

PERSONAL IDENTIFICATION BASED ON NUCLEAR DNA EXTRACTED FROM BONES OF DECEASED INDIVIDUALS

Ewa KAPIŃSKA, Zofia SZCZERKOWSKA

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk

ABSTRACT: Personal identification with the use of skeletal remains (bones) is one of the most important analyses in forensic medicine. The environment to which the material has been exposed (high temperature, sea and river water or dry air) has a crucial influence on the success of the investigation. We examined bones obtained from bodies that had been partially or completely decomposed and partially burned. In this paper we describe an evaluation of four different DNA extraction methods: phenol-chloroform, silica, sodium acetate and the DNA IQ™ System (Promega). The extracts were purified and concentrated in Microcon 30/100. DNA was quantified and profiled by AmpFlSTR®Identifiler™ or AmpFlSTR®SEfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems). In all cases, full profiles were obtained after phenol-chloroform extraction. DNA isolation using silica and a commercial kit (Promega) gave a full STR genotype only in the case of the burned body and partially after amplification of DNA from the unburied corpse (exposed to dry air). However, no positive signals of PCR products were observed from bodies submerged in water. No good results of amplification were obtained after sodium acetate extraction of DNA from bones.

KEY WORDS: Bones; DNA extraction; Personal identification; AmpFlSTR®Identifiler™; AmpFlSTR®SEfiler™.

Problems of Forensic Sciences, vol. LX, 2004, 104–116

Received 24 November 2004; accepted 30 December 2004

INTRODUCTION

Determination of genetic profiles based on examination of samples collected from deceased individuals of unknown identity is one of the routine tests performed in laboratories of legal medicine. The time and place of finding of the body and degree of its decomposition determine the choice of biological material for DNA extraction. Advanced decay of soft tissues, complete skeletonisation or charring of the examined corpse mean that the only source of DNA may be bones, teeth or nails of the deceased. This is because the hard tissues are significantly resistant to autolysis and decay caused by environmental factors. Light, humidity, high or low temperature, dry air

and water are factors which can influence the degree of *post-mortem* changes and quality of the DNA extracted from affected tissues [6]. Bacteria, fungi, necrophages and organic substances released in a body constitute additional factors that contaminate and are conducive to degradation of genetic material as well as inhibiting amplification.

The process of genetic identification based on these kinds of specimens containing heavily degraded DNA usually relies on analysis of microsatellite loci – STRs. In order to reduce the volume of extracted template DNA that is necessary for determination of a complete genetic profile of the deceased, it is beneficial to apply a multiplex amplification procedure enabling simultaneous detection of several loci.

The present paper summarises experiences in determination of DNA profiles from human remains of unknown identity and different degrees of *post-mortem* changes. Bone samples were collected from remains subjected to unfavourable environmental factors: high temperature, moisture (fresh or sea water) and dry air. Four different methods were applied to DNA isolation. The purpose of this research was to evaluate the influence of the above factors on the efficiency of DNA extraction with these four methods and assess the quality of the ensuing DNA amplification.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The examined material consisted of thigh and humeral bone parts, which were subjected to DNA extraction. Specimens were collected from the following human remains:

- the remains of a woman who had perished in a fire. Her body was found significantly charred and deprived of coverings;
- the dead body of a man found significantly decayed and devoid of soft tissues and coverings. A green substance associated with feeding insects was noted in some areas of the corpse. The body was discovered in a marina;
- the dead body of a man found in an advanced state of decay and explicit saponification characteristic of bodies submerged in water (a river) for a long period of time;
- the dead body of a man in an advanced state of decay, whose unburied corpse was subjected to the influence of dry air.

DNA extraction

DNA was extracted from bone samples which had been subjected to preliminary processing and sawing. The obtained bone powder was used for genetic analysis. DNA isolation was carried out in conditions of extreme sterility. A strict regime of sterility was applied to rooms, protective clothes, surfaces, laboratory instruments and equipment as well as buffers and solutions used for extraction and amplification of genetic material [9, 11].

Four DNA extraction methods were utilised in the studies: standard phenol-chloroform [16], the acetate method [4], the silica based extraction method according to the method described by Höss and Pääbo [3,8], and the DNA IQ™ System commercial kit by Promega [13, 16]. Approximately 1 g of bone powder was used for each extraction. The extracted DNA was purified and concentrated using Microcon 30.100 columns (Millipore) and then DNA concentration was determined with the fluorometric method (Pico Green® dsDNA Quantitation Kit) [10]. In one case, the amount of human DNA was measured with AluQuant™ Human DNA Quantitation System [12].

Amplification and detection of PCR products

1–2.5 ng of the extracted DNA was subjected to amplification carried out in a total volume of 10 µl reaction mixture. The genetic data was generated with one of two commercial multiplex PCR kits developed by Applied Biosystems: AmpFISTR® SEfiler™ – for simultaneous amplification of 12 human DNA loci, including the amelogenine locus (D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, AMGXY, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA, D21S11, D18S51) or AmpFISTR® Identifier™ – for simultaneous analysis of 15 autosomal loci and gender marker (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, AMGXY).

PCR conditions were in accordance with manufacturers' recommendations. PCR reactions were carried out in a Mastercycler-Gradient thermocycler (Eppendorf). The PCR products were separated with capillary electrophoresis on an ABI Prism 310 genetic analyser (Applied Biosystems). The obtained results were analysed using GeneScan and (or) Genotyper software [1, 2].

RESULTS

The applied DNA isolation methods enabled extraction of different amounts of DNA, depending on the degree of decomposition of the analysed

human remains and environmental factors acting on them. Results of extractions and amplifications are summarised in Table I.

TABLE I. EFFICIENCY OF EXTRACTION AND AMPLIFICATION OF DNA ISOLATED FROM BONE MATERIAL WITH FOUR DIFFERENT METHODS

External conditions/ Condition of the body	Extraction method	DNA concentration [ng]	Result of amplification
High temperature/ charring	Phenol-chloroform	95	+
	Acetate	(-)	-
	DNA IQ System	50	+
	Silica based	40	+
Sea water/ decomposition	Phenol-chloroform	150	+
	Acetate	(-)	-
	DNA IQ System	70	+/-
	Silica based	3	-
Fresh water/ decomposition	Phenol-chloroform	35	+
	Acetate	(-)	-
	DNA IQ System	90	-
	Silica based	(-)	-
Dry air/ decomposition	Phenol-chloroform	212	+
	Acetate	(-)	-
	DNA IQ System	29	+
	Silica based	7	+

(-) background level (blank) of the fluorimetric measurement; + positive amplification; - lack of amplification; +/- incomplete amplification (positive effect for 5 out of 12 analysed loci).

In the case of bone samples collected from the body exposed to a high temperature (fire), the most effective DNA extraction method turned out to be the standard phenol-chloroform technique. Only about half the amount of the previous method was obtained using the commercial DNA IQ™ System (Promega) and the silica based method. DNA extraction with the acetate method was not effective enough to gain an adequate amount of DNA. The measurement of the total DNA amount with the fluorimetric method revealed the background level (blank) of the DNA concentration in this case.

The genetic profile of an unknown woman was established with the AmpFISTR® Identifiler™ kit in samples extracted using the phenol-chloroform method, DNA IQ System and silica based method, giving positive results for all 16 amplified loci. Amplification of the acetate extracted sample

gave a negative result. The genetic profile of the unknown woman, who died in a fire, is presented in Figure 1.

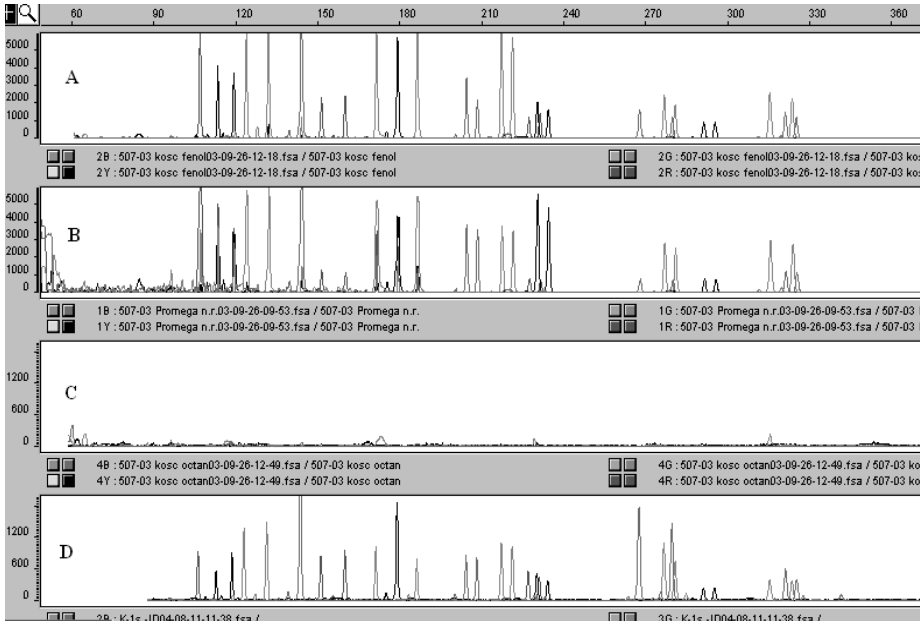


Fig. 1. Genetic profile of a woman who died in a fire determined by amplification of DNA samples extracted with the following methods: A – phenol-chloroform, B – commercial kit DNA IQ System™, C – acetate, D – silica based. Amplifications performed with AmpFlSTR® Identifier™.

Phenol-chloroform was the only method which enabled positive determination of the genetic profiles of two males whose bones were collected from bodies found in an advanced state of decay with characteristic signs of long exposure to fresh or sea water. DNA isolation with Promega's DNA IQ System, in spite of yielding a relatively large amount of DNA, did not generate full genetic profiles in these cases. DNA extracted from bone sample subjected to the negative influence of sea water yielded a positive result of amplification for the shortest DNA fragments of length below 200 bp, limited to five out of the 12 analysed loci. No amplification was noted for a DNA sample extracted from the body found in fresh water. Trace amounts of DNA or a complete lack of genetic material were extracted from bone samples of deceased persons found in fresh or sea water using silica based and acetate methods. In both these cases, a negative amplification signal was obtained.

Figure 2 presents a genetic profile determined in a sample collected from the body that remained in sea water for a long time. Analysis was performed with AmpFlSTR® SEfiler™ (Applied Biosystems). Figure 3 presents profil-

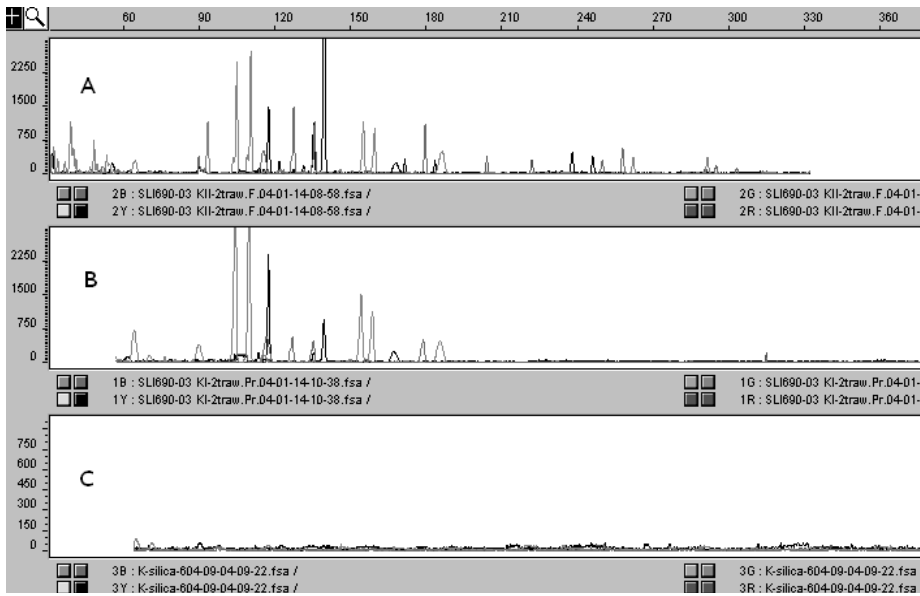


Fig. 2. DNA profile obtained by analysis of bone sample collected from a body found in sea water (AmpFISTR®SEfiler™). DNA extraction with the following methods: A – phenol-chloroform, B – commercial kit DNA IQ System™, C – silica based.

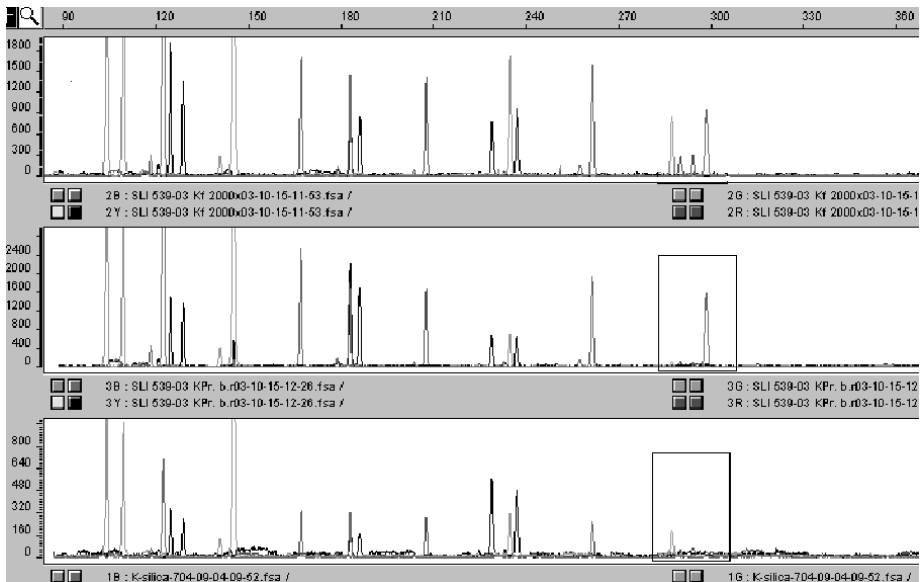


Fig. 3. DNA profile obtained by analysis of bone sample collected from a body affected by dry air (AmpFISTR®SEfiler™). DNA extraction with the following methods: A – phenol-chloroform, B – commercial kit DNA IQ System™, C – silica based.

ing results obtained for a DNA sample extracted from the unburied body subjected to the influence of dry air. The genetic profile was determined using AmpFlSTR®SEfiler™. The template DNA that gave positive PCR results was isolated with three different methods: phenol-chloroform, silica based and the commercial DNA IQ System. As in previous cases, the best result was obtained for the first of the above extraction methods. For samples extracted with the latter two methods, difficulties in interpretation of results generated for DNA fragments of length above 270 bp were noted (Figure 3, marked with a rectangle). Hence, unambiguous determination of alleles for D2S1338, SE33 and D18S51 genetic systems was not possible. The threshold value for allele determination in performed analyses was set at 150 RFU (relative fluorescence units). As in previously described cases, acetate extraction failed.

DISCUSSION

The obtained results confirmed that various difficulties with genetic profiling should be expected when examining bone samples affected by environmental factors e.g. high temperature, humidity or dry air [7].

High temperature or dry air acting on a dead body delay, reduce or even completely eliminate its decomposition – their influence can downregulate the amount of substances degrading DNA (depurination) and inhibiting the process of PCR amplification. In such cases, even trace amounts of clean and not very degraded DNA enable multiplex amplification and determination of a genetic profile of the deceased [11, 14].

The environment of a lack of air and presence of anaerobic bacteria affecting a dead body during a long period submerged under water lead to decay of tissues and saponification. Substances that are generated in these conditions are known inhibitors of the PCR reaction [5, 14].

The conducted study showed that regardless of environmental conditions affecting a body and degree of its decomposition, the most effective DNA extraction technique was the phenol-chloroform method and, hence, despite its relatively high toxicity, it is highly recommended. In each examined case of analysis of human remains, application of this method enabled effective amplification and generation of full genetic profiles.

Positive PCR amplification associated with low background contamination was also noted for template DNA extracted with DNA IQ™ System (Promega) as well as the silica based method. Difficulties appeared in the case of heavily degraded and very contaminated material. Too short DNA fragments were not absorbed by the silica deposit. As a result, the efficiency of DNA isolation was decreased and difficulties with obtaining an appropri-

ate PCR signal were noted [3, 13]. The low number of long template DNA fragments in extracted samples negatively influenced the efficiency of the PCR reaction and this effect was visible on electropherograms, which revealed a weak amplification signal (peaks below 150 RFU) or a lack of signal [18].

It should also be emphasised that genetic material extracted from human remains can consist of a mixture of human DNA and other undesirable components such as DNA of bacteria, fungi and other kinds of contaminants that are inhibitors of the PCR reaction. This means that isolation of relatively high amounts of total DNA from bone material can not ensure positive determination of a genetic profile. In these cases, the efficiency and reliability of amplification can be affected by an insufficient amount of target human DNA and ensuing generation of artefacts (e.g. allelic drop-out). PCR can also be completely inhibited by the action of inhibitors [5, 11, 15, 17]. Problems linked to the PCR reaction ensuing from significant degradation of genetic material and its insufficient concentration can be overcome by increased input of template DNA [1, 2, 11].

The acetate method of DNA extraction yielded definitely negative results in our study. Application of this extraction method did not give positive results of PCR in any of the described cases. In samples extracted with the acetate method, the DNA concentration was measured using the fluorimetric method and the AluQuantTM Human DNA Quantitation System. Both methods revealed a lack of DNA in the analysed samples.

Results of genetic examinations must be reproducible. Bearing in mind the type of biological material (bone specimens in cases described in this work), it is strongly advisable to apply, e.g. two different DNA extraction methods or two independent amplifications for every DNA extract. Repeated generation of the same results ensures a correct conclusion regarding genetic profiles of unknown individuals [11, 17]. Based on the experiments described in the present paper, the optimal method of DNA extraction is the phenol-chloroform method and therefore this technique should be considered as the method of choice for identification studies when examining bone material.

References:

1. Applied Biosystems: User's Manual, AmpFlSTR® IdentifierTM PCR Amplification Kit, 2001.
2. Applied Biosystems: User's Manual, AmpFlSTR® SEfilerTM PCR Amplification Kit, 2001, 2002.
3. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M. [et al.], Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *Journal of Clinical Microbiology* 1990, vol. 28, pp. 495–503.

4. Cattaneo C., Smillie D. M., Gelsthorpe K. [et al.], A simple method for extracting DNA from old skeletal material, *Forensic Science International* 1995, vol. 74, pp. 167–174.
5. Golenberg E. M., Bickel A., Weihs P., Effect of highly fragmented DNA on PCR, *Nucleic Acids Research* 1996, vol. 24, pp. 5026–5033.
6. Graw M., Weisser H. J., Lutz S., DNA typing of human remains in damp environments, *Forensic Science International* 2000, vol. 113, pp. 91–95.
7. Hoff-Olsen P., Mevag B., Staalstrøm E., [et al.], Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing, *Forensic Science International* 1999, vol. 105, pp. 171–183.
8. Höss M., Pääbo S., DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Research* 1993, vol. 21, pp. 3912–3914.
9. Kalmar T., Bachrati Z. C., Marcsik A. [et al.], A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Nucleic Acids Research* 2000, vol. 28, pp. e 67.
10. Molecular Probes, Inc.: PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent and Kits, 2003.
11. Promega Corporation: Alonso A. [et al.], DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, Feature Article Introduction Profiles in DNA, July 2001, pp. 3–8.
12. Promega Corporation: AluQuant™ Human DNA Quantitation System, 2001, 2002.
13. Promega Corporation: Bone Extraction Protocol to be used with the DNA IQ™ System, 2002.
14. Raszeja S., Nasiłowski W., Markiewicz J., Medycyna sądowa. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1990.
15. Ruano G., Pagliaro T., Lamy K. [et al.], Heat-Soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis, *Bio-Techniques* 1992, vol. 13, pp. 266–274.
16. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
17. Schmerer W. M., Hummel S., Hermann B., Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target, *Electrophoresis* 1999, vol. 20, pp. 1712–1716.
18. Whitaker J., Clayton T., Urquhart A. [et al.], Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: High success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples, *BioTechniques* 1995, vol. 18, pp. 670–677.

IDENTYFIKACJA OSOBNICZA W OPARCIU O JĄDROWY DNA WYIZOLOWANY Z KOŚCI DENATÓW

Ewa KAPİŃSKA, Zofia SZCZERKOWSKA

WSTĘP

Określanie profili genetycznych zmarłych osób o nieznannej tożsamości stanowi jedno z rutynowych badań przeprowadzanych w zakładach medycyny sądowej. Czas i miejsce ujawnienia zwłok oraz stopień zaawansowania ich rozkładu determinuje wybór materiału biologicznego, z którego izoluje się DNA. Daleko posunięty rozkład gnilny tkanek miękkich, całkowite zeszkieletowanie lub zwęglenie ciała powoduje, że jedynym jego źródłem mogą być kości, zęby lub paznokcie denata. Są to tkanki twarde, w znacznym stopniu odporne na autolizę i procesy gnilne zależne od warunków środowiska. Światło, wilgotność, wysoka lub niska temperatura, suche powietrze i woda są czynnikami mogącymi wpływać na stopień zaawansowania zmian pośmiertnych, a także na jakość DNA izolowanego z tkanek poddanych ich działaniu [6]. Bakterie, grzyby, nekrofagi i uwalniające się w ciele denata substancje organiczne stanowią dodatkowe czynniki zanieczyszczające i degradujące materiał genetyczny oraz hamujące reakcję amplifikacji.

Do identyfikacji osobniczej tego rodzaju materiału biologicznego nawet ze znacznie zdegradowanym DNA wykorzystuje się zazwyczaj mikrosatelitarne *loci* – STR (ang. short tandem repeats). W celu ograniczenia ilości matrycowego DNA niezbędnego do ustalenia pełnego profilu genetycznego denatów korzystniejsze jest zastosowanie kompleksowej reakcji amplifikacji z równoczesną detekcją kilku lub kilkunastu *loci*.

W niniejszej pracy określono profile DNA zmarłych osób o nieznannej tożsamości, których zwłoki wykazywały różny stopień przemian pośmiertnych. Materiał biologiczny w postaci kości został pobrany ze zwłok poddawanych działaniu niekorzystnych czynników zewnętrznych: wysokiej temperatury, wilgotności (woda słodka lub słona) oraz suchego powietrza. Do izolacji DNA zastosowano 4 różne metody. Celem badań było ustalenie wpływu wspomnianych warunków na ilość DNA wyizolowanego różnymi metodami i jakość jego amplifikacji.

MATERIAŁY I METODY

Materiał biologiczny

Badaniom poddano fragmenty kości udowej i ramiennej, z których izolowano DNA. Pobrano je ze zwłok:

- kobiety, która zginęła w pożarze, a jej ciało było w znacznym stopniu zwęglone i pozbawione powłok zewnętrznych;
- mężczyzny, którego zwłoki znajdowały się w stanie zaawansowanego rozkładu gnilnego z rozległymi ubytkami tkanek miękkich i powłok zewnętrznych.

Miejscami występowała zielonkawa masa z żerującymi larwami owadów. Zwłoki ujawniono w morskiej przystani jachtowej;

- mężczyzny, którego ciało znajdowało się w zaawansowanym stadium rozkładu z widocznym przeobrażeniem tłuszczowo-woskowym charakterystycznym dla zwłok długo zanurzonych w wodzie (rzeka);
- mężczyzny w zaawansowanym stanie rozkładu gnilnego, którego nieopogrzebane ciało poddane było działaniu suchego powietrza.

Izolacja DNA

DNA izolowano z kości poddanych obróbce wstępnej i spiłowaniu. Do badań wykorzystano proszek kostny. Izolacja DNA przebiegała w warunkach maksymalnej sterylności. Ścisły reżim dotyczył jałowości pomieszczeń, ubrań ochronnych, powierzchni, narzędzi i sprzętu laboratoryjnego oraz roztworów i buforów używanych do ekstrakcji oraz amplifikacji materiału genetycznego [9, 11].

W badaniach zastosowano 4 metody izolacji DNA: klasyczną fenolowo-chloroformową [16], metodę octanową [4], izolację z zastosowaniem złoża krzemionkowego wg metody opisanej przez Hössa i Pääbo [3, 8] oraz zestaw komercyjny DNA IQ™ System firmy Promega [13, 16]. Do każdej z nich użyto około 1 g sproszkowanej kości. Po oczyszczeniu i zagęszczeniu DNA na kolumnkach Microcon 30/100 (firmy Millipore) określano jego stężenie metodą fluorometryczną (Pico Green® dsDNA Quantitation Kit) [10], w jednym przypadku oceniono również ilość ludzkiego DNA przy użyciu zestawu AluQuant™ Human DNA Quantitation System [12].

Amplifikacja i detekcja produktów PCR

Amplifikacji poddawano 1–2,5 ng wyizolowanego DNA w 10 µl mieszaniny reakcyjnej. Do genotypowania wykorzystywano zamienne dwa komercyjne zestawy do kompleksowej reakcji PCR firmy Applied Biosystems: AmpF/STR®SEfiler™ określający 12 *loci* ludzkiego DNA, w tym locus almelogeniny (D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, AMGXY, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA, D21S11, D18S51) lub AmpF/STR®Identifiler™, analizujący 15 autosomalnych *loci* i marker płci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433 VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, AMGXY).

Warunki reakcji PCR były zgodne z protokołem producenta. Reakcję amplifikacji przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler-Gradient (firmy Eppendorf). Uzyskane produkty rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310 firmy Applied Biosystems. Analizę wyników przeprowadzano w programie GeneScan lub (i) Genotyper [1, 2].

WYNIKI

Zastosowane w pracy metody izolacji pozwoliły na uzyskanie różnych ilości DNA, w zależności od stanu zwłok i działających na nie czynników zewnętrznych. Rezultaty ekstrakcji i amplifikacji przedstawiono w tabeli I.

W przypadku ekstrakcji DNA z kości pobranych ze zwłok narażonych na działanie wysokiej temperatury (pożar) najbardziej wydajną metodą izolacji okazała się klasyczna metoda fenolowo-chloroformowa. Około połowę mniej DNA uzyskano przy

zastosowaniu komercyjnego zestawu DNA IQ™ System (Promega) i metody ze złożem krzemionkowym. Ekstrakcją octanową nie udało się uzyskać odpowiedniej ilości DNA. Wartość pomiaru fluorometrycznego, określająca całkowitą ilość wyizolowanego DNA, była w tym badaniu równa wartości tła (blank).

Profil genetyczny nieznaney kobiety ustalony w oparciu o zestaw AmpF/STR® Identifier™ umożliwił pozytywną detekcję wszystkich alleli szesnastu *loci* zarówno w przypadku stosowania metody fenolowo-chloroformowej, zestawu firmy Promega, jak i metody ze złożem krzemionkowym. Amplifikacja DNA uzyskanego po ekstrakcji octanowej nie dała pozytywnego sygnału. Polimorfizm DNA nieznaney kobiety, która zginęła w pożarze, przedstawiono na rycinie 1.

Z kości zwłok nieznaneych mężczyzn znajdujących się w stadium daleko posuniętego rozkładu gnilnego z widocznymi oznakami długotrwałego przebywania w wodzie zarówno słonej, jak i słodkiej, pełne profile genetyczne denatów określono wyłącznie w oparciu o amplifikację DNA wyizolowanego metodą fenolowo-chloroformową. W przypadku stosowania zestawu firmy Promega, mimo otrzymania stosunkowo dużej ilości DNA, w analizowanych sprawach nie obserwowano jednak pełnej amplifikacji. W DNA kości znajdujących się w wodzie słonej określono tylko allele pięciu z 12 analizowanych *loci*, a amplifikacja obejmowała jedynie krótkie fragmenty poniżej 200 pz. W przypadku zwłok przebywających w wodzie słodkiej nie uzyskano w ogóle pozytywnego sygnału amplifikacyjnego. Śladowe ilości DNA lub jego brak wykazano w kościach denatów przebywających w wodzie słonej i słodkiej przy zastosowaniu metody ze złożem krzemionkowym i ekstrakcji metodą octanową. W obu przypadkach nie obserwowano pozytywnych sygnałów amplifikacji.

Polimorfizm DNA zwłok długo przebywających w wodzie słonej przedstawiono na rycinie 2. Analizę przeprowadzono w oparciu o zestaw AmpF/STR® SEfiler™ (Applied Biosystems).

Wyniki badań DNA wyizolowanego z niepogrzebanych zwłok narażonych na działanie suchego powietrza przedstawiono na rycinie 3. Profil genetyczny denata określono przy użyciu zestawu AmpF/STR® SEfiler™. DNA z kości wyekstrahowano trzema metodami: fenolowo-chloroformową, ze złożem krzemionkowym oraz zestawem komercyjnym DNA IQ™ System. Podobnie jak uprzednio, najlepsze wyniki uzyskano pierwszą z metod. W przypadku stosowania dwóch pozostałych pojawiły się trudności interpretacyjne w ocenie fragmentów powyżej 270 pz (na rycinie 3 zaznaczono je prostokątem). Nie udało się jednoznacznie określić alleli systemów D2S1338, SE33 i D18S51. Za wartość progową obecności allela w analizowanych elektroforegramach przyjęto wartość powyżej 150 RFU (ang. relative fluorescent units). Ekstrakcja octanowa, podobnie jak w poprzednich przypadkach, nie dała pozytywnych rezultatów.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że w przypadkach, gdy materiał kostny poddany jest działaniu niekorzystnych czynników zewnętrznych, np. wysokiej temperatury, wilgotności czy suchego powietrza, mogą pojawić się różnego rodzaju trudności z określaniem profilu DNA [7].

Oddziałująca na zwłoki wysoka temperatura lub suche powietrze są czynnikami ograniczającymi lub eliminującymi etapy rozkładu ciała – zmniejsza się wówczas

ilość substancji degradujących DNA (depurynacja DNA) i hamujących reakcję jego amplifikacji. W warunkach tych uzyskanie nawet śladowych ilości czystego i niezbyt zdegradowanego DNA umożliwi przeprowadzenie kompleksowej amplifikacji i ustalenie profilu genetycznego denata [11, 14].

W przypadku zwłok długo zanurzonych w wodzie, przy braku dostępu powietrza i obecności bakterii beztlenowych, dochodzi do rozkładu tkanek (gnicia) i ich przeobrażenia tłuszczowo-woskowego. Substancje powstające w toku tych przemian stanowią inhibitory reakcji PCR [5, 14].

Przeprowadzone badania wykazały, że niezależnie od warunków zewnętrznych oddziałujących na zwłoki oraz stopnia ich rozkładu, najlepszą z wyboru metodą izolacji DNA była metoda fenolowo-chloroformowa, mimo jej stosunkowo dużej toksyczności. W każdym analizowanym przypadku uzyskano silny sygnał amplifikacyjny pozwalający na określenie pełnego profilu genetycznego denatów.

Pozytywny sygnał amplifikacyjny z niskim tłem zanieczyszczeń otrzymano również z DNA wyizolowanego zestawem DNA IQ™ System firmy Promega, jak i metodą ze złożem krzemionkowym. Trudności pojawiły się w przypadku materiału wysoce zdegradowanego i silnie zanieczyszczonego. Zbyt małe fragmenty DNA nie były absorbowane przez złożo. Spadała wówczas wydajność izolacji i pojawiały się problemy z uzyskaniem prawidłowego sygnału amplifikacji [3, 13]. Niewielka ilość długich fragmentów DNA obecna w wyizolowanym materiale powodowała, że w mieszaninie poamplifikacyjnej uzyskiwano również mniejszą liczbę ich kopii. W efekcie w obrazie elektroforetycznym obserwowano niski sygnał amplifikacyjny (piki poniżej 150 RFU) lub jego brak [18].

Należy przy tym podkreślić, że wyizolowany ze zwłok materiał genetyczny może stanowić mieszaninę ludzkiego i bakteryjnego DNA, DNA grzybów oraz różnego rodzaju zanieczyszczeń będących inhibitorami reakcji PCR. W związku z powyższym uzyskanie stosunkowo dużej ilości DNA nie gwarantuje określenia właściwego profilu genetycznego denata. Amplifikacja może być bowiem zafalszowana przez obecność w mieszaninie reakcyjnej zbyt małej ilości ludzkiego DNA (zjawisko *drop-out*, artefakty) lub całkowicie zahamowana przez obecne w nim inhibitory [5, 11, 15, 17]. Degradacja materiału genetycznego oraz niewielka jego ilość powoduje w każdym przypadku konieczność dodania do reakcji PCR większej ilości DNA [1, 2, 11].

Izolacja DNA metodą octanową dawała zdecydowanie negatywne wyniki. W żadnym z omówionych przypadków, do badania którego wykorzystano ww. ekstrakcję, nie udało się uzyskać pozytywnych amplifikacji. Stężenie DNA w ekstrakcie określono metodą fluorometryczną oraz zestawem AluQuant™ Human DNA Quantitation System. W obu pomiarach uzyskano wyniki wskazujące na brak DNA w analizowanych próbach.

Wyniki badań genetycznych powinny być bezwzględnie powtarzalne. Mając na uwadze rodzaj materiału biologicznego (w opisywanych tu przypadkach kości) konieczne jest stosowanie np. dwóch różnych metod izolacji DNA lub przeprowadzenie dwóch niezależnych amplifikacji uzyskanego ekstraktu DNA. Uzyskanie identycznych wyników pozwala na prawidłowe wnioskowanie odnośnie do profili genetycznych nieznanymi osobami [11, 17]. W opisanych tu pracach badawczych najbardziej optymalną metodą izolacji okazała się ekstrakcja fenolowo-chloroformowa i ona w pierwszej kolejności powinna być wykorzystywana w badaniach identyfikacyjnych prowadzonych w oparciu o materiał kostny.