Wybrane parametry walidacji zestawu AmpFl STR MiniFiler™ wykorzystywanego w genetyce sądowej

Magdalena Gryzińska[1], Dariusz Szewczuk[2], Ewa Błaszczak[3], Grażyna Jeżewska-Witkowska[1]

[1]Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej UP w Lublinie, [2]Komenda Wojewódzka Policji w Lublinie, [3]University of Rennes

Walidacja w odniesieniu do procedur laboratoryjnych oznacza działanie mające na celu potwierdzenie w sposób udokumentowany i zgodny z założeniami, że czynności prowadzą do zaplanowanych wyników, jednocześnie sprawdza wiarygodność oraz dokładność zestawów odczynników i urządzeń pomiarowych [4, 13]. Proces weryfikuje metodę, wyznaczając krytyczne aspekty procedury [3, 7]. Zdecydowaną zaletą walidacji jest uzyskiwanie wiarygodnych rezultatów, ustalenie warunków, w jakich będą one otrzymywane, jak również zdefiniowanie ograniczeń metody, z której mogą korzystać laboratoria, ośrodki naukowe, badawcze i dydaktyczne [4, 5].

AmpFl STR MiniFiler™ Kit PCR Reagents jest gotowym do użycia zestawem, zawierającym wszystkie niezbędne odczynniki do wykonania reakcji PCR do jednoczesnej multipleksowej amplifikacji i fluorescencyjnej detekcji fragmentów ludzkiego DNA. Po raz pierwszy markery miniSTR były użyte na dużą skalę podczas identyfikacji ofiar ataku na World Trade Center w 2001 roku [9]. Mini Filer zawiera osiem autosomalnych *loci* STR (D2S1338, FGA, CSF1PO, D7S820, D13S317, D16S539, D18S51 i D21S11) zlokalizowanych na dłuższych ramionach chromosomów 2, 4, 5, 7, 13, 16, 18 i 21 oraz jedno *loci* heterosomalne (Amelogenina) zlokalizowane na krótszym ramieniu chromosomu X i Y. Analiza wielkości produktów odbywała się na podstawie systemu automatycznej detekcji, natomiast allele definiowane były na podstawie wewnętrznego standardu wielkości. Zestaw jest dedykowany dla zdegradowanych lub/i inhibitowanych próbek DNA człowieka [1].

Celem walidacji było wykazanie niezawodności metody, jej ograniczeń oraz przydatności w genetyce sądowej.

DNA wyizolowano z wymazówek ze śluzówki jamy ustnej, z zastosowaniem zestawu kolumienkowego QIAGEN. Pomiar stężeń DNA przeprowadzono metodą opartą na Real-Time PCR, przy użyciu aparatu ABI PRISM 7500 oraz zestawu odczynników Quantifiler® Human DNA. Amplifikacje przeprowadzono techniką multipleksowej reakcji PCR przy użyciu termocyklera GeneAmp PCR System 9700, natomiast rozdział produktów – przy użyciu sekwenatora kapilarnego AB 3500 HID Genetic Analyser. Wyniki analizowano za pomocą programu GeneMapper ID-X v.1.2. Wykorzystywano urządzenia i oprogramowanie firmy Applied Biosystems.

Wszystkie etapy badań wykonano w obecności kontroli pozytywnych (DNA o znanym profilu) i kontroli negatywnych (próby odczynnikowe) w trzech powtórzeniach. Łącznie przebadano 165 próbek.

Podczas walidacji zbadano następujące parametry: próg detekcji i próg oznaczalności; liniowość i zakres pomiarowy metody oraz jej czułość.

Próg detekcji i próg oznaczalności

W celu właściwego odróżnienia sygnałów pochodzących z tła od właściwych sygnałów z rozdzielanych fragmentów DNA wyznaczono próg oznaczalności, tj. wartość graniczną w jednostkach fluorescencji powyżej której sygnał fluorescencji może być wiarygodnie oznaczony. Na poziom szumów sygnału fluorescencji składają się dwa parametry: próg (limit) detekcji i próg (limit) oznaczalności. Próg detekcji – LOD (Limit of Detection), określa wartość graniczną w jednostkach fluorescencji (RFU), powyżej której sygnały fluorescencji mogą być rozróżnione od poziomu szumów, lecz niekoniecznie wiarygodnie oznaczone [7]. Limit detekcji wyznaczono na podstawie równania: LOD = x + 3 SD; gdzie: x – średnia wartość sygnału fluorescencji linii bazowej danego barwnika; SD – odchylenie standardowe.

Próg oznaczalności – LOQ (Limit of Quantitation) wyznaczono stosując równanie: LOQ = x + 10 SD; gdzie: x – średnia wartość sygnału fluorescencji linii bazowej danego barwnika; SD – odchylenie standardowe [2].

Wyniki wykonanych testów wskazują, że poziom szumów dla poszczególnych barwników fluorescencyjnych jest różny. Najniższy średni poziom szumów zanotowano dla barwnika niebieskiego (FAM), a najwyższy dla barwnika czerwonego (PET) – tabela 1. Na podstawie uśrednionych wartości względnej fluorescencji barwników, dla zakresu skanów obejmującego wszystkie układy systemu Mini Filer (data point 3046 ÷ 5230), wyznaczono progi detekcji i progi oznaczalności dla każdego barwnika niezależnie. Uzyskane rezultaty badań wykorzystano do opracowania parametrów metody analizy wyników badań dla systemu Mini Filer z wykorzystaniem programu GeneMapper ID-X v.1.2 (tab. 2).

Tabela 1

Próg detekcji i próg oznaczalności dla systemu Mini Filer (RFU)

Barwnik	Minimum RFU	Maksimum RFU	Średnia RFU (x)	SD	LOD (x +3 SD)	LOQ (x +10 SD)
6-FAM™	1	19	2,45	2,23	9,14	24,75
VIC®	1	57	3,52	2,89	12,19	32,42
NED™	2	65	7,78	4,63	21,67	54,08
PET®	4	25	14,64	3,68	25,68	51,44

Tabela 2

Parametry metody analizy wyników badań

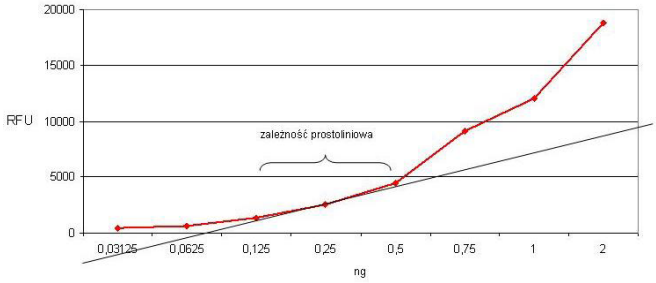
Nazwa metody	Parametry analizy Peak tresholds (RFU)	Zastosowanie
Mini Filer standard	B – 50 G – 50 Y – 100 R – 100	Metoda stosowana w rutynowej analizie wszystkich wyników badań uzyskanych z wykorzystaniem systemu Mini Filer
Mini Filer próg wykrycia	B – 50 G – 50 Y – 50 R – 50	Metoda stosowana opcjonalnie (np. dla zdegradowanego DNA), gdy z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, iż mamy do czynienia z DNA pochodzącym od jednej osoby

Liniowość i zakres pomiarowy metody

Liniowość to parametr, który wskazuje proporcjonalną zależność wartości sygnału (w jednostkach fluorescencji) w zależności od stężenia DNA w próbce. Wraz ze wzrostem stężenia DNA wartość sygnału fluorescencji wzrasta liniowo. Liniowość zachodzi jednak do pewnego momentu, tj. do wysycenia detektora, czyli wzrostu do wartości, przy której nie obserwuje się liniowej zależności wzrostu sygnału pomimo zwiększającej się ilości matrycowego DNA w próbce. Wraz z liniowością wyznaczany jest zakres metody, tj. przedział w zakresie stężeń DNA, w obrębie którego metoda daje wiarygodne wyniki, czyli pomiędzy dolną granicą limitu oznaczalności a górną granicą oznaczalności [10].

W celu oznaczenia liniowości i zakresu wykorzystano następujący szereg rozcieńczeń DNA: 2,0; 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 ng/µl (w trzech powtórzeniach). Średnie wysokości pików alleli (w RFU), które zawierały takie samo stężenie DNA zobrazowano na rysunku.

Na podstawie liniowości wyznaczono zakres pomiarowy metody, poprzez określenie średnich wartości sygnału w RFU, osiągniętych dla odpowiedniej ilości amplifikowanego DNA w próbce. Wy-



Rys. Średnia wysokości pików względem ilości matrycowego DNA

stępowanie niespecyficznych pików w kolorach B i G predysponowało do podwyższenia progów oznaczalności do 100 RFU.

Zależność fluorescencji od stężenia badanego materiału w szerokim jego przedziale była nieprostoliniowa. Do celów analitycznych kwalifikuje się jedynie zakres stężeń DNA od 0,125 do 0,5 ng; tylko w tym przedziale stężeń zależność wzrostu poziomu sygnału w RFU od wzrostu stężenia matrycowego DNA jest wprost proporcjonalna.

Optymalna ilość matrycowego DNA, jaką należy wziąć do przeprowadzenia reakcji amplifikacji jest ilość DNA zawierająca się w przedziale od 0,25 do 0,75 ng. Poniżej 0,25 ng DNA w próbce obserwuje się zjawisko niezbalansowania pików w układach heterozygotycznych, natomiast przy ilości powyżej 0,75 ng DNA w próbce pojawiają się artefakty oraz „podciągnięcia" pików. W badanym przedziale stężeń od 0,03125 do 2,0 ng matrycowego DNA w próbce można stwierdzić, iż walidowana metoda daje wiarygodne wyniki. Średnie wysokości sygnału DNA, badane dla poszczególnych rozcieńczeń, mieszczą się ponad granicę oznaczalności, tj. powyżej 100 RFU (określona w teście oznaczalności). Na podstawie liniowości i zakresu pomiarowego metody podjęto decyzję o podwyższeniu progów oznaczalności do 100 RFU.

Badanie czułości

Badanie czułości polega na określeniu najmniejszej możliwej do wykrycia ilości matrycowego DNA w próbce, wystarczającej do tego, aby uzyskać pełen profil DNA [6, 11]. Utrata jednego z alleli (alleli drop out) bądź całego *locus* (locus drop out) utrudnia interpretację uzyskanych wyników [12, 14]. Wartość tę określono doświadczalnie, analizując próbki zawierające znane, lecz zmienne stężenie DNA (tab. 3).

Stężeniem granicznym, przy którym otrzymano pełny profil DNA było 0,0625 ng/µl matrycowego DNA w próbce. Zjawisko „drop out" pojedynczych alleli stwierdzono przy średniej wysokości piku poniżej ok. 670 RFU, podobnie jak zjawisko „drop out" całych układów – przy średniej wysokości piku poniżej ok. 670 RFU.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, istotnych z punktu widzenia prowadzonych rutynowo badań biologicznych w laboratorium kryminalistycznym, których celem była walidacja zestawu do amplifikacji AmpFl STR MiniFiler™ firmy Applied Biosystems, stwierdzono, że:

– w walidowanym przedziale stężeń od 0,03125 ng do 2,0 ng matrycowego DNA w próbce walidowana metoda daje wiarygodne wyniki;

Tabela 3

Poziom wypadania alleli w poszczególnych układach STR

Zawartość DNA w próbce (ng/µl)	D13 S317	D7 S820	Amelogenina	D2 S1338	D21 S11	D16 S359	D18 S51	SCF	FGA	Wysokość pików
0,03125		0,46 0,34		193	0,17 0,26 211	399 0,46 0,30	0,45	0,51 0,18		452,76
0,0625		0,45 0,52			0,10 0,57	0,51 0,55 0,35	0,23	0,32		674,93
0,125					0,33 0,53	0,43	0,57			1386,58
0,25				0,53	0,51			0,53		2562,36
0,5		0,58						0,51		4519,11
0,75										9171,87
1,0										12020,80
2,0										18801,27

— Pełny profil
— Hb poniżej 60% (0,6)
— Allel "drop out"
— *Locus* "drop out"

– metoda charakteryzuje się dużą wykrywalnością alleli; ponadto w zakresie od 0,0625 do 2,0 ng matrycowego DNA stwierdzono pełne profile DNA. Zjawisko „drop out" pojedynczych alleli oraz całych układów zauważono dla zawartości 0,03125 ng matrycowego DNA w próbce;

– zestaw Mini Filer kwalifikuje się do badań czystych profili lub mieszanin, natomiast w mniejszym stopniu do analizy tzw. śladów kontaktowych, ze względu na wysoką czułość, która powoduje ujawnianie dodatkowych domieszek DNA;

– walidację zakończono wynikiem pozytywnym, ponieważ metoda spełnia stawiane jej wymagania.

Literatura: 1. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide, 2007 – Applied Biosystems. **2. Barbisin M., Fang R., O'Shea C.E., Calandro L.M., Furtado M.R., Shewale J.G.,** 2009 – J. Forensic Sci. 54 (2), 305-319. **3. Butler J.M.**, 2001 – Forensic DNA Typing: Biology and technology behind STR markers. Laboratory validation. Elsevier Academic Press. **4. Butler J.M.,** 2006 – Profiles in DNA (Promega Corporation) 9 (2), 3-6. **5. Butler J.M.**, 2007 – Validation: What is it, why does it matter, and how should it be done? Applied Biosystems, Forensic News 01. **6. Butler J.M., Shen Y., McCord B.R.**, 2003 – J. Forensic Sci. 48, 1054-1064. **7. Drabik J., Jagiełło A., Niemcunowicz-Janica A., Pepiński W.**, 2011 – Arch. Med. Sąd. Kryminol. LXI, 153-160. **8. Gilder J.R., Doom T.E., Inman K., Crim M., Krane D.E.**, 2007 – J. Forensic Sci. 52 (1), 96-101. **9. Holland M.M., Cave C.A., Holland C.A., Bille T.W.**, 2003 – Croat. Med. J. 44, 264-272. **10. Leclair B., Sgueglia J.B., Wojtowicz P.C., Juston A.C., Frégeau C.J., Fourney R.M.**, 2003 – J. Forensic Sci. 48 (5), 1-13. **11. Miloš A., Selmanović A., Smajlović L., Huel R.L.M., Katzmarzyk C., Rizvić A.**, 2007 – Croat. Med. J. 48, 486-493. **12. Mulero J.J., Chien Wei Chang, Lagacé R.E., Wang D.Y., Bas J.L., McMahon T.P., Hennessy L.K.,** 2008 – J. Forensic Sci. 53, 838-852. **13. Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R.**, 2008 – Problemy kryminalistyki 262, 5-13. **14. Wiegand P., Kleiber M.,** 2001 – Int. J. Leg. Med. 114, 285-287.

Selected parameters of validation of AmpFl STR MiniFiler™ kit used in forensic genetics

Summary

The aim of the presented research was to evaluate AmpFl STR MiniFilerTM kit from Applied Biosystems from the point of its reliability, limitations and usefulness in forensic genetics. Amplification products were detected in fluorescence-based automated genetic analyzer, whereas alleles were defined on the basis of the size of the internal standard. During the validation, the following parameters were determined: detection threshold and threshold determination, linearity and measuring range and sensitivity of the method. The reliable results were obtained in the range of concentrations from 2.00 ng to 0.03125 ng of template DNA in the sample. The method has a high detection rate of alleles, also in the range of 0.0625 ng to 2.0 ng of template DNA were full DNA profile. The case of "drop out" of individual alleles and the entire system for the content of 0.03125 ng of template DNA in the sample were observed. Mini Kit Filer is suitable for pure research profiles or mixtures. To a lesser extent it is suitable for the trace analysis of contact because of its high sensitivity.

KEY WORDS: limit of detection, limit of quantification, minimum peak height