

Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov

Highly efficient DNA extraction method from skeletal remains

Irena Zupanič Pajnič

Inštitut za sodno
medicino, Medicinska
fakulteta, Univerza v
Ljubljani, Korytkova 2,
1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

znanstvena sodelavka in
asist. dr. Irena Zupanič
Pajnič, univ. dipl. biol.
Inštitut za sodno
medicino, Medicinska
fakulteta, Univerza v
Ljubljani, Korytkova 2,
1000 Ljubljana

Ključne besede:

ekstrakcija DNA,
genetsko profiliranje,
kosti, zobje, STR, mtDNA

Key words:

DNA extraction, genetic
profiling, bones, teeth,
STR, mtDNA

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011;
80: 171–81

Prispelo: 31. maj 2010,
Sprejeto: 15. sept. 2010

Raziskavo je odobrila
komisija Republike
Slovenije za medicinsko
etiko.
Še živeči sorodniki žrtev
povojnih grobišč Konfin
1 in Stržič, ki so vključeni
v pričujočem članku,
so dali pisno privolitev
k objavi rezultatov
molekularno genetskih
preiskav.

Izvilleček

Izhodišča: V prispevku je natančno opisana metoda ekstrakcije DNA, ki smo jo razvili za pridobitev visokokakovostne DNA iz kosti in zob posmrtnih ostankov žrtev 2. svetovne vojne, uporabljamo pa jo tudi za molekularnogenetsko identifikacijo neznanih razgrajenih trupel v rutinskih sodnomoedicinskih primerih, kjer so za genetsko preiskavo primerni le še kosti in zobje. V študijo smo vključili 109 kosti in dva zoba iz različnih povojnih masovnih grobišč v Sloveniji.

Metode: Kosti in zobe smo očistili, odstranili površinsko onesnaženje in jih z uporabo tekočega dušika zmleli v prah. Genomsko DNA smo ekstrahirali v dveh paralelkah v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen), pri čemer smo kostni in zobni prah predhodno tri dni dekalificirali. Jedrno DNA smo kvantificirali z metodo kvantitativne reakcije PCR (*angl.* Polymerase Chain Reaction) v realnem času. S pomnoževanjem mikrosatelitov ali področij STR (*angl.* Short Tandem Repeat) v polimerazni verižni reakciji (PCR) smo pridobili avtosomalne genetske profile ter haplotipe kromosoma Y, s sekvenciranjem področij HVI in HVII pa haplotipe mitohondrijske DNA (mtDNA) preiskovanih kosti in zob. Zaradi sledljivosti v primeru pojava onesnaženja smo pripravili eliminacijske podatkovne zbirke, ki so vsebovale genetske profile jedrne in mtDNA vseh oseb, ki smo bile kakor koli v stiku s skeletnimi ostanki.

Rezultati: Iz zob smo pridobili do 55 ng DNA/g zoba, iz stegenic do 100 ng DNA/g kosti, iz golenic do 30 ng DNA/g kosti in iz nadlahtnice do 0,5 ng DNA/g kosti. Uspešnost tipizacije avtosomskih področij STR in področij STR kromosoma Y je bila pri zobeh 100 %, pri stegenicah 98 %, pri golenicah in nadlahtnici pa od 75 % do 81 %. Uspešnost tipizacije mtDNA je bila za zobe 100 %, za kosti pa 96 % do 98 %.

Zaključki: Iz več kot 60 let starih skeletnih ostankov smo uspeli pridobiti dovolj kakovostno jedrno DNA za uspešno tipizacijo področij STR. Opisana metoda ekstrakcije DNA je izredno učinkovita, saj smo iz samo 0,5 g kostnega ali zobnega prahu iz večine skeletnih ostankov pridobili od 0,8 do 100 ng DNA/g prahu in kompletne genetske profile tako avtosomalne DNA kot haplotipe kromosoma Y in mtDNA.

Abstract

Background: This paper precisely describes the method of DNA extraction developed to acquire high quality DNA from the Second World War skeletal remains. The same method is also used for molecular genetic identification of unknown decomposed bodies in routine forensic casework where only bones and teeth are suitable for DNA typing. We analysed 109 bones and two teeth from WWII mass graves in Slovenia.

Methods: We cleaned the bones and teeth, removed surface contaminants and ground the bones into powder, using liquid nitrogen. Prior to isolating the DNA in parallel using the BioRobot EZ1 (Qiagen), the powder was decalcified for three days. The nuclear DNA of the samples were quantified by real-time PCR method. We acquired autosomal genetic profiles and Y-chromosome haplotypes of the bones and teeth with PCR amplification of microsatellites, and mtDNA haplotypes. For the purpose of traceability in the event of contamination, we prepared elimination data bases including genetic profiles of the nuclear and mtDNA of all persons who have been in touch with the skeletal remains in any way.

Results: We extracted up to 55 ng DNA/g of the teeth, up to 100 ng DNA/g of the femurs, up to 30 ng DNA/g of the tibias and up to 0.5 ng DNA/g of the humerus. The typing of autosomal and Y-STR loci was successful in all of the teeth, in 98 %

of the femurs, and in 75 % to 81 % of the tibias and humerus. The typing of mtDNA was successful in all of the teeth, and in 96 % to 98 % of the bones.

Conclusions: We managed to obtain nuclear DNA for successful STR typing from skeletal re-

mains that were over 60 years old. The method of DNA extraction described here has proved to be highly efficient. We obtained 0.8 to 100 ng DNA/g of teeth or bones and complete genetic profiles of autosomal DNA, Y-STR haplotypes, and mtDNA haplotypes from only 0.5g bone and teeth samples.

Uvod

Za molekularnogenetsko identifikacijo skeletiziranih, močno poškodovanih ali razpadlih človeških posmrtnih ostankov so poleg dolgih kosti najboljši vir DNA zobje, saj so skriti v čeljustnih kosteh, dodatno pa DNA ščiti še sklenina.¹ Med dolgimi kostmi so primerne predvsem kosti spodnjih udov (stegenice, sledijo jim golenice), manj pa kosti zgornjih udov (nadlahtnice).² Hagelbergova s sod.³ je pri molekularnoantropoloških preiskavah kosti, starih od 300 do 5500 let, ugotovila, da je ohranjenost DNA v kosteh odvisna predvsem od pogojev, v katerih so se skeletni ostanki nahajali, manj pa od same starosti skeletnih ostankov. Pri zobeh se količina DNA tako med posamezniki kot tudi med skupinami zob močno razlikuje, količina in kakovost ekstrahirane DNA pa je odvisna tudi od bolezni zoba, zobozdravstvenih posegov, časa, ki je pretekel od ekstrakcije zoba do pridobitve DNA, in starosti dajalca.⁴ Količina DNA v zobeh je odvisna zlasti od velikosti zobne pulpe oziroma skupine zob, zato so kočniki najbogatejši vir DNA. Za genetske preiskave si zobje po primernosti sledijo v naslednjem vrstnem redu: nekariesni ali endodontsko nezdravljeni kočniki, ličniki, podočniki in sekalci ter kariesni ali endodontsko zdravljeni kočniki, ličniki, podočniki in sekalci.⁵ Stare kosti in zobje pogosto vsebujejo zelo malo DNA ali pa je močno razgrajena. Zato je zbiranje in shranjevanje tovrstnega biološkega materiala za uspešnost genetske identifikacije ključnega pomena. Nepravilni postopki zbiranja in shranjevanja lahko privedejo do onesnaženja in razgradnje DNA, posledica pa so napačni rezultati analiz ali neuspešna analiza. Pri izkopu je z vidika nadaljnjih genetskih preiskav obvezna uporaba čistih rokavic in maske ter shranjevanje skeletnih ostankov v zračne zaboje, v katerih

je lobanja z zobmi zaščitena v čisti papirnati vreči. Natančna priporočila za delo s starimi skeletnimi ostanki so opisana v prispevku Irene Zupanič Pajnič.⁶

Metoda ekstrakcije DNA iz kosti in zob je ena najzahtevnejših in najdaljših metod v forenzičnih genetskih preiskavah. V starih skeletnih ostankih je vsebnost DNA nizka, DNA je razgrajena, prisotnih je veliko inhibitorjev reakcije PCR (predvsem huminske kisline iz zemlje), biološki material pa je izjemno podvržen možnosti onesnaženja s t. i. moderno DNA.^{7,8} Vse naštet omejuje uspešnost genetske tipizacije starih kosti in zob. Zaradi zahtevnosti in dolgotrajnosti je opisanih veliko različnih ekstrakcijskih metod, ki se razlikujejo po količini potrebne zobnega ali kostnega prahu, po vključitvi dekalifikacije ter po načinu čiščenja DNA. Večina metod zahteva precej veliko količino zobnega oziroma kostnega prahu. Iz več kot petih gramov kostnega prahu pridobivajo DNA v International Commission on Missing Persons (ICMP) v Bosni in Hercegovini,⁹ Alonso s sod.¹⁰ in Vanek s sod.¹¹ pa opisujeta metodo, ki zahteva 1 do 2 g kostnega prahu. Ekstrakcijske metode se razlikujejo tudi po vključitvi dekalifikacije, ki nam omogoča ločitev kostnih celic od kostne mase.¹² Starejše ekstrakcijske metode v glavnem ne vključujejo dekalifikacije, novejš raziskave^{8,13,14} pa kažejo, da dekalifikacija znatno pripomore k pridobitvi večjih količin DNA iz skeletnih ostankov. Večina ekstrakcijskih metod uporablja za čiščenje DNA fenol-kloroform,^{9,10,15} ki sta toksična, sam postopek pa je dolgotrajen. Sledijo jim metode z vezavo DNA na silicijeve delce,^{8,9,11} najnovejše metode pa uporabljajo za vezavo DNA magnetne delce.^{14,16} V Laboratoriju za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino smo razvili metodo, ki omogoča pridobitev DNA iz le 0,5 g kostnega ali zobnega prahu. Vključena je 72-urna dekal-

cifikacija, za vezavo DNA pa uporabljamo magnetne delce. Postopek čiščenja in vezave DNA poteka avtomatizirano v napravi Bio-robot EZ1 (Qiagen). S to metodo smo med 88 žrtvami identificirali 28 žrtev, izkopanih iz kraškega brezna Konfin I,¹⁷ vse tri žrtve grobišča pod Storžičem¹⁸ in 7 od 25 žrtev grobišča v Bodoveljski Grapi.¹⁹ Iz praktično vseh skeletnih ostankov smo pridobili haplotipe mtDNA, haplotipe kromosoma Y in avtosomalne genetske profile, kar nam je omogočilo primerjavo tako z bližnjimi kot z daljnimi sorodniki po materini in očetovi liniji. V pripravi je molekularnogenetska identifikacija skeletnih ostankov domnevnih članov rodbine Auersperg s konca 17. in začetka 18. stoletja, pri kateri bomo še previdnejši pri ukrepih za preprečevanje kontaminacije z moderno DNA, podaljšali pa bomo tudi čas dekalifikacije.

V študijo smo vključili 109 kosti in dva zoba iz masovnih grobišč v Sloveniji, kjer so se množični poboji dogajali ob koncu 2. svetovne vojne. Med kostmi je bilo veliko prelomljenih kosti, saj so bile žrtve grobišča Konfin I, ki smo jih v velikem številu molekularnogenetsko identificirali,¹⁷ tudi ranjenci, ki so imeli prestreljene, zlomljene ali amputirane ude. Nekatere kosti so bile izkopane iz zemlje,^{18,19} druge so bile prinesene iz kraških brezen,¹⁷ kjer so bile izpostavljene delovanju dejavnikov okolja (zlasti meteorne vode). Genomsko DNA smo ekstrahirali iz 93 stegnenic, 15 golenic, ene nadlahtnice in dveh kočnikov (desni in levi molar 2).

Metode

Za zagotavljanje kakovosti in preprečevanje kontaminacije v genetskem laboratoriju smo upoštevali ukrepe, opisane v eni od predhodnih števil Zdravniškega vestnika.¹⁸ Čistost ekstrakcijskih in PCR reagentov ter plastike smo preverjali z vključitvijo negativnih kontrol v postopek ekstrakcije, z vključitvijo pomnoževanja v reakciji PCR in sekvenciranja. S tem smo sledili možnem onesnaženju vzorcev preko uporabljenih reagentov in plastike. Z namenom sledljivosti v primeru pojava onesnaženja z moderno DNA smo pripravili tudi eliminacijske podatkovne zbirke, ki so za vsako grobišče

vsebovale genetske profile vseh oseb, ki smo v kateri koli fazi zbiranja (izkopa), shranjevanja, antropološke in molekularnogenetske preiskave, prišle v stik s skeletnimi ostanki. Tako smo v primeru grobišča Konfin I v eliminacijsko podatkovno zbirko vključili arheologe, jamarje in kriminaliste, ki so sodelovali pri izkopu in shranjevanju skeletnih ostankov, antropologinjo, ki je opravila antropološko preiskavo skeletov, ter zaposlene na Inštitutu za sodno medicino: vse zaposlene v Laboratoriju za molekularno genetiko, pomivalko laboratorijske steklovine, obdukcijskega pomočnika, ki je sodeloval pri vzorčenju kosti, in fotografa. Od oseb, ki smo bile vključene v eliminacijske podatkovne zbirke, smo pridobili brise ustnih sluznic, na osnovi katerih smo vsem posameznikom določili avtosomalne genetske profile in haplotipe mtDNA, moškim osebam pa še haplotipe kromosoma Y. Avtosomalne genetske profile ter haplotipe mtDNA in kromosoma Y kosti in zob smo primerjali s profili in haplotipi oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, s čimer smo ugotavljali, ali je prišlo do onesnaženja vzorcev kosti in zob z moderno DNA.

Ekstrakcija DNA

Za genetsko preiskavo smo od vsake kosti (stegnenice, golenice ali nadlahtnice) odvzeli del kosti v dolžini 5 do 10 cm ter s pinceto iz čeljustnice odstranili dva kočnika. Kosti in zobe smo pred preiskavo fotodokumentirali in označili s številkami. Na Sliki 1 je prikazana prelomljena stegnenica iz grobišča Konfin I in del, ki smo ga odvzeli za genetsko preiskavo.

Kosti in zobe smo mehansko in kemijsko očistili. Površinsko onesnaženost smo odstranili s fizičnim odstranjevanjem površine ter spiranjem v 5-odstotnem detergentu Alconox, v vodi in v 80-odstotnem etanolu. Sledilo je mletje v homogenizatorju Tissue-Lyser (Retsch) ob uporabi tekočega dušika. Celoten postopek je potekal v prostoru, namenjenem izključno delu s starimi kostmi in z zobmi. Mehansko čiščenje (odstranjevanje površine kosti z brušenjem) in rezanje kosti z diamantno žago je potekalo v zaprti cito-

Slika 1: Del leve stegnenice 47 iz grobišča Konfin I.



statični varnostni komori C-(MaxPro)³-130 (Iskra Pio).

Mehansko čiščenje kosti in zob

S površine zoba in vzdolžno prerezanega delčka kosti smo s skalpelom odstranili zemljo in mikroorganizme. Nato smo zob ali kost umili v bidestilirani vodi (Milipor), ki smo ji dodali blag detergent (5-odstotni Alconox (Alconox Inc.)). Sledilo je nekajkratno spiranje v bidestilirani vodi (Milipor). Zob in kost smo čez noč posušili na zraku. Pri kosti smo mehansko odstranili površinsko plast, medtem ko smo pri zobu mehansko čiščenje z brušenjem nadomestili z obsevanjem z ultravijolično svetlobo. Kost smo vpeli v primež (Proxxon) in z zunanje ter notranje strani s pomočjo brusilnika (Dremel) in brusilnega nastavka (Proxxon) odstranili površinsko plast, debeline 2 do 3 mm. Kost smo ohladili v tekočem dušiku. Ponovno smo jo vpeli v primež (Proxxon) in njeno zunanjo površino s krožno diamantno žagico (Proxxon) narezali tako, da smo zarezali v kost utore, ki so oblikovali mrežo s kvadrati velikosti 5 x 5 mm. Kost smo ponovno ohladili v tekočem dušiku. Postopek smo ponovili tudi na notranji površini kosti. Zbrušeni in narezani del kosti smo s krožno diamantno žagico (Proxxon) odrezali od preostalega dela kosti.

Kemično čiščenje kosti in zob

Sledilo je kemično čiščenje obrušene kosti ali zoba. Enominutnemu spiranju z bidestilirano vodo (Milipor) je sledilo 15-minutno spiranje s 5-odstotnim detergentom Alconox (Alconox Inc.), trikratno enominutno spiranje z bidestilirano vodo (Milipor)

in dvakratno enominutno spiranje z 80-odstotnim etanolom. Vsa spiranja so potekala ob rahlem stresanju na stresalniku (GFL). Mehansko in kemijsko očiščeno kost ter očiščeni zob smo posušili čez noč na zraku.

Mletje kosti in zob

Pred mletjem smo vsako stran zoba 30 minut obsevali z UV-svetlobo, kost po obsevanju z UV-svetlobo ni bila izpostavljena, saj smo površinsko onesnaženje odstranili z brušenjem površinskega sloja kosti, medtem ko zob mehansko z brušenjem nismo obdelali. Nekateri laboratoriji po svetu pa tudi kosti obsevajo z UV-svetlobo kot dodaten ukrep pri preprečevanju onesnaženja. V primeru pojava onesnaženja bi se tudi v našem laboratoriju odločili za ta dodatni ukrep.

S tekočim dušikom smo 5 minut ohlajali kovinsko komoro in kroglo ter očiščeni zob ali del kosti. Ohlajeni zob ali kost smo prenesli v odrezani prst sterilne laboratorijske rokavice (lateks brez pudra), delec s kladivom razlomili na majhne koščke in jih prenesli v ohlajeno kovinsko komoro (Retsch). Zobe in kosti smo mleli v homogenizatorju TissueLyser (Retsch), pri čemer smo hkrati uporabljali dve kovinski komori s kovinsko kroglo (Retsch). Mletje je potekalo 1 do 2 minuti pri frekvenci 30 Hz po navodilih proizvajalca.²⁰ Pridobili smo fini kostni ali zobni prah.

Dekalcifikacija kosti in zob

Kostni in zobni prah smo dekalificirali 72 ur. Za ekstrakcijo genomske DNA smo uporabili 0,5 g kostnega ali zobnega prahu, ki smo mu dodali 1,5 ml 0,5 M EDTA ter močno vorteksirali. Sledila je inkubacija



Slika 2: Kostni prah, dobljen po mletju v homogenizatorju TissueLyser (Retsch).

čez noč pri 37 °C in 950 obr/min v napravi Thermomixer comfort (Eppendorf). Vzorec smo centrifugirali 90 s pri 13.400 obr/min ter zavrgli supernatant. Dodali smo 1 ml 0,5 M EDTA in močno vorteksirali. Ponovno sta sledila inkubacija čez noč pri 37 °C in 950 obr/min ter centrifugiranje 90 s pri 13.400 obr/min. Po odstranitvi supernatanta smo inkubacijo čez noč v 1 ml 0,5 M EDTA ponovili še enkrat, centrifugirali in zavrgli supernatant. Oborini smo dodali 1 ml sterilne bidestilirane vode (Gibco) in močno vorteksirali. Po centrifugiranju 90 s pri 13.400 obr/min smo zavrgli supernatant.

Ekstrakcija in čiščenje genomske DNA v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen)

Iz oborine, ki smo jo dobili po dekalifikaciji, smo s kompletom EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen) v napravi Biorobot EZ1 (Qiagen) ekstrahirali genomsko DNA. Oborini smo dodali 250 µl pufra G2 (EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen)) in 20 µl proteinaze K (EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen)) ter močno vorteksirali. Vzorec smo inkubirali 3–5 ur pri 56 °C in 950 obr/min v napravi Thermomixer comfort (Eppendorf). Po začetni inkubaciji smo dodali še 40 µl proteinaze K (EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen)). Vzorec smo inkubirali čez noč pri 56 °C in 950 obr/min v napravi Thermomixer comfort (Eppendorf). Sledilo je 1,5-minutno centrifugiranje pri 1900 obr/min. V primeru, da

po centrifugiranju nismo dobili bistrega supernatanta, smo centrifugiranje ponovili pri 6000 obr/min 4 min. Do 650 µl supernatanta smo prenesli v epruvetko za vzorec (EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen)), dodali 400 µl pufra MTL (Qiagen) in 1 µl cRNA v koncentraciji 1 µg/µl (EZ1 DNA Investigator Kit (Qiagen)). Epruvetko smo prenesli v napravo Biorobot EZ1 (Qiagen). Za čiščenje DNA smo izbrali postopek, ki omogoča pridobitev DNA iz večjega volumna, raztapljanje DNA v vodi in končni volumen ekstrakta 50 µl. Čiščenje smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca.²¹ Ekstrakcijo genomske DNA smo pri vsaki kosti in zobu ponovili vsaj dvakrat ter v ekstraktih določili količino jedrne DNA. Ekstrakt, ki smo mu določili višjo vsebnost jedrne DNA, smo uporabili za tipizacijo jedrnih mikrosatelitov, ekstrakt z nižjo vsebnostjo jedrne DNA pa smo uporabili za določitev nukleotidnega zaporedja področij HVI in HVII mtDNA.

Kvantifikacija DNA

S kvantifikacijo jedrne DNA smo ugotavljali, ali količina DNA v vzorcu zadostuje za uspešno tipizacijo področij STR, koliko vzorca naj pri preiskavi uporabimo ter prisotnost inhibitornih snovi. Za kvantifikacijo jedrne DNA smo uporabili komplet Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) in reakcijo izvedli v napravi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) ob uporabi računalniškega programa SDS Software verzija 1.0 (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca.²²

Tipizacija jedrnih področij STR

Pri kosteh in zobeh smo opraviti tipizacijo jedrne avtosomalne DNA in mikrosatelitov na kromosomu Y, pri čemer smo uporabili za pomnoževanje področij STR komplet AmpF/STR Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), komplet PowerPlex 16 System (Promega) in pri degradiranih vzorcih DNA še komplet AmpF/STR MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) za avtosomalno DNA ter komplet AmpF/STR YFiler (Applied Biosystems) za kromosom Y. Skupno

Tabela 1: Koncentracija jedrne DNA ekstrakta 1 in 2 (Human Quantifiler–Applied Biosystems), izražena v pg DNA/μl ekstrakta, uspešnost tipizacije mikrosatelitov avtosomalne DNA (AmpFISTR Identifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) in PowerPlex 16 System (Promega)), izražena s številom uspešno tipiziranih področij STR, uspešnost tipizacije mikrosatelitov kromosoma Y, izražena s številom uspešno tipiziranih področij STR in uspešnost tipizacije mtDNA (področij HVI in HVII) kosti in zob posmrtnih ostankov žrtev 2. svetovne vojne (D = desna, L = leva, K = Konfin I, S = Storžič).

Kost/zob	Koncentracija ekstrakta 1 (pg/μl)	Koncentracija ekstrakta 2 (pg/μl)	Avtosomalna področja STR	Področja STR kromosoma Y	mtDNA
zob LM2 2 S	550	110	18/18	17/17	HVI, HVII
zob DM2 2 S	510	350	18/18	17/17	HVI, HVII
L femur 1 S	43	13	18/18	17/17	HVI, HVII
L femur 2 S	86	82	18/18	17/17	HVI, HVII
L femur 3 S	59	20	18/18	17/17	HVI, HVII
femur A ant K	221	208	18/18	17/17	HVI, HVII
femur B ant K	32	17	18/18	7/17	HVI, HVII
femur C ant K	60	40	17/18	17/17	HVI, HVII
femur D ant K	37	35	18/18	17/17	HVI, HVII
femur E ant K	70	49	18/18	17/17	HVI, HVII
femur F ant K	50	18	18/18	14/17	HVI, HVII
femur G ant K	40	14	17/18	12/17	HVI, HVII
femur H ant K	106	69	18/18	17/17	HVI, HVII
femur I ant K	26	7	17/18	17/17	HVI, HVII
D femur 43 pat K	237	200	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 44 pat K	23	23	12/18	14/17	HVI, HVII
D femur 45 pat K	46	15	17/18	14/17	HVI, HVII
L femur 46 pat K	72	57	16/18	11/17	HVI, HVII
L femur 47 pat K	26	23	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 48 pat K	39	35	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 49 pat K	116	96	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 50 pat K	23	17	16/18	13/17	HVI, HVII
D femur 51 pat K	56	12	18/18	17/17	HVI, HVII
L femur 53 pat K	79	46	18/18	17/17	HVI, HVII
D tibia 54 pat K	28	7	12/18	17/17	HVI, HVII
tibia 55 pat K	35	8	8/18	0/17	HVI, HVII
tibia 56 pat K	26	13	12/18	13/17	HVI, HVII
L tibia 57 pat K	31	17	10/18	17/17	HVI, HVII
tibia 58 pat K	26	16	8/18	6/17	HVI, HVII
tibia 59 pat K	69	55	18/18	16/17	HVI, HVII
tibia 60 pat K	50	37	15/18	15/17	HVI, HVII
tibia 61 pat K	47	28	7/18	16/17	HVI, HVII
tibia 62 pat K	100	90	8/18	17/17	HVI, HVII
tibia 63 pat K	14	3	0/18	0/17	HVI, HVII
tibia 64 pat K	32	8	0/18	0/17	HVI, HVII
tibia 66 pat K	39	11	7/18	14/17	HVI, HVII
L tibia 67 pat K	300	117	16/18	15/17	HVI, HVII
tibia 68 pat K	23	7	9/18	17/17	HVI, HVII
tibia 69 pat K	67	63	18/18	17/17	HVI, HVII
humerus 72 pat K	5	1	0/18	0/17	HVI, HVII
D femur 1 K	62	43	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 2 K	10	9	13/18	12/17	
D femur 3 K	43	26	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 4 K	21	18	17/18	16/17	HVI, HVII
D femur 5 K	18	18	16/18	14/17	HVI, HVII
D femur 6 K	10	8	14/18	7/17	HVII
D femur 7 K	24	19	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 8 K	69	8	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 9 K	17	12	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 10 K	46	24	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 11 K	114	91	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 12 K	120	64	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 13 K	35	25	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 14 K	60	22	16/18	13/17	HVI, HVII
D femur 15 K	100	89	18/18	17/17	HVI, HVII

D femur 16 K	51	36	18/18	8/17	HVI, HVII
D femur 17 K	110	81	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 18 K	1000	92	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 19 K	270	123	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 20 K	15	9	11/18	14/17	HVI, HVII
D femur 21 K	142	89	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 22 K	111	29	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 23 K	130	57	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 24 K	75	56	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 25 K	36	34	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 26 K	39	26	16/18	15/17	HVI, HVII
D femur 27 K	150	150	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 28 K	41	39	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 29 K	48	17	15/18	6/17	HVI, HVII
D femur 30 K	64	57	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 31 K	17	8	16/18	13/17	HVI, HVII
D femur 32 K	42	34	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 33 K	100	57	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 34 K	62	39	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 35 K	64	60	18/18	10/17	HVI, HVII
D femur 36 K	77	37	16/18	16/17	HVI, HVII
D femur 37 K	280	220	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 38 K	130	110	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 39 K	150	27	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 40 K	30	28	17/18	17/17	
D femur 41 K	50	21	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 42 K	43	27	17/18	12/17	HVI, HVII
D femur 43 K	8	1	14/18	14/17	HVI, HVII
D femur 44 K	26	22	17/18	17/17	HVI, HVII
D femur 45 K	57	44	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 46 K	47	31	18/18	7/17	HVI, HVII
D femur 47 K	77	59	18/18	17/17	HVII
D femur 48 K	100	45	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 49 K	101	81	18/18	10/17	HVI, HVII
D femur 50 K	90	60	18/18	9/17	HVI, HVII
D femur 51 K	47	31	18/18	7/17	HVI, HVII
D femur 52 K	18	9	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 53 K	91	40	18/18	8/17	HVI, HVII
D femur 54 K	14	14	14/18	16/17	HVI, HVII
D femur 55 K	120	67	18/18	10/17	HVI, HVII
D femur 56 K	109	94	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 57 K	73	40	18/18	10/17	HVI, HVII
D femur 58 K	48	30	17/18	17/17	HVI, HVII
D femur 59 K	47	17	18/18	9/17	HVI, HVII
D femur 60 K	24	7	18/18	16/17	HVI, HVII
D femur 61 K	250	10	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 62 K	33	24	18/18	14/17	HVI, HVII
D femur 63 K	17	13	17/18	16/17	HVI, HVII
D femur 64 K	18	5	18/18	15/17	HVI, HVII
D femur 65 K	4	0,2	0/18	0/17	HVI, HVII
D femur 66 K	36	26	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 67 K	34	8	18/18	17/17	HVI, HVII
D femur 68 K	5	2	0/18	0/17	HVI, HVII
D femur 69 K	93	49	18/18	7/17	HVI, HVII
D femur 70 K	15	10	16/18	11/17	HVI, HVII
D femur 71 K	51	30	17/18	16/17	HVI, HVII

smo pomnoževali 17 mikrosatelitov na kromosomu Y in 17 avtosomskih mikrosatelitov ter odsek amelogeninskega gena, ki nam

omogoča določitev spola. Vse reakcije smo izvedli v napravi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)

v skladu z Zupanič Pajnič s sod.¹⁷ Fluorescentno označene produkte smo ločevali z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISMTM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) ob uporabi tekočega polimera POP 4 (Applied Biosystems) in notranjega velikostnega standarda GeneScan-500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) pri kompletih AmpF/STR Identifier, AmpF/STR MiniFiler in AmpF/STR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) ter notranjega velikostnega standarda ILS 600 (Promega) pri kompletu PowerPlex 16 System (Promega). Genetske profile smo določili s pomočjo računalniških programov Data Collection v 3.0 in GeneMapper ID v 3.2 (Applied Biosystems).

Sekvenciranje mtDNA

Vsem kostem in zobem smo določili nukleotidno zaporedje področij HVI in HVII mtDNA po postopkih, opisanih v Zupanič Pajnič s sod.^{17, 23} Reakcije PCR smo izvedli v cikličnem termostatu Biometra UNO-Thermoblock (Biometra). Produkta reakcije PCR smo prečistili z ultrafiltracijskimi enotami Centricon-100 (Millipore Corporation) in jih sekvencirali z metodo avtomatskega neposrednega fluorescentnega sekvenciranja ob uporabi kompleta BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v 1.1 (Applied Biosystems). Fluorescentno označene produkte smo prečistili s kolonami MicroSpin™ G-50 (Amersham Biosciences) in jih ločevali z avtomatskim genskim analizatorjem ABI PRISMTM 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) ob uporabi tekočega polimera POP 4 in računalniških programov Data Collection v 3.0 in DNA Sequencing Analysis Software v 5.2 (Applied Biosystems).

Dobljene genetske profile (avtosomalne, mtDNA in kromosoma Y) kosti in zob smo primerjali s profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, s čimer smo ugotavljali, ali je prišlo do onesnaženja vzorcev kosti in zob z moderno DNA.

Rezultati

Po 72-urni dekalifikaciji smo večinoma pridobili oborino s kostnim ali z zobnim prahom, ki ni bil popolnoma dekalificiran. Za popolno dekalifikacijo bi bilo potrebno vsaj še trikrat zamenjati EDTA, vendar smo se zaradi dolgotrajnosti postopka kompletne dekalifikacije in pridobitve jedrnih genetskih profilov iz večine kosti že po trikratni menjavi EDTA odločili za tridnevno dekalifikacijo. Kompletno dekalifikacijo najlažje dosežemo tako, da dodamo 0,5 g kostnega ali zobnega prahu 7 do 10 ml 0,5M EDTA v 15-ml epruveti. V tem primeru demineralizacija poteče že v 24 urah. Vendar smo se pri tem postopku srečali s problemom, kako tak vzorec skoncentrirati na volumen, manjši od 0,5 ml (tak volumen vzorca potrebujemo za avtomatizirano in zelo učinkovito čiščenje DNA v napravi Biorobot EZ1). Testirali smo različne kolone za koncentriranje vzorcev, vendar smo pri vseh naleteli na težave pri mašenju por v membrani in posledično nepropustnosti. Zato smo se odločili za dekalifikacijo v 2-ml epruveti z večkratnim menjavanjem EDTA.

S kvantifikacijo jedrne DNA smo obe ma kočnikoma in vsem 109 kostem, razen dvema stegenicama in nadlahtnici, vsaj pri enem ekstraktu določili več kot 8 pg DNA/μl ekstrakta. Pri kosti D femur 65 K smo zaznali največ 4 pg DNA/μl ekstrakta, pri kosteh D femur 68 K in humerus 72 pat K pa največ 5 pg DNA/μl ekstrakta (glej Tabelo 1 v dodatnem elektronskem materialu). Pri vseh treh naštetih kosteh tipizacija avtosomskih in na kromosom Y vezanih področij STR ni bila uspešna, prav tako se jedrna področja STR niso pomnožila pri kosteh tibia 63 pat K, ki smo ji določili največ 14 pg DNA/μl ekstrakta, in tibia 64 pat K, ki smo ji določili največ 32 pg DNA/μl ekstrakta. Iz preostalih 106 kosti smo pridobili vsaj pri enem ekstraktu od 8 do 1000 pg DNA/μl ekstrakta oziroma od 0,8 do 100 ng DNA/g kosti. Iz stegenic smo pridobili do 100 ng DNA/g kosti, iz golenic do 30 ng DNA/g kosti in iz nadlahtnice do 0,5 ng DNA/g kosti. Veliko DNA smo pridobili iz zob, vsaj pri enem ekstraktu je bila količina od 51 do 55 ng DNA/g zoba. Največ DNA smo pridobili iz desne

stegnenice 18 iz grobišča Konfin I, iz katere smo uspeli pridobiti kar 100 ng DNA/g kosti. Pri dveh ekstrakcijah iz posamezne kosti ali zoba je bila vsebnost DNA v ekstraktih večinoma precej podobna, le pri štirinajstih kosteh in enem zobu sta se ekstrakta po vsebnosti DNA razlikovala. Štirikratno razliko smo opazili pri ekstraktih sedmih kosti, petkratno pri ekstraktih treh kosti, osemkratno pri ekstraktih dveh kosti, enajstkratno, dvajsetkratno in petindvajsetkratno pa pri ekstraktih ene kosti. Pri enem zobu smo opazili petkratno razliko v vsebnosti DNA med dvema ekstraktoma (glej Tabelo 1 v dodatnem elektronskem materialu).

Tipizacija avtosomálnih področij STR je bila uspešna pri 106 od 111 kosti in zob, kar pomeni 95-odstotno uspešnost. Genetskih profilov nismo pridobili za dve stegnenici, dve golenici in nadlahtnico. Pri zobeh je bila uspešnost tipizacije avtosomálnih področij STR 100 %, pri stegnenicah 98 %, pri golenicah in nadlahtnici skupaj pa 81 %. Kompletne avtosomalne genetske profile, kjer se je pomnožilo vseh 17 področij STR in amelogenin, smo pridobili iz 69 kosti in zob, delne profile, z manjkajočim enim ali dvema področjema STR, smo pridobili iz 20 kosti (manjkala so predvsem daljša področja), pri preostalih 17 kosteh pa se je pomnožilo od 7 do 15 področij STR. Tipizacija področij STR kromosoma Y je bila uspešna pri 105 od 111 kosti in zob, kar pomeni 95-odstotno uspešnost. Haplotipov kromosoma Y nismo pridobili za tri golenice, nadlahtnico in dve stegnenici. Pri zobeh je bila uspešnost tipizacije področij STR kromosoma Y 100 %, pri stegnenicah 98 %, pri golenicah in nadlahtnici skupaj pa 75 %. Kompletne genetske profile kromosoma Y, kjer se je pomnožilo vseh 17 področij STR, smo pridobili iz 54 kosti in zob, delne profile z manjkajočim enim ali dvema področjema STR smo pridobili iz 19 kosti, pri preostalih 32 kosteh pa se je pomnožilo od 6 do 14 področij STR. Tipizacija področja HVI mtDNA je bila uspešna pri obeh zobeh in pri 105 kosteh, kar predstavlja 96 % uspešnost. Tipizacija področja HVII mtDNA pa je bila uspešna pri obeh zobeh in pri 107 kosteh, kar predstavlja 98-odstotno uspešnost (glej Tabelo 1 v dodatnem elektronskem materialu).

Razprava in zaključki

Nagy s sod.¹⁴ je za ekstrakcijo DNA iz kosti, starih do nekaj let, uporabil na magnetnih delcih zasnovano avtomatizirano napravo Biorobot M48 (Qiagen), mi pa smo za ta namen uporabili sorodno napravo Biorobot EZ1 (Qiagen). Pred ekstrakcijo smo kosti in zobe dekalificirali do 72 ur in prišli do podobnih zaključkov kot Loreille s sod.,¹³ da je možno pridobiti večje količine DNA iz predhodno dekalificiranih kosti in zob.

Iz starih skeletnih ostankov smo pridobili od 0,8 do 100 ng DNA/g kosti, kar je bistveno več kot Marjanovič s sod.,²⁴ ki je pridobil iz kosti iz obdobja 2. svetovne vojne od 0,04 do 10 ng DNA/g kosti. Yamamoto s sod.²⁵ je iz 16 let starega skeleta novorojenca iz 1 g stegnenice pridobil 5 ng DNA, Tahir s sod.²⁶ pa iz 27 let starega ekshumiranega skeleta 8 ng DNA/g kosti. Med kostmi smo preiskovali le dolge kosti, med katerimi smo pridobili največ DNA iz stegnenic, sledile so jim golenice in nadlahtnica. Tudi v International Commission on Missing Persons² ugotavljajo najvišjo uspešnost tipizacije avtosomálnih področij STR pri stegnenicah, pri ostalih kosteh je ta uspešnost nižja. Tipizacija regije HVI mtDNA je bila uspešna pri 96 % kosti in zob, regije HVII pa pri 98 % kosti in zob. Palo s sod.¹⁵ je za identifikacijo posmrtnih ostankov finskih vojakov, padlih v 2. svetovni vojni v bivši Sovjetski Zvezi, uspel analizirati le mtDNA (tipizacija jedrne DNA ni bila uspešna), pri čemer je bila pri dolgih kosteh uspešnost tipizacije regije HVI 96 % in regije HVII 91 %. Veliko DNA (od 51 do 55 ng DNA/g zoba) smo pridobili iz zob, pri čemer opozarjam, da raziskava vključuje le dva zoba, zato bi bilo potrebno za verodostojnejše podatke preiskati večje število zob. Literatura nasplošno opisuje zobe kot eden najboljših virov DNA v starih skeletnih ostankih.¹ Miloš s sod.² ob primerjavi stegnenic in zob ugotavlja zelo podobno uspešnost tipizacije jedrnih področij STR za DNA, pridobljenih iz 15 let starih posmrtnih ostankov. 10 let po pokopu ekshumiranih zob je Boles s sod.²⁷ pridobil 10–50 ng DNA.

Iz več kot 60 let starih skeletnih ostankov, ki so bili zagrebeni v zemljo ali so ležali v kraški jami, smo uspeli pridobiti dovolj ka-

kovostno jedrno DNA za uspešno tipizacijo področij STR. Opisana metoda ekstrakcije DNA je izredno učinkovita, saj smo iz večine skeletnih ostankov pridobili od 0,8 do 100 ng DNA/g kostnega ali zobnega prahu in kompletne genetske profile tako avtosomalne DNA, kot haplotipe kromosoma Y in mtDNA. Za ekstrakcijo je zadostovalo že 0,5 g kostnega ali zobnega prahu, kar nam omogoča pridobitev genetske informacije iz količinsko skromnih vzorcev. Pri preiskavah starih skeletnih ostankov izključujemo možnost kontaminacije DNA med izkopom (pri zbiranju in shranjevanju kosti), med antropološko ter med molekularnogenetsko preiskavo. Avtentičnost genetskih profilov kosti in zob potrjujejo čiste ekstrakcijske in PCR negativne kontrole, identični genetski profili, pridobljeni s kompletoma AmpF/STR Identifier (Applied Biosystems) in PowerPlex 16 System (Promega), neujemanje genetskih profilov kosti in zob z osebami iz eliminacijskih podatkovnih zbirk ter ujemanje profilov s profili še živečih sorodnikov, torej pozitivne identifikacije žrtev grobišč.

Literatura

- Gaytmenn R, Sweet D. Quantification of forensic DNA from various regions of human teeth. *J Forensic Sci* 2003; 48: 622–625.
- Miloš A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RLM, Katzarzyk C, Rizvić A, et al. Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat Med J* 2007; 48: 486–93.
- Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 1989; 342: 485.
- Schwartz TR, Schwartz EA, Mieszkowski L, McNally L, Kobilinsky L. Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *J Forensic Sci* 1991; 36: 979–990.
- Budowle B, Smith J, Moretti T, DiZinno J. DNA typing protocols: molecular biology and forensic analysis. Washington: Eaton Publishing; 2000.
- Zupanič Pajnič I. Priporočila za molekularnogenetsko identifikacijo žrtev povojnih pobojev v Sloveniji. In: Dežman J, ur. Poročilo Komisije Vlade Republike Slovenije za reševanje vprašanj prikritih grobišč 2005–2008. Ljubljana: Družina; 2008. p. 133–147.
- Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci* 1997; 42: 1126–1135.
- Young Lee H, Jin Park M, Young Kim N, Eun Sim J, Ick Yang W, Jin Shin K. Simple and highly effective DNA extraction method from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci Int Genet* 2010; 4: 275–80.
- Davoren J, Vanek D, Konjodžić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 2007; 48: 478–85.
- Alonso A, Andelinović Š, Martin P. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 2001; 42: 260–6.
- Vanek D, Saskova L, Koch H. Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J* 2009; 50: 286–295.
- Bender K, Schneider PM, Rittner C. Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int* 2000; 113: 103–107.
- Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 191–5.
- Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads technology in forensics. *Forensic Sci Int* 2005; 152: 13–22.
- Palo JU, Hedman M, Soderholm N, Sajantila A. Repatriation and identification of Finnish World War II soldiers. *Croat Med J* 2007; 48: 528–535.
- Stray J, Holt A, Brevnov M, Calandro LM, Furtado MR, Shewale JG. Extraction of high quality DNA from biological materials and calcified tissues. *Forensic Sci Int Genet Supp Ser* 2009; 2: 159–160.
- Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelec B, Balažic J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med* 2010; 124: 307–317.
- Zupanič Pajnič I. Molekularnogenetska identifikacija domobranskih žrtev. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 745–750.
- Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA (doktorsko delo). Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
- Qiagen Companies (2004) *TissueLyser Handbook*. Wiena.
- Qiagen Companies (2004) *EZ1 DNA Handbook*. Wiena.
- Applied Biosystems (2003) *Quantifiler™ Human DNA Quantification kit User's Manual*. Foster City (CA).
- Zupanič Pajnič I, Balažic J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med* 2004; 118: 1–4.
- Marjanović D, Durmić-Pašić A, Bakal N, Haverić S, Kalamujić B, Kovačević L, et al. DNA identification of skeletal remains from World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J* 2007; 48: 513–519.
- Yamamoto T, Uchihi R, Kojima T, Nozawa H, Huang XL, Tamaki K, et al. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alle-

- ged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci* 1998; 43: 701–705.
26. Tahir MA, Balraj E, Luke L, Gilbert T, Hamby JE, Amjad M. DNA typing of samples for polymarker DQA1 and nine STR loci from human body exhumed after 27 years. *J Forensic Sci* 2000; 45: 902–907.
 27. Boles CT, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci* 1995; 40: 349–355.