0,13	0,14	0,02
K6	9,06	9,04	9,02	9,04	10,40	10,42	10,42	10,42	11,40	11,38	11,46	11,44	10,29	1,02
K7	0,13	0,13	0,13	0,13	0,16	0,16	0,16	0,17	0,15	0,18	0,18	0,15	0,15	0,02

SD- odchylenie standardowe

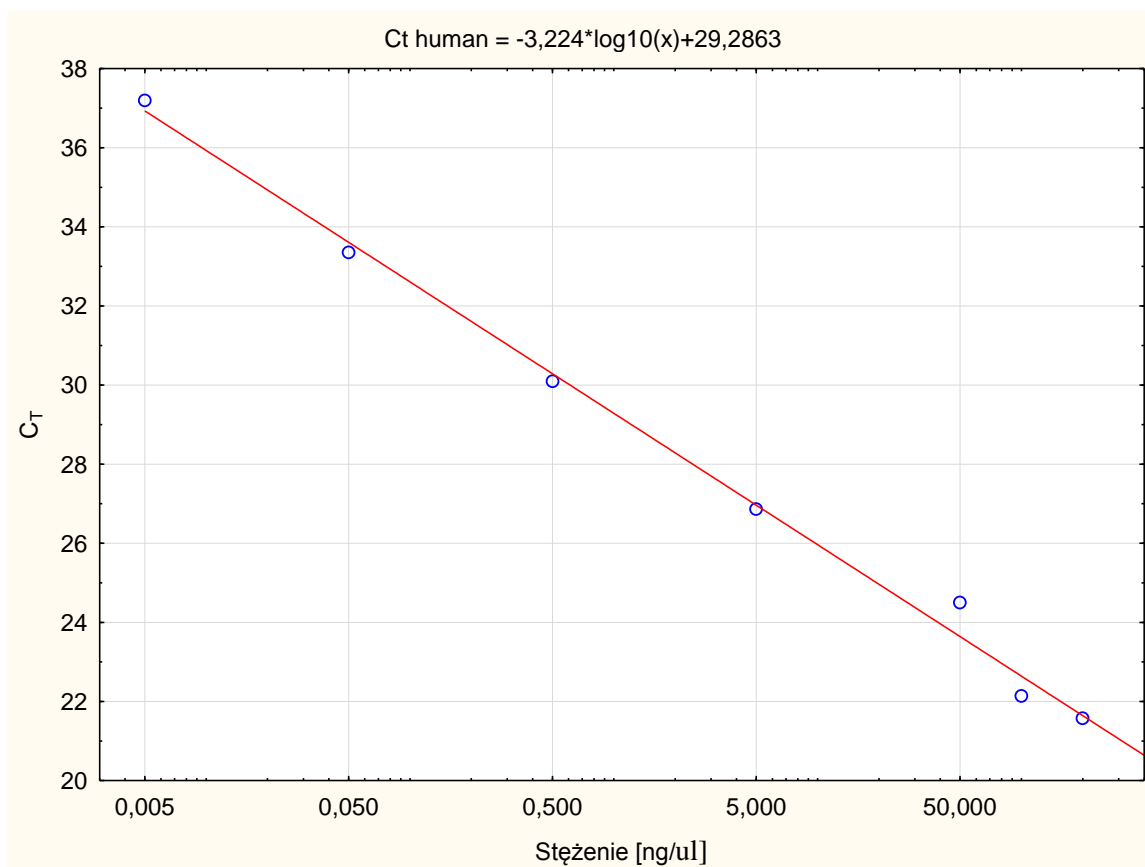
4.3. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą Real Time PCR

W tabeli 8 zestawiono ze sobą stężenia standardu i odpowiadające im wartości Ct ludzkiego DNA (Ct human), na podstawie których sporządzono krzywą standardową tych dwóch zależności.

Tabela 8. Zestawienie stężeń standardu wraz z odpowiadającymi im wartościami Ct human, na podstawie których wykreślono krzywą standardową.

Rozcieńczenia standardu o wyjściowym stężeniu 200ng/ μ l	Stężenie ng/ μ l	Ct human
bez rozcieńczenia	200	21,570
2x	100	22,138
4x	50	24,502
40x	5	26,863
400x	0,5	30,092
4000x	0,05	33,354
40000x	0,005	37,196

Na rycinie 7 przedstawiono wykres krzywej standardowej zależności stężenia DNA od wartości Ct human.



Rycina 7. Wykres krzywej standardowej zależności stężenia DNA od wartości Ct human.

Po podstawieniu do wzoru wartości nachylenia krzywej (-3,224) i punktu przecięcia z osią Y (29,286), równanie krzywej standardowej przyjmuje postać:

$$Ct_{human} = -3,224 \cdot \log(x) + 29,2863$$

Na podstawie równania tej krzywej obliczono stężenia DNA, odpowiadające konkretnym wartościom Ct human otrzymanym w reakcji Real Time PCR. W tabeli 9 zestawiono ze sobą uzyskane stężenia ze stężeniami otrzymanymi za pomocą fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit dla prób kontrolnych. Na podstawie wyników testu Chi kwadrat sprawdzano istotność różnic między pomiarami z obu metod.

Tabela 9. Wyniki pomiarów stężeń DNA prób kontrolnych uzyskane metodą walidowaną i metodą Real Time.

Kontrola	Stężenie Qubit (ng/μl)	Stężenie wyliczone na podstawie wartości Ct human (ng/μl)	Wynik testu Chi kwadrat dla df=1	Wartość P
K1	0,11	0,08	0,005	0,944
K2	1,26	0,84	0,084	0,772
K3	1,45	1,22	0,020	0,888
K4	0,17	0,06	0,053	0,818
K5	0,14	0,13	0,00	1,000
K6	9,73	10,15	0,009	0,924
K7	0,15	0,07	0,029	0,865

df-liczba stopni swobody

Na podstawie wyników testu Chi kwadrat, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między stężeniami DNA prób kontrolnych dla obu metod ($P > 0,05$). W przeprowadzonym zakresie pomiarowym, wynoszącym od około 0,1 do około 10 ng/μl można uznać wyniki oznaczeń obiema metodami za porównywalne.

W tabeli 10 zestawiono pomiary stężeń DNA prób pochodzących z ekspertyz genetyczno-sądowych przeprowadzone za pomocą fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit z ich stężeniami uzyskanymi za pomocą metody Real Time PCR. W tabeli zawarto także wyniki testu Chi kwadrat, na podstawie których oceniano, czy istnieją statystycznie znamienne różnice między pomiarami z obu metod.

Tabela 10. Wyniki pomiarów stężenia DNA prób pochodzących z ekspertyz genetyczno-sądowych uzyskane metodą walidowaną i metodą Real Time.

Oznaczenie próby	Stężenie Qubit ng/μl	Stężenie wyliczone na podstawie Ct ng/μl	Wynik testu Chi kwadrat dla df=1	Wartość P
1.4	32,90	29,45	0,191	0,660
1.10	34,00	17,65	5,176	0,020
1.24	19,97	24,23	0,411	0,520
2.1	18,63	19,04	0,004	0,950
2.9	39,98	30,89	1,166	0,280
2.12	26,98	58,71	11,749	0,001
3.1	12,36	19,41	1,564	0,210
3.12	80,05	161,20	27,297	0,000
3.18	106,00	129,83	2,408	0,120
3.24	8,85	15,06	1,613	0,200
3.30	22,00	21,96	0,000	1,000
4.1	7,29	9,13	0,206	0,650
4.3	5,76	6,24	0,019	0,890
4.6	12,07	5,97	2,63	0,150
6.8	116,00	336,20	107,227	0,000
6.12	43,70	42,72	0,011	0,920
7.3	2,36	2,37	0,000	1,000
10.2	18,77	15,36	0,341	0,560
10.6	70,35	89,96	2,399	0,120
10.12	48,40	69,42	3,750	0,053
17.120	107,25	105,85	0,009	0,920
7p	0,62	1,01	0,093	0,760
8dz	0,73	5,67	3,813	0,051
9m	1,08	1,48	0,063	0,800
10p	0,96	1,13	0,014	0,900
11dz	0,93	1,02	0,004	0,950
12m	1,30	1,27	0,000	1,000
14K/15	22,20	19,97	0,118	0,730
2.6	89,38	71,55	1,975	0,160
2.24	350,31	859,81	214,516	0,000
3.6	211,81	223,28	0,302	0,580
3.9	236,00	142,32	23,197	0,000
7.6	481,50	198,99	117,286	0,000
7.12	311,38	149,43	56,917	0,000
7.18	1105,63	1298,26	15,436	0,000
10.1	106,69	64,66	10,309	0,001
74K/ 15	184,6	241,72	7,653	0,006

df-liczba stopni swobody

Kolorem czerwonym oznaczono próby, dla których uzyskano wyniki testu Chi kwadrat wskazujące na statystyczną znamienność różnic ($P < 0,05$).

Porównując wyniki badań, dla 26 z 37 (70%) badanych prób nie obserwowano statystycznie istotnych różnic między pomiarami metodą fluorymetryczną i metodą Real Time. Dla 11 badanych prób z 37 (30%) wykazano statystycznie istotne różnice ($P < 0,05$). Różnice te obserwowano głównie dla prób o wysokich stężeniach wyjściowych, przekraczających 100 ng/ μ l.

4.4. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej

W celu oceny korelacji zachodzącej pomiędzy wsadową ilością DNA, a uzyskaną wartością RFU poddano analizie próbę kontrolną DNA XY 007 o stężeniu wyjściowym 2,0ng/ μ l oraz jej rozcieńczenia. Zależność między stężeniem DNA (wsadową ilością DNA) użytymi do reakcji multiplex PCR i odpowiadającym im wysokościami (RFU) dla kontrolnego DNA 007 zestawiono w tabeli 11.

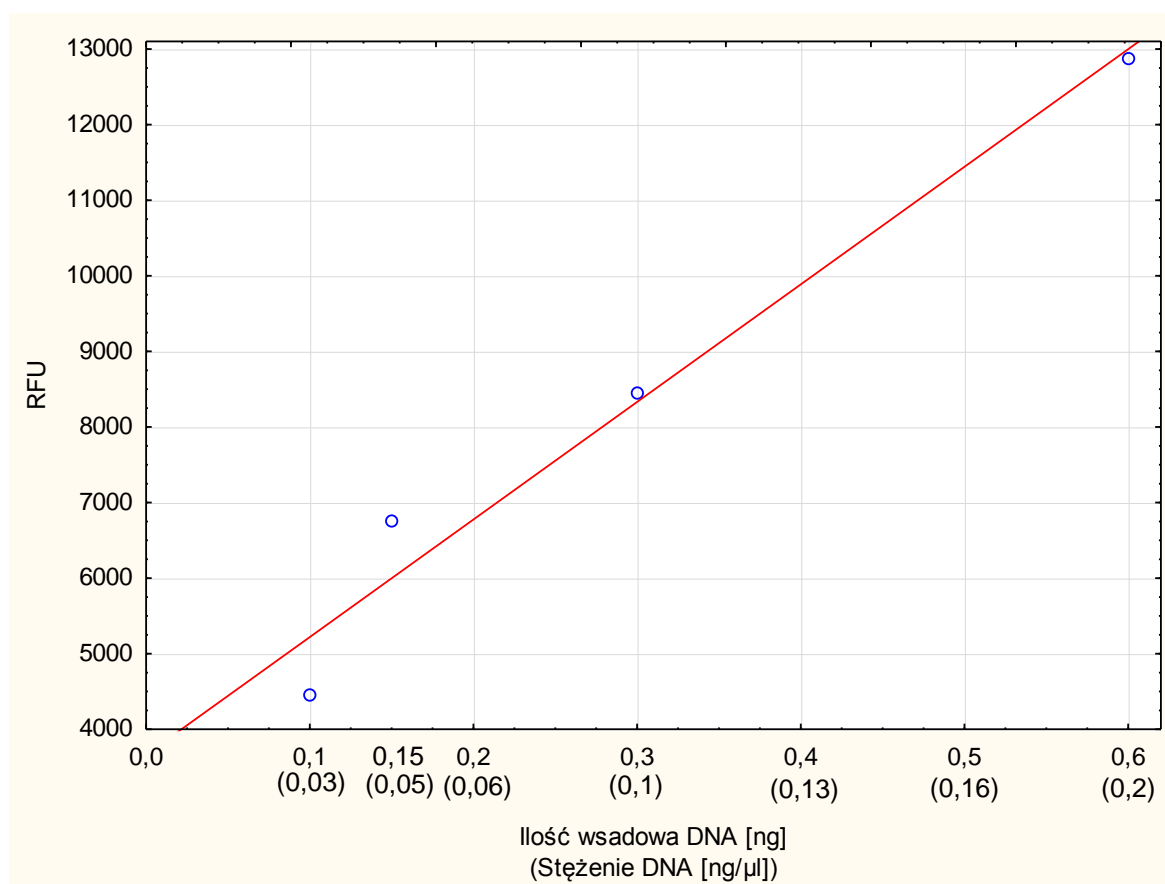
Tabela 11. Stężenie DNA, ilość wsadowa DNA do reakcji multiplex PCR oraz odpowiadające im wartości wskaźnika RFU dla kontrolnego DNA 007.

Stężenie DNA [ng/ μ l]	Ilość wsadowa DNA [ng]	Maksymalna wysokość piku (RFU)				Średnia wartość RFU
		Fluorochrom 6-FAM	Fluorochrom VIC	Fluorochrom NED	Fluorochrom PET	
2	6	24105	47371	55138	29863	39119,25
1	3	21971	43621	47201	26986	34944,75
0,2	0,6	11545	15314	13360	11274	12873,25
0,1	0,3	6107	8475	10876	8330	8447,00
0,05	0,15	5287	7284	8707	5800	6769,50
0,03	0,1	4043	3867	5799	4109	4454,50
0,02	0,06	2467	2700	3179	2105	2612,75
0,01	0,03	1036	1207	1942	917	1275,50
0,005	0,015	903	891	923	522	809,75

Optymalny zakres stężenia DNA próby, ilości wsadowej DNA do reakcji multiplex PCR oraz wskaźnika RFU zaznaczono w tabeli kolorem żółtym.

Jak wynika z przedstawionego zestawienia, im wyższe stężenie próby, a tym samym większa jego ilość dodawana do reakcji multipleks PCR, tym wyższy jest wskaźnik RFU uzyskany w oparciu o rozdział elektroforetyczny.

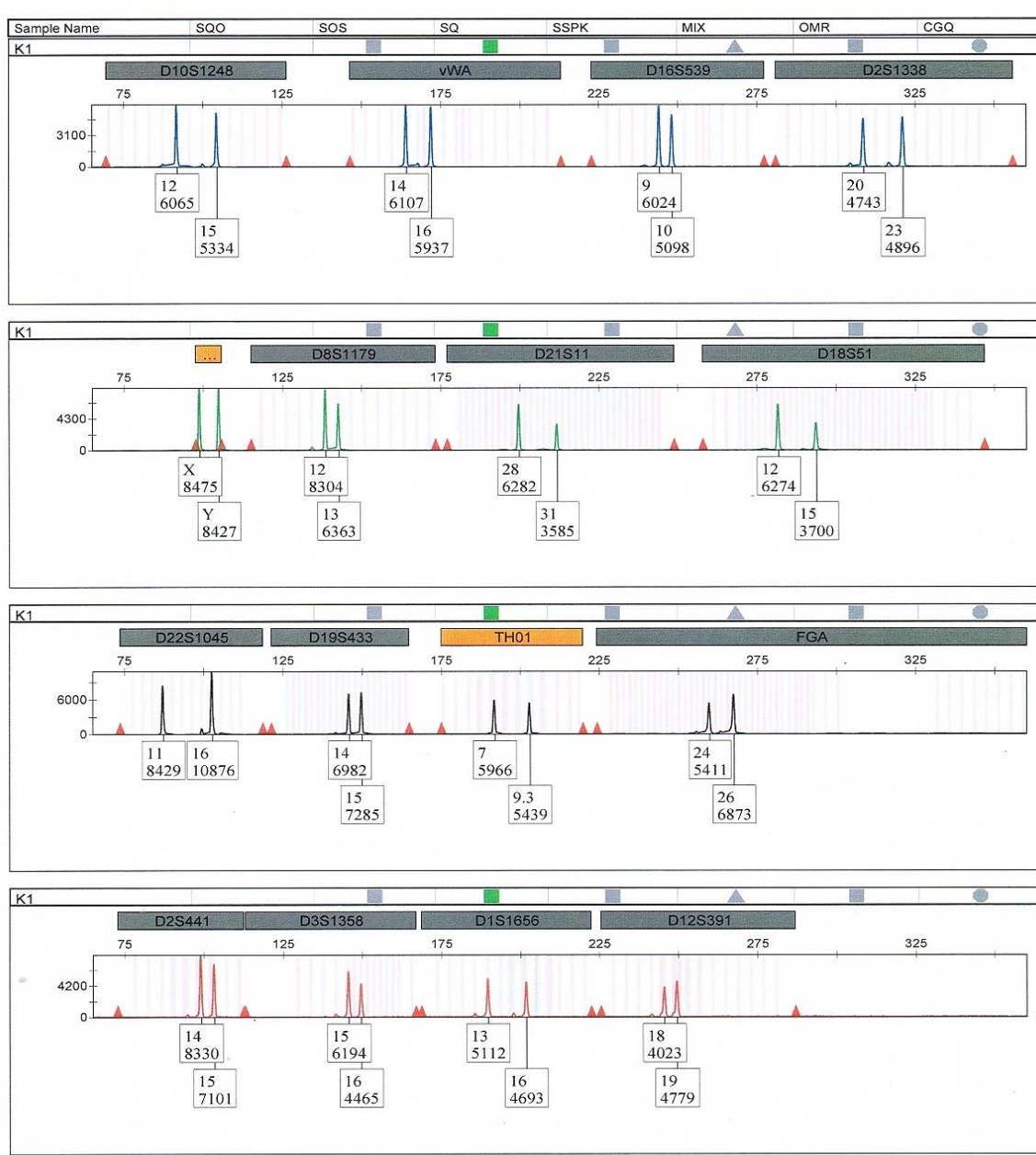
Na rycinie 8 przedstawiono wykres obrazujący zależność między ilością wsadową DNA a wartością RFU dla optymalnego zakresu stężenia DNA wynoszącego od 0,03 ng/ μ l do 0,2 ng/ μ l.



Rycina 8. Wykres zależności między ilością wsadową DNA (stężeniem DNA) użytymi do reakcji multipleks PCR, a wartością RFU dla kontroli 007 w optymalnym zakresie jej stężenia (0,03-0,2 ng/ μ l).

W zakresie optymalnego stężenia DNA próby wynoszącego od 0,03ng/ μ l do 0,2 ng/ μ l, przedstawiona na powyższym wykresie zależność między wsadową ilością DNA do reakcji multipleks PCR a wartością RFU jest bliska liniowej.

Na rycinie 9 przedstawiono pełny męski profil genetyczny, uzyskany metodą elektroforezy kapilarnej dla optymalnego zakresu stężenia DNA, dla którego nie obserwowano niepożądanych zjawisk.



Rycina 9. Pełny męski profil genetyczny w zakresie optymalnego dla tej metody stężenia DNA, uzyskany metodą elektroforezy kapilarnej.

W przypadku stężenia przekraczającego optymalny zakres, obserwowano zjawisko częściowej adenylacji oraz występowania dodatkowych pików typu stutter. Natomiast przy dużym rozcieńczeniu próby obserwowano zjawisko wypadania alleli, tzw. drop-out.

5. Omówienie wyników i dyskusja

5.1. Pomiar stężenia metodą fluorymetryczną

Za pomocą zestawu Quant-iT HS dsDNA i fluorymetru Qubit dokonano oznaczeń stężenia DNA dla 39 prób pochodzących z ekspertyz genetyczno-sądowych. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką czułość fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dla dwuniciowego DNA oraz w idealnym stopniu obrazują zasięg pomiarowy tego zestawu [19]. Zastosowanie własnej modyfikacji procedury badawczej, z użyciem pięciokrotnie mniejszej objętości próby do pomiaru, tj. 0,2 μl , pozwoliło na oznaczenie stężeń przekraczających zasięg pomiarowy tej metody ($>120 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

Wysoka selektywność zestawu Quant-iT HS dsDNA, jego tolerancja na wszelkie zanieczyszczenia, możliwość użycia małych objętości próby, a także szybkość i prostota wykonania oznaczeń sprawiają, że metoda ta jest częściej wykorzystywana do pomiaru stężenia DNA niż metoda spektrofotometryczna, oparta o pomiar absorbancji UV, dla której wyniki są mniej dokładne i mniej precyzyjne [18,32].

5.2. Ocena powtarzalności i odtwarzalności metody

Pierwszego i drugiego dnia pomiarowego, na podstawie czterokrotnego oznaczenia stężenia DNA dla każdej próby, dokonano wyliczenia wyznaczonych parametrów statystycznych, w celu określenia powtarzalności metody. Dla większości prób odchylenie standardowe oraz standardowy błąd średniej przyjmowały zerowe lub niskie wartości nieprzekraczające 0,2, które wskazują na wysoką powtarzalność wyników w zakresie pomiarowym 0,54-116,00 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Dla prób o wysokich stężeniach wyjściowych, począwszy od około 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$, obserwowano tendencję wzrostową wartości odchylenia standardowego i standardowego błędu średniej, co świadczy o spadku precyzji pomiaru. Jednakże,

te wysokie stężenia i zmniejszony stopień precyzji wykazały głównie próby, dla których zastosowano własną modyfikację procedury badawczej z użyciem do pomiaru pięciokrotnie mniejszej objętości próby, niż zaleca producent tj. 0,2 μl .

Gdy porównano ze sobą wyniki z dnia pierwszego i drugiego do oceny odtwarzalności metody stwierdzono, że wartości stężeń DNA dla prób nieprzekraczających 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ nie różniły się od siebie w sposób statystycznie znamienne. Pozwala to na stwierdzenie, że metoda wykazuje się odtwarzalnością pomiarów. Uzyskane wyniki testu Chi kwadrat wskazują na to, że jedynie dla dwóch prób (3.6 oraz 7.12) o wysokich stężeniach, odpowiednio 281,38 $\text{ng}/\mu\text{l}$ i 355,50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ istnieją statystycznie znamienne różnice w pomiarach wykonanych w pierwszym oraz drugim dniu.

Przeprowadzone pomiary stężenia DNA z użyciem fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit dowiodły, że metoda jest dobrze walidowana, a otrzymane wyniki nie budzą wątpliwości [26,31]. Proces walidacyjny potwierdził jej wysoką powtarzalność i odtwarzalność w badaniach prób z ekspertyz genetyczno-sądowych, których stężenia nie przekraczały 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Dla prób o wyższych stężeniach, rozrzut wyników fluorymetru Qubit był znaczny, co wpłynęło na mniejszą precyzję pomiarów.

Wpływ na dokładność oznaczeń fluorymetru Qubit mogła mieć także temperatura. Jej minimalne wahania mogą spowodować niewielkie zmiany intensywności fluorescencji. Dlatego też niezwykle ważne jest, aby w trakcie przeprowadzanych pomiarów utrzymać temperaturę próby zbliżoną do temperatury pokojowej [19].

5.3. Zestawienie uzyskanych wyników pomiarów prób kontrolnych z wartościami ich stężeń podanymi przez producenta

Obliczone wartości średnich stężeń i odchyłeń standardowych w oparciu o serię pomiarów przeprowadzonych w trzech kolejnych dniach wykazały, że stężenia prób kontrolnych (K1-K7) odczytane na fluorymetrze Qubit były zbliżone

do stężeń podanych dla tych prób przez producenta. Niskie wartości odchyłeń standardowych dla każdej próby potwierdziły, że uzyskane wyniki są powtarzalne i odtwarzalne.

Dodatkowo, wyniki testu Chi kwadrat dla tych kontroli nie wykazały statystycznie istotnych różnic pomiędzy porównywanymi wartościami, przy czym największe różnice w pomiarach obserwowano dla kontroli K2 i K3.

5.4. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą Real Time PCR

Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu termocyklera 7500 Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems, z wykorzystaniem zestawu Quantifiler Duo DNA Quantification Kit [1].

Dla każdej próby odczytywano wyznaczoną przez oprogramowanie wartość Ct human, a następnie obliczano stężenie DNA odpowiadające tej wartości, w oparciu o równanie wykreślonej krzywej standardowej. Na jej podstawie określono również wydajność reakcji amplifikacji, której odzwierciedleniem jest wartość nachylenia krzywej. W przypadku otrzymanej krzywej standardowej, nachylenie wynoszące - 3,224 odpowiada 100% wydajności reakcji. Pozwala to stwierdzić, że obliczone na podstawie równania krzywej stężenia DNA prób były dokładne i wiarygodne [21,29]. Dzięki temu możliwe było porównanie tak otrzymanych stężeń DNA prób kontrolnych i prób pochodzących z ekspertyz medyczno-sądowych z pomiarami uzyskanymi za pomocą fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit.

Analiza stężeń DNA dla prób kontrolnych, zmierzonych metodą fluorymetryczną i metodą Real Time PCR wykazała, że wyniki otrzymane tymi dwiema metodami nie różnią się od siebie w sposób statystycznie istotny, przy czym największe różnice w pomiarach wykazały kontrole K2 i K4 (tabela 9).

W przypadku oznaczeń prób pochodzących z ekspertyz medyczno-sądowych, analiza porównawcza pomiarów stężenia DNA metodą fluorymetryczną i metodą Real Time PCR wykazała, że dla 70% prób różnice w pomiarach stężenia DNA

między tymi dwiema metodami są nieistotne statystycznie (tabela 10). Jedynie dla 11 z 37 badanych prób (30%) otrzymana wartość prawdopodobieństwa była mniejsza od przyjętego poziomu istotności 0,05, co wskazywało na statystyczną znamienność różnic. Te duże różnice w pomiarach zauważalne były głównie dla prób o wysokich stężeniach wyjściowych, przekraczających 100 ng/μl, dla których obserwowano spadek precyzji pomiaru. Podobny wniosek wysunięto już wcześniej, kiedy to oceniano powtarzalność i odtwarzalność metody fluorymetrycznej.

5.5. Zestawienie wyników pomiarów metodą fluorymetryczną z wynikami badań uzyskanymi metodą elektroforezy kapilarnej

Na podstawie analizy detekcji kontrolnego DNA o stężeniu 2 ng/μl oraz jej rozcieńczeń, przeprowadzonej przy zastosowaniu markerów wchodzących w skład zestawu AmpFlSTR® NGM™ PCR Amplification Kit [17], stwierdzono istnienie korelacji między wsadową ilością DNA a wartością RFU.

Przy wsadowej ilości DNA wynoszącej 6 ng, maksymalna wysokość pików wynosiła 55138. Przy tak dużych wartościach RFU obserwowano występowanie niepożądanych zjawisk, m.in. częściową adenylację, źle zbalansowane allele w obrębie heterozygot oraz obecność pików typu stutter. Najniższy sygnał fluorescencji, wynoszący 522 RFU, odnotowano dla 0,015ng DNA, czyli dla około 2-3 komórek diploidalnych. Przy tak śladowej ilości DNA obserwowano zjawisko wypadania alleli.

Dlatego też, aby otrzymać czytelny i łatwy w interpretacji profil genetyczny, gdzie nie obserwuje się wyżej wymienionych niepożądanych zjawisk, konieczne jest ustalenie optymalnego zakresu stężeń próby, tj. takiego, przy którym ilość wsadowa DNA zależy od wartości RFU w sposób liniowy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że optymalny profil genetyczny uzyskuje się dla wartości wskaźnika RFU w przedziale od około 4000 do około 12000. Wskazuje to na optymalny zakres ilości wsadowej DNA do reakcji multipleks PCR wynoszący od 0,1ng do 0,6ng, co odpowiada zakresowi stężenia próby 0,03-0,2 ng/μl.

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i ich wyników, których celem było sprawdzenie przydatności zestawu Quant-iT HS DNA oraz fluorymetru Qubit do detekcji dwuniciowego DNA w badaniach genetyczno-sadowych, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Pomiar stężenia próbek DNA przeprowadzane w pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej z wykorzystaniem fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit charakteryzują się wysoką powtarzalnością w zakresie oznaczeń, tj. między 0,54 ng/μl a 116,00 ng/μl.
2. Przeprowadzone pomiary w dwóch kolejnych dniach przez dwie różne osoby za pomocą walidowanego zestawu wskazują na wysoką odtwarzalność oznaczeń fluorymetru Qubit dla próbek o zakresie stężeń 0,61 ng/μl - 112,00 ng/μl.
3. Przy stężeniach próbek przekraczających 100 ng/μl pomiar fluorescencji z zastosowaniem fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit może być nieodtwarzalny, a tym samym nieprecyzyjny.
4. Pomiar stężeń próbek kontrolnych przeprowadzone przy pomocy fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit wykazują na ich statystycznie nieznamienne różnice w stosunku do wartości podanych przez producenta.
5. Wyniki otrzymane na fluorymetrze Qubit w 70% pokrywały się z wynikami otrzymanymi alternatywną metodą Real Time PCR, a statystycznie istotne różnice pomiarów obserwowano głównie dla próbek o wysokich stężeniach, przekraczających 100 ng/μl.
6. Istnieje bliska liniowa zależność pomiędzy ilością DNA, a wartością RFU przy optymalnym zakresie ilości DNA wynoszącym od 0,1 ng do 0,6 ng (zakres stężeń 0,03-0,2 ng/μl), co wiąże się z odczytem RFU w przedziale od 4000 do 12000.

7. Streszczenie

Pomiar stężenia DNA jest kluczowym etapem w toku analizy materiału genetycznego przeprowadzanej podczas badań z zakresu genetyki medyczo-sądowej. Bardzo ważnym aspektem pomiaru stężenia DNA jest jego standaryzacja oraz poddanie procesowi walidacji.

W niniejszej pracy określono zalety i wady fluorymetru Qubit oraz powiązanego z nim zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit, służących do detekcji i pomiaru stężenia dwuniciowego DNA. W tym celu przeprowadzono proces walidacji, który pozwolił określić czułość, precyzję, dokładność oraz wiarygodność oznaczeń badanej metody. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pomiary stężenia DNA, przeprowadzane w oparciu o walidowany zestaw są powtarzalne i odtwarzalne dla prób o stężeniach nieprzekraczających 100 ng/ μ l, a zmniejszony stopień precyzji pomiaru obserwuje się dopiero powyżej tego stężenia.

Za pomocą fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit stężenia DNA prób, porównano z wynikami otrzymanymi metodą Real Time PCR oraz elektroforezy kapilarnej. Na podstawie tego zestawienia stwierdzono, że wyniki otrzymane przy użyciu badanej metody w znacznym stopniu korelowały z wynikami pozostałych dwóch metod, co świadczy o wysokiej dokładności i wiarygodności pomiarów metody fluorymetrycznej.

Oprócz zalet, które ujawnił przeprowadzony proces walidacji, metoda ta posiada także inne mocne strony, takie jak szybkość i prostota wykonania.

Wyżej wymienione wnioski świadczą o tym, że metoda oznaczania stężenia DNA za pomocą zestawu Quant-iT HS DNA i fluorymetru Qubit spełnia wszystkie warunki do tego, aby być w pełni wykorzystywana do detekcji dwuniciowego DNA w badaniach z zakresu genetyki sądowej.

8. Piśmiennictwo

1. Applied Biosystems. Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit User's Manual, 2008
2. Basgalupp S.P., Rodenbusch R., Schumacher S., Gastaldo A.Z., Silva D., Alho C.S.: Investigation of paternity with alleged father deceased or missing: Analysis of success at the end of the report. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014, 12, 120-121
3. Bond J.W.: Value of DNA evidence in detecting crime. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 128-136
4. Butler J.M.: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. Chapter 5, STR Profiles: Multiplex PCR, Tri-Alleles, Amelogenin and Partial Profiles*, 2015, 109-127
5. Butler J.M.: Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 253-265
6. Butler J.M.: Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques* 2007, 43, ii-v
7. Chih-Hui Lin, Yu-Chieh Chen, Tzu-Ming Pan. Quantification Bias Caused by Plasmid DNA Conformation in Quantitative Real-Time PCR Assay. *PLoS ONE* 6, 2011, 12, e29101
8. Duewer D.L., Butler J.M.: Multiplex_QA, an exploratory quality assessment tool for multiplexed electrophoretic assays. *Electrophoresis* 2006, 27, 3735-3746
9. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.: DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 49, 746-756
10. El-Alfy S.H., El-Hafez Abd A.F.: Paternity testing and forensic typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2012, 10, 101-112
11. Fatałska A., Czerwoniec A., Kasprzak J., Milanowska K., Philips A., Puton T.: Wprowadzenie do sekwencjonowania nowej generacji. *Acta Mygenica* 2014, 5, 20-22
12. Ferreira S., Paula K.A., Moraes A.V.: DNA typing of trace DNA recovered from different areas of sandals found at a homicide crime scene investigation: A comparative study. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2013, 4, e372-e373
13. Illumina ForenSeq DNA signature prep kit data sheet (www.illumina.com/products/forenseq-dna-signature-kit.html), 2014

14. Ip S.C.Y., Lin Sze-wah, Li Ch., Lai Kam-ming: Forensic DNA typing strategy of degraded DNA on discarded cigarette ends using the AmpF ℓ STR \circledR Identifiler \circledR , Identifiler \circledR Plus and MiniFiler $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kits. *Sci. Justice* 2014, 54, 311-315
15. Jacewicz R.: Badanie polimorfizmu DNA u osób po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy w aspekcie jego konsekwencji dla analiz z zakresu genetyki sądowej. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Rozprawa habilitacyjna 2009
16. Kidd K.K., Speed W.C., Pakstis A.J.: Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014, 10, 23-32
17. Life Technologies. AmpFISTR \circledR NGM $^{\text{TM}}$ PCR Amplification Kit. User Guide 2015, Part Number 4425511
18. Life Technologies. Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements Qubit $^{\text{TM}}$ Quantitation Platform vs. Spectrophotometer. Technical Note 2010
19. Life Technologies. Quant-iT $^{\text{TM}}$ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Instruction Manual 2015
20. Life Technologies. Quant-iT $^{\text{TM}}$ RNA Assay Kit. Instruction Manual 2015
21. Liu L., Li Y., Li S.: Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012
22. Malkoc E., Neuteboom W.: The current status of forensic science laboratory accreditation in Europe. *Forensic Sci. Int.* 2007, 167, 121-126
23. Mirowska A., Pawłowski R.: Determination of nuclear DNA concentration using Real Time PCR technique. *Problems of Forensic Sciences* 2006, 351–361
24. Moretti T.R., Baumstark A.L., Defenbaugh D.A., Keys K.M., Smerick J.B., Budowle B.: Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J. Forensic Sci.* 2001, 46, 647–660
25. Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990, 262, 56–65
26. Rajda A.: Proces walidacji metody pomiarowej jako przykład zastosowania statystycznej kontroli jakości z zastosowaniem pakietu Statistica. *Zastosowania metod statystycznych w badaniach naukowych IV.* StatSoft Polska 2012.
27. Senge T., Madea B., Junge A., Rothschild M.A., Schneider P.M.: STRs, mini STRs and SNPs- A comparative study for typing degraded DNA. *Legal Med.* 2011, 13, 68-74
28. Shendure J., Hanlee J.: Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008, 26, 1135 – 1145

29. Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 1 2008, 71-85
30. Szczutkowski M.: Walidacja metod badawczych w laboratorium akredytowanym. Część I. Podstawy zagadnienia. *Inżynieria i aparatura chemiczna* 2009, 2, 131-132
31. Szmaj Z.S., Lipiec T.: *Chemia analityczna z elementami analizy instrumentalnej*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1998, 339-345
32. Teare J.M., Islam R., Flanagan R., Gallagher S., Davies M.G., Grabau C.: Measurement of Nucleic Acid Concentrations Using the DyNA Quant and the GeneQuant. *BioTechniques* 1997, 22, 1170-1174
33. Wilson Wilde L.M., Brandi J., Gutowski J.S.: The future of forensic science standards. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2011, 3, e333-e334
34. Wong M.L., Medrano J.F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005, 39, 75-85

9. Spis tabel i rycin

Spis tabel:

Tabela 1.	Zakresy pomiarowe zestawów służących do fluorescencyjnej detekcji DNA, RNA i białek z zastosowaniem fluorymetru Qubit.....	13
Tabela 2.	Charakterystyka markerów wchodzących w skład zestawu AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit i fluorochromów użytych do ich detekcji.....	26
Tabela 3.	Stężenia DNA i parametry statystyczne służące do oceny powtarzalności metody fluorymetrycznej uzyskane pierwszego dnia pomiarowego....	28
Tabela 4.	Stężenia DNA i parametry statystyczne służące do oceny powtarzalności metody fluorymetrycznej uzyskane drugiego dnia pomiarowego.....	29
Tabela 5.	Zestawienie uzyskanego w dwóch dniach pomiarowych stężenia DNA do oceny odtwarzalności metody fluorymetrycznej.....	30
Tabela 6.	Porównanie stężeń prób kontrolnych DNA oznaczonych na fluorymetrze Qubit ze stężeniami podanymi przez producenta.....	31
Tabela 7.	Seria pomiarów stężeń prób kontrolnych przeprowadzonych w trakcie kolejnych trzech dni z wykorzystaniem fluorymetru Qubit i zestawu Quant-iT HS dsDNA Kit.....	33

Tabela 8.	Zestawienie stężeń standardu wraz z odpowiadającymi im wartościami Ct human, na podstawie których wykreślono krzywą standardową.....	34
Tabela 9.	Wyniki pomiarów stężeń DNA kontroli uzyskane metodą walidowaną i metodą Real Time.....	36
Tabela 10.	Wyniki pomiarów stężenia DNA prób uzyskane metodą walidowaną i metodą Real Time.....	37
Tabela 11.	Stężenie DNA, ilość wsadowa DNA do reakcji multipleks PCR oraz odpowiadające im wartości wskaźnika RFU dla kontrolnego DNA 007.....	38

Spis rycin:

Rycina 1.	Dokładność pomiarów fluorymetru Qubit i spektrofotometru UV przedstawiona jako zależność błędu pomiaru od rzeczywistego stężenia próbki.....	11
Rycina 2.	Porównanie zakresu stężeń prób wyjściowych, zmierzonych w oparciu o pomiar fluorymetryczny i spektrofotometryczny.....	12
Rycina 3.	Wpływ temperatury na różnice w odczycie pomiarów przez fluorymetru Qubit.....	15
Rycina 4.	Pomiary przeprowadzane za pomocą zestawu Quant-iT HS dsDNA Assay i fluorymetru Qubit, stanowiącego wyposażenie Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej (ZMS UM Łódź).....	20
Rycina 5.	Schemat postępowania pomiarowego z użyciem zestawu Quant-iT HS DNA Kit.....	20
Rycina 6.	Termocykler 7500 Real-Time PCR System, stanowiący wyposażenie Pracowni Genetyki Medycznej i Sądowej (ZMS UM Łódź).....	24
Rycina 7.	Wykres zależności krzywej standardowej zależności stężenia DNA od wartości Ct.....	35
Rycina 8.	Wykres zależności między ilością wsadową DNA (stężeniem DNA) użytymi do reakcji multipleks PCR, a wartością RFU dla kontroli 007 w optymalnym zakresie jej stężenia (0,03 - 0,2g/μl).....	39
Rycina 9.	Pełny męski profil genetyczny w zakresie optymalnego dla tej metody stężenia DNA, uzyskany metodą elektroforezy kapilarnej.....	40

O Ś W I A D C Z E N I E

Ja niżej podpisana

Katarzyna Szymańska

studentka Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego
w Łodzi

oświadczam, że przedkładaną pracę magisterską pt.

**Walidacja zestawu Quant-iT HS DNA i fluorymetru Qubit do detekcji
dwuniciowego DNA w aspekcie genetyczno- sądowym.**

**Validation of Quant-iT HS and Qubit fluorimeter set to detection of
dsDNA in forensic genetics practice**

przygotowaną pod kierunkiem dr hab. n. med. Renaty Jacewicz

napisałam samodzielnie.

Oznacza to, że przy pisaniu pracy, poza niezbędnymi konsultacjami, nie korzystałam z pomocy innych osób, a w szczególności nie zlecałam opracowania rozprawy lub jej istotnych części innym osobom, ani też nie odpisywałam tej rozprawy lub jej istotnych części od innych osób.

Pracę opracowano zgodnie z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych
(t.j. Dz.U. 2006 nr 90 poz. 631 ze zm.)

*Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się
nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.*

Łódź, dnia.....

.....
Podpis magistranta