



archiwum medycyny sądowej i kryminologii

List do Redakcji
Letter to Editor

Dominika Pluta, Arleta Lebioda, Anna Jonkisz, Tadeusz Dobosz

Pierwsza udana izolacja i profilowanie DNA z kości techniką nieniszczącą powierzchni kości **First successful DNA isolation and profiling from bone using an approach that is non-destructive toward bone surface**

Zakład Technik Molekularnych, Katedra Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska
Department of Molecular Techniques, Chair of Forensic Medicine, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

Streszczenie

Powszechnie stosowana izolacja DNA metodą niszczącą polega na sproszkowaniu materiału, co prowadzi do całkowitego zniszczenia mniejszych kości lub nieodwracalnego uszkodzenia większych poprzez wycięcie z nich sporych fragmentów. Ten sposób postępowania jest całkowicie nieakceptowalny w przypadku kości o dużej wartości antropologicznej, religijnej, muzealnej lub emocjonalnej. W tutejszym Zakładzie rozwiązano problem w przypadku zębów ludzkich (praca doktorska A. Pileckiej), co stało się inspiracją do opracowania podobnej niedestrukcyjnej techniki izolacji DNA z kości ludzkich. Praca zakończyła się sukcesem i otrzymano, według wiedzy autorów tego doniesienia, pierwszy na świecie profil DNA z kwasu deoksyrybonukleinowego wyizolowanego z kości techniką nieniszczącą ich powierzchni.

Słowa kluczowe: kości, izolacja DNA, metoda nieniszcząca.

Abstract

Commonly used destructive DNA isolation techniques consist of pulverization which leads to the complete destruction of smaller bones or irreversible damage to larger bones through the cutting of extensive fragments. The procedure is totally unacceptable when handling bones which are valuable for anthropological or religious reasons, as museum exhibits or due to emotional factors. Since the Department's team has already resolved this problem in the case of human teeth (A. Pilecka), efforts have been undertaken to develop a similar non-destructive technique for the isolation of DNA from human bones. To the best knowledge of the authors of the report, the study has yielded the world's first STR profile derived from DNA isolated from human bones by a technique that is non-destructive toward the bone surface.

Key words: bones, DNA isolation, nondestructive method.

Wprowadzenie

Pierwsza izolacja DNA z zębów ludzkich przy użyciu techniki nazwanej przez jej autorkę, Janice E. Cobb [1], nieniszczącą miała miejsce w 2002 r.

Introduction

The first DNA isolation from human teeth using a technique described by the author, Janice E. Cobb as non-destructive took place in the USA in 2002. She

w Stanach Zjednoczonych. Badaczka pobrała proszek do badania, rozwierając kanały nerwowe zębów, aż do komory zębowej włącznie. Zaletą tej techniki była nieszkodzona powierzchnia zęba, co umożliwiało dalsze badania, np. kamienia nazębne-go. Nie znaleźmy tej pracy i podejmując swoje badania, Pilecka [2] postanowiła zmodyfikować inną nieniszczącą technikę izolacji DNA z zębów z 2004 r. (Rohland i wsp. [3], zęby były zwierzęce) polegającą na ich płukaniu w stosunkowo agresywnym roztworze eluującym – poprzez uzyskiwanie dostępu do komory zębowej przez cienkie, elastyczne igły wprowadzone przez naturalne kanały nerwowe w korzeniach zęba. Praca zakończyła się w 2010 r. obroną rozprawy doktorskiej.

W 2015 r. pionierska idea Cobb została rozwinięta przez Hervellę i wsp. [4]. Autorzy postanowili oszczędzić kanały nerwowe i dowiercać się do komory z boku zęba, wybierając mało ważny lub uszkodzony fragment powierzchni. Z kolei w 2012 r. technika podobna do opisanej przez Rohland i wsp. [3] została z sukcesem zastosowana w odniesieniu do kości przez Gomesa i wsp. [5] i trzy lata później przez Bolnick i wsp. [6]. Techniki tego rodzaju rzeczywiście są nieniszczące w tym sensie, że po badaniu kość co prawda nadal istnieje, lecz wskutek konieczności zarówno agresywnego oczyszczenia powierzchni przed ekstrakcją DNA, jak i stosowania żrących roztworów elucyjnych jej powierzchnia po zakończeniu procedury wygląda zupełnie inaczej niż przed rozpoczęciem izolacji. Z tego powodu postanowiliśmy wypróbować nasz pomysł nawiercania otworów o bardzo małej średnicy i elucji DNA z wnętrza kości. Powierzchnia kości pozostaje wówczas praktycznie nietknięta, co jest przełomem z punktu widzenia opiekuna relikwii lub kustosa muzealnego, a dodatkowo staje się możliwe ewentualne późniejsze badanie depozytów biologicznych i mineralnych obecnych na jej powierzchni.

Materiały

Prace przeprowadzono na próbce NN kości ludzkiej, pochodzącej ze zwłok rozkładających się kilka miesięcy w terenie odkrytym w porze letniej, badanej na podstawie zlecenia prokuratury, w celu przeprowadzenia identyfikacji osobniczej. Próbkę kości została sprofilowana po badaniu niszczącym (po zmieleniu w płynnym azocie), a po pew-

collected powdered material for the study by drilling through the dental nerve canals as far as the dental cavity. An advantage of the technique was the fact that the tooth surface remained undamaged, allowing further investigations, for example of the dental calculus. We did not know the study, though, and when undertaking her research, Pilecka [2] decided to modify another known non-destructive technique of DNA isolation from teeth, which was proposed in 2004 (Rohland *et al.* [3], using animal teeth) and involved the soaking of teeth in a relatively aggressive elution solution. Access to the dental cavity was obtained by inserting thin flexible needles via natural nerve canals in the dental roots. The study culminated in 2010 with the award of the doctoral degree to the author.

In 2015, the pioneering idea proposed by Cobb was further developed by Hervella *et al.* [4]. The authors decided to preserve the nerve canals and reach the dental cavity by drilling through the lateral part of the tooth, selecting a surface fragment that was either of minor importance or already damaged. In 2012, a technique similar to that described by Rohland *et al.* [3] was successfully adapted for bone study by Gomes *et al.* [5], and three years later by Bolnick *et al.* [6]. Techniques of the type described above are indeed non-destructive in the sense that after the study the bone still exists. Nevertheless, since it is necessary to apply aggressive surface cleaning methods prior to DNA extraction, and use corrosive elution solutions, the bone surface looks completely different after the completion of the procedure than before starting the isolation process. For that reason, we decided to put to the test our idea of drilling very thin holes and eluting DNA from the inside of the bone. The bone surface then remains practically intact, which is a real breakthrough from the viewpoint of curators of religious relics or museum custodians. Additionally, the method allows future studies of biological and mineral deposits present on the bone surface.

Materials

The study was conducted using a sample of a bone belonging to an unknown individual. It was harvested from a corpse which had been decomposing outdoors for several months in the summer. The bone was examined upon an order issued by the Prosecutor's Office for the purpose of performing personal identification. A bone sample was subjected to profiling after a destruc-

nym czasie badanie było powtórzone z drugiego fragmentu tej samej kości, techniką nieniszczącą, a uzyskane wyniki porównane.

Metoda

Opracowana technika będzie, po wykonaniu większej liczby badań, które są w toku, podana do wiadomości w postaci odrębnej publikacji, dlatego w tym wstępnym doniesieniu nie podajemy szczegółów metodycznych, ograniczając się do ogólnego opisu opracowanej techniki i kłopotów, na które natrafiliśmy. Badanie polega na wywierceniu w substancji zbitiej kości otworu o średnicy 0,8 mm i długości ok. 2 cm. Do jednego końca otworu (wlot) wklejano igłę 0,9 mm, do drugiego (wylot) grubszą (aby zapobiec wzrostowi ciśnienia hydrostatycznego wewnątrz kości) igłę 1,1 mm. Wypróbowaliśmy do klejenia modelinę, pistolet klejowy, воск, klej montażowy, silikon i żywicę poliestrową. Tylko ten ostatni środek nie wpływał niekorzystnie na przebieg PCR i wytrzymał dość wysoką (+56°C) temperaturę elucji. Po uszczelnieniu powierzchni kości silikonem akwariowym (okazało się bowiem, że kość „poci się”, wypuszczając kropelki płynu eluującego w różnych miejscach, czasami nawet w dużej odległości od wywierconego kanału), przepompowywano przy użyciu pompy infuzyjnej poprzez wywiercony kanał, przez noc, ok. 1 ml roztworu eluującego podanego w pracy doktorskiej Pileckiej [2], ogrzanego do temperatury +56°C. Kość gotową do elucji przedstawiono na rycinie 1.

Uzyskany eluat był oczyszczany i zagęszczany na kolumnkach QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Pomiar za pomocą testu Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) wykazał, że uzyskano ok. 5% ilości DNA, którą wyizolowano z innego fragmentu tej samej kości, zmielonego w młynku kriogenicznym, przy uwzględnieniu różnic masy obu fragmentów. Profil DNA z obu fragmentów tej samej kości został uzyskany przy użyciu testu SGM (Applera).

Wyniki

Uzyskano ten sam profil DNA w tej samej kości badanej techniką niszczącą oraz nieniszczącą, co przedstawiono na rycinie 2.

Górna część ryciny 2. przedstawia elektroforegram uzyskany z DNA wyizolowanego z kości

tive test (following pulverization in liquid nitrogen). After some time, the test was repeated with another fragment of the same bone, using a non-destructive technique. Results obtained by both methods were then compared.

Method

After conducting more extensive studies, which are currently in progress, the technique we have developed will be described in a separate publication. As this is just a preliminary report, it does not contain any methodological particulars, and provides only a general outline of the technique itself and the challenges that we have encountered on the way. The examination involves drilling a hole, approx. 2 cm long and 0.8 mm in diameter, in the compact bone. A 0.9 mm needle was affixed to one end of the hole (inlet). A thicker needle, with a diameter of 1.1 mm, was attached to the other end (outlet) to prevent an increase in hydrostatic pressure inside the bone. For needle attachment, we tried out modelling clay, a glue gun, wax, fixing glue, silicone and polyester resin. Only the latter agent had no adverse impact on the course of the PCR reaction and tolerated the relatively high temperature (+56°C) of elution. After sealing the surface of the bone with an aquarium sealant (it had turned out that the bone was sweating, i.e. releasing droplets of the elution fluid in various places, sometimes even at a considerable distance from the drilled canal), an infusion pump was used to deliver via the drilled canal, overnight, approximately 1 ml of the elution solution described in Pilecka's doctoral dissertation [2], heated to the temperature of +56°C. A bone prepared for elution is shown in Fig. 1.

The eluate obtained by the method was purified and thickened on columns from the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A measurement performed by means of a Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) revealed that the method had yielded ca. 5% of the amount of DNA isolated from another fragment of the same bone ground in a cryogenic mill (with adjustments made for differences in the weight of both fragments). The DNA profile from both fragments of the same bone was acquired using an SGM test (Applera).

Results

An identical DNA profile was obtained for the same bone examined by the destructive and non-destructive techniques, as shown in Fig. 2.



Ryc. 1. Fragment kości przygotowany do elucji DNA
Fig. 1. Bone fragment, prepared to DNA preparation

techniką niszczącą, dolna – z tej samej kości techniką nieniszczącą. Interesujący wydaje się fakt, że elektroforogram z techniki nieniszczącej jest czytelniejszy, ponieważ nie zawiera rozdwojonych pików będących wynikiem niepełnej adenylacji. Uzyskana para elektroforogramów, jako historyczna, jest przedstawiona w postaci oryginalnej, pomimo wspomnianej wady. Niedoskonałe wyniki uzyskane techniką klasyczną (niszczącą) powinny zostać powtórzone, ale ponieważ eksperymentalna technika nieniszcząca dała taki sam, lecz czysty profil (bez podwojeń), odstąpiono od tego. W kolejnych zbadanych równolegle oboma technikami kościach nie obserwowaliśmy tej usterki technicznej.

Po badaniu igły, klej i silikon można usunąć bez widocznych śladów, otwory po igłach można zakleić modeliną w dobranym kolorze i kość może wrócić do relikwiarza albo zbiorów muzealnych, w stanie wizualnie nietkniętym. Obecnie izolujemy podaną techniką DNA między innymi z przypuszczalnych czaszek katyńskich z Muzeum Medycyny Sądowej oraz z przypuszczalnych relikwi błogosławionego Alojzego Ligudy.

Dyskusja i wnioski

Według posiadanych przez nas informacji opisany w tym doniesieniu profil DNA jest pierwszym udanym przypadkiem nieniszczącej powierzchni kości izolacji DNA. Opisana technika, wraz z innymi opracowanymi w naszym Zakładzie niedestrukcyjnymi technikami izolacji DNA z różnych źródeł,

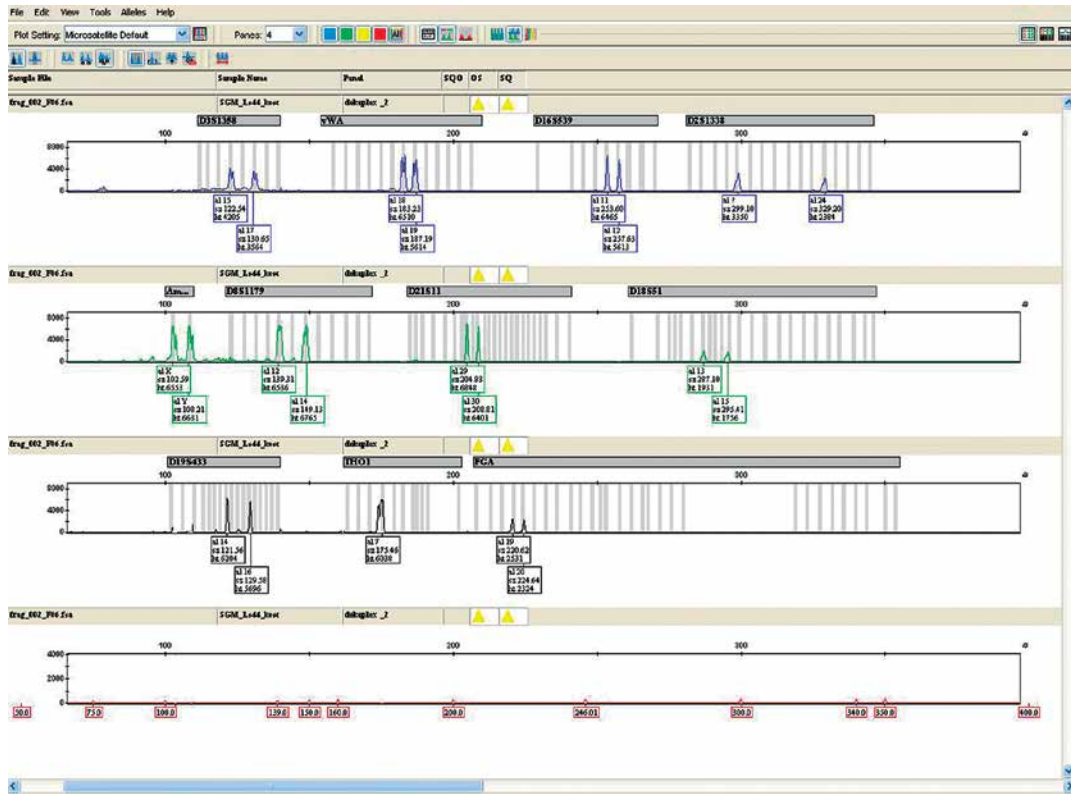
The upper section of Fig. 2 shows an electropherogram obtained for the DNA isolated from the bone by the destructive technique, and the lower section – isolated from the same bone by the non-destructive technique. Interestingly, the electropherogram obtained by the non-destructive technique is clearer, as it has no split peaks resulting from incomplete adenylation. The obtained pair of electropherograms, being historical data, is shown in its original form despite the defect mentioned above. Due to imperfect results obtained by the classical (destructive) technique the test should have been repeated, but since the experimental (non-destructive) technique produced the same but pure profile (with no doubling), no repeat test was performed. The technical defect was not observed in other bones examined in parallel by both techniques.

After completing the examination the needles, glue and silicone can be removed without visible traces. Needle holes can be filled with modelling clay in a matching colour, and the bone can be returned to a reliquary or a museum collection in a visually intact state. At present, the technique outlined above is being used for DNA isolation from skulls presumably belonging to the Katyn massacre victims, which are kept at the Museum of Forensic Medicine, and from relics purportedly belonging to Blessed Aloysius Liguda.

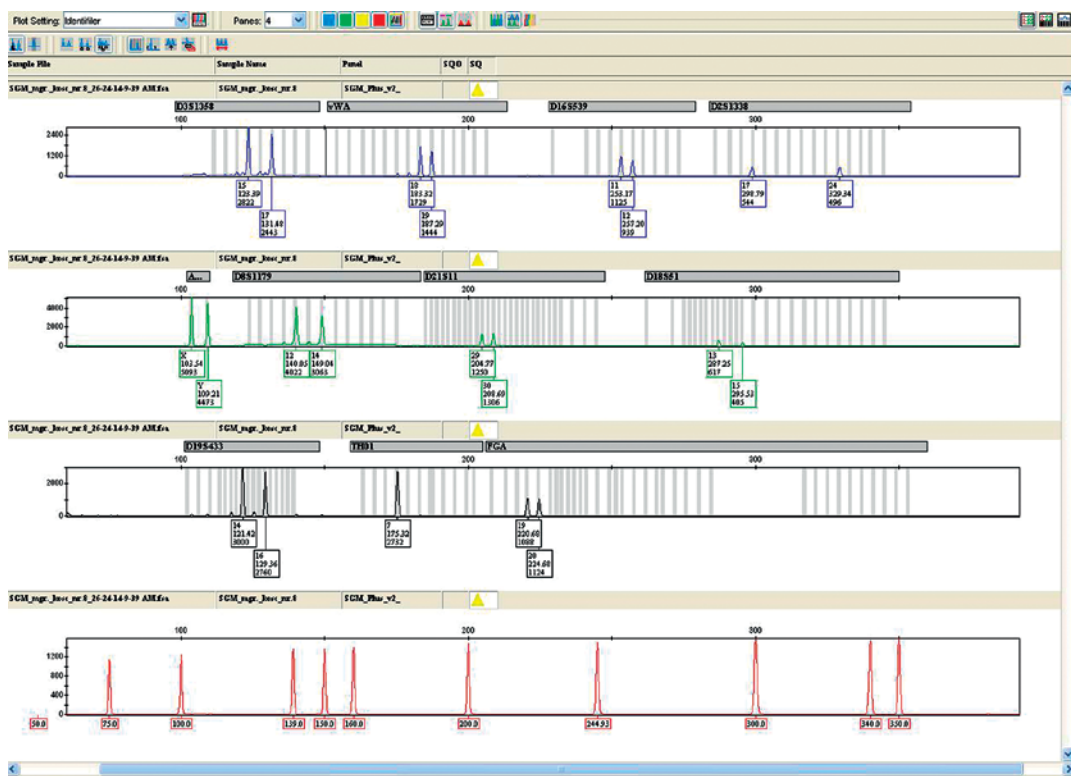
Discussion and conclusions

According to our current state of knowledge, the DNA profile described in the report represents the first

A



B



Ryc. 2. Profile DNA z tej samej kości ludzkiej, uzyskane techniką niszczącą (A) oraz nieniszcząco (B)
Fig. 2. DNA profiles, obtained from the same bone, by destructive (A) and nondestructive (B) approach

została publicznie zaprezentowana na warsztatach EAMHMS przeprowadzonych między 24 a 26 września 2015 r. w naszej Katedrze. O warsztatach tych były poinformowane w stosownym czasie wszystkie polskie Katedry Medycyny Sądowej. Sprawozdanie z warsztatów zostało, zgodnie z ostatnio otrzymaną informacją, przyjęte do druku w formie listu do redakcji.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

case of successful DNA isolation performed without damaging the bone surface. The technique outlined above, along with other non-destructive techniques of DNA isolation from various sources which have been developed at our Department, was presented to the public during the EAMHMS workshops held at the Department between 24 and 26 September 2015. Information about the workshops was disseminated to all Polish Chairs of Forensic Medicine at an appropriate time. Based on the recently obtained information, the workshop report has been accepted for print in the form of a Letter to the Editors.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Cobb JC. Ancient DNA Recovered by a Non-destructive method. *Ancient Biomolecules* 2002; 4: 169-172.
2. Pilecka A. Metoda własna izolacji kopalnego DNA z zębów. Rozprawa doktorska. Rada Wydziału Lekarskiego, Akademia Medyczna, Wrocław 2010.
3. Rohland N, Siedel H, Hofreiter M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques* 2004; 36: 814-821.
4. Hervella M, Iniguez MG, Izagirre N, Anta A, de-la-Rua C. Nondestructive Methods for recovery of biological material from human teeth for DNA extraction. *J Forens Sci* 2015; 60: 136-141.
5. Gomes C, Palomo-Díez S, Roig J, López-Parra AM, Baeza-Richer C, Esparza-Arroyo A, Gibaja J, Arroyo-Pardo E. Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *FSI: Genetics Supplement Series* 2015; 5: e279-e282.
6. Bolnick DA, Bonine HM, Mata-Míguez J, Kemp BM, Snow MH, LeBlanc SA. Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and mitochondrial DNA. *Am J Phys Anthropol* 2012; 147: 293-300.

Adres do korespondencji

Dominika Pluta
Zakład Techniki Molekularnych
Katedra Medycyny Sądowej
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ul. M. Curie-Skłodowskiej 52
50-369 Wrocław, Polska
e-mail: pluta-dominika@wp.pl

Address for correspondence

Dominika Pluta
Department of Molecular Techniques
Chair of Forensic Medicine
Wrocław Medical University
M. Curie-Skłodowskiej 52
50-369 Wrocław, Poland
e-mail: pluta-dominika@wp.pl