



Praca oryginalna
Original paper

Katarzyna Skonieczna¹, Jan Styczyński², Anna Krenska², Mariusz Wysocki², Aneta Jakubowska¹,
Tomasz Grzybowski¹

Izolacja RNA z krwi zabezpieczonej na kartach FTA – zastosowanie w genetyce klinicznej i sądowej

RNA isolation from bloodstains collected on FTA cards – application in clinical and forensic genetics

¹Katedra Medycyny Sądowej, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, Polska

²Katedra Pediatrii, Hematologii i Onkologii, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Bydgoszcz, Polska

¹Department of Forensic Medicine, Ludwik Rydygier *Collegium Medicum*, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz

²Chair of Pediatrics, Hematology and Oncology, Ludwik Rydygier *Collegium Medicum*, Nicolaus Copernicus University in Torun, Bydgoszcz

Streszczenie

Cel pracy: W ostatnich latach coraz częściej zwraca się uwagę na przydatność analiz RNA w badaniach z zakresu genetyki klinicznej oraz sądowej. Znaczącym problemem podczas prac nad RNA jest jednak jego niska stabilność wynikająca z aktywności RNaz. Tym samym unaocznia się potrzeba doskonalenia metod odpowiedniego zabezpieczania materiału biologicznego do analiz RNA. Rozwiązania technologiczne w postaci kart FTA (Whatman) mogą być użyteczne w kontekście zabezpieczania, transportu i przechowywania materiału biologicznego do badań RNA. Jednakże na ilość i jakość RNA uzyskiwanego z kart FTA mogą mieć wpływ różne warunki jego izolacji. Celem niniejszej pracy była analiza wydajności trzech metod izolacji RNA z krwi obwodowej zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) oraz ocena stabilności RNA w plamach krwi zabezpieczonych na takich kartach.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na plamach krwi zabezpieczonych na *FTA Classic Card* (Whatman) od 59 osób. RNA wyizolowano z wykorzystaniem *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics), *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx) oraz *TRIzol Reagent* (Life Technologies). RNA poddano ocenie ilościowej, a następnie przeprowadzono odwrotną transkrypcję oraz PCR w czasie rzeczywistym.

Wyniki: Przeprowadzone badania wskazują, że karty *FTA Classic Card* (Whatman) stanowią użyteczne podłoże do przechowywania w temperaturze pokojowej plam krwi do badań RNA. Ponadto wykazano, że metoda izolacji z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies) charakteryzuje się najwyższą skutecznością i wydajnością w przypadku próbek przechowywanych do około 2 lat.

Wnioski: Przeprowadzone badania wykazały, że karty FTA mogą stanowić użyteczne podłoże do badań RNA w genetyce klinicznej i sądowej.

Słowa kluczowe: plamy krwi, RNA, degradacja RNA, ekspresja genów, karty FTA.

Abstract

Aim of the study: In recent years, RNA analysis has been increasingly used in clinical and forensic genetics. Nevertheless, a major limitation of RNA-based applications is very low RNA stability in biological material, due to the RNase activity. This highlights the need for improving the methods of RNA collection and storage. Technological approaches such as *FTA Classic Cards* (Whatman) could provide a solution for the problem of RNA degradation. However, differ-

ent methods of RNA isolation from FTA cards could have diverse effects on RNA quantity and quality. The purpose of this research was to analyze the utility of three different methods of RNA isolation from peripheral blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman). The study also aimed at assessing RNA stability in bloodstains deposited on FTA cards.

Material and methods: The study was performed on peripheral bloodstains collected from 59 individuals on *FTA Classic Cards* (Whatman). RNA was isolated with *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics), *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx) and *TRIzol Reagent* (Life Technologies). RNA was subjected to quantitative analysis followed by reverse transcription and Real – Time PCR reaction.

Results: The study has shown that *FTA Classic Cards* (Whatman) are useful tools for storing bloodstains at room temperature for RNA analysis. Moreover, the method of RNA extraction employing *TRIzol Reagent* (Life Technologies) provides the highest efficiency and reproducibility for samples stored for no more than 2 years.

Conclusions: The FTA cards are suitable for collecting and storing bloodstains for RNA analysis in clinical and forensic genetics.

Key words: bloodstains, RNA, RNA degradation, gene expression, FTA cards.

Wprowadzenie

Profilowanie DNA uzyskanego z materiału biologicznego w postaci krwi jest powszechnie wykorzystywane w genetyce sądowej do badań pokrewieństwa, indywidualizacji plam zabezpieczonych na miejscu zdarzeń kryminalnych, a także do identyfikacji ofiar katastrof czy wypadków. W ostatnich latach coraz częściej zwraca się również uwagę na przydatność analiz RNA w badaniach genetyczno-sądowych. Ostatnie doniesienia wskazują na użyteczność mRNA w odróżnianiu m.in. krwi obwodowej od menstruacyjnej [1], co może mieć istotne znaczenie w ustalaniu szczegółów przebiegu przestępstwa [za 2]. Ponadto analiza ekspresji genów we krwi może być również informatywna w określaniu przyczyny zgonu, np. na skutek niedotlenienia, uduszenia czy zażycia środków psychoaktywnych, takich jak metamfetamina [za 3]. Coraz więcej doniesień wskazuje również na użyteczność profilowania RNA z krwi w genetyce klinicznej. W szczególności wskazuje się na wysoką, potencjalną użyteczność profilowania RNA w diagnostyce nowotworów [4–7] czy chorób autoimmunologicznych [8].

Rosnące zainteresowanie analizami RNA w genetyce klinicznej i sądowej pociąga za sobą konieczność doskonalenia metod odpowiedniego zabezpieczania RNA. Istotnym problemem podczas prac nad RNA jest bowiem jego niska stabilność. Wszelkie (zarówno w materiale biologicznym,

Introduction

The profiling of DNA obtained from biological material in the form of blood is commonly used in forensic genetics for kinship analysis, individualization of bloodstains collected at crime scenes, and identification of disaster or accident victims. In recent years, attention has also increasingly focused on the usefulness of RNA analysis in forensic genetic applications. Recent reports indicate that mRNA is helpful, for example, for distinguishing between peripheral and menstrual blood [1], which may play a significant role in establishing the detailed course of events during a crime [after 2]. Furthermore, the analysis of gene expression in blood may be informative for determining the cause of death, for instance due to hypoxia, asphyxiation or use of psychoactive agents such as methamphetamine [after 3]. In addition, there is a growing number of reports indicating that the profiling of RNA derived from blood samples is a valuable technique in clinical genetics. In particular, RNA profiling is claimed to be potentially highly useful in the diagnosis of cancer [4–7] or autoimmune diseases [8].

In response to a growing interest in RNA analysis in clinical and forensic genetics it becomes necessary to improve methods ensuring appropriate RNA collection and storage. A significant problem that must be addressed in RNA-based applications is low RNA stability. RNA molecules are rapidly degrad-

jak i środowisku zewnętrznym) i trudne do inaktywowania, stabilne rybonukleazy (RNAzy) degradowują w bardzo szybkim tempie cząsteczki RNA. Bardzo istotne jest zatem odpowiednie zabezpieczenie śladu biologicznego, zanim nastąpi całkowity rozkład cząsteczek RNA. Wydaje się, że opracowane przez firmę Whatman karty FTA mogą stanowić rozwiązanie tego problemu. Karty FTA wysycone związkiem, który prowadzi do lizy błon komórkowych i denaturacji białek, jednocześnie unieruchamiają i stabilizują zawarte w materiale biologicznym kwasy nukleinowe. Tym samym materiał biologiczny można przechowywać w ten sposób w temperaturze pokojowej przez wiele lat. Z powyższych względów karty FTA są używane od dawna do zabezpieczania krwi do badań DNA. Zważywszy jednak na fakt, że RNA cechuje się niższą stabilnością niż DNA, powstaje konieczność zweryfikowania, czy karty FTA są równie przydatne do zabezpieczania, transportu i przechowywania krwi na potrzeby badań RNA. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że różne metody izolacji RNA mogą mieć wpływ na ilość oraz jakość, a tym samym na użyteczność ekstraktów RNA uzyskiwanych z kart FTA. W niniejszej pracy dokonano oceny przydatności kart FTA do zabezpieczenia krwi obwodowej na potrzeby analiz RNA. Zweryfikowano również, która z metod izolacji pozwala na uzyskanie z kart FTA dostatecznie dużej ilości i wysokiej jakości RNA, który można wykorzystać do analizy ekspresji genów.

Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była analiza wydajności trzech metod izolacji RNA z krwi obwodowej zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman), a także ocena stabilności RNA w plamach krwi zabezpieczonych na takich kartach.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły plamy ok. 1 ml krwi zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman). Krew pobrano od nieletnich pacjentów z ostrymi białaczkami limfoblastycznymi i mieloblastycznymi, którzy zostali poddani skojarzonej chemioterapii wielolekowej. Badania zostały pozytywnie zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera

ed under the influence of ribonucleases (RNAses) which are ubiquitous (present both in the biological material and the external environment), highly stable and difficult to inactivate. Therefore, it is vital to secure biological traces properly before RNA molecules become completely degraded. FTA cards developed by Whatman seem to be a good solution to the problem outlined above. FTA cards, impregnated with a chemical agent that lyses cell membranes and causes protein denaturation, simultaneously immobilize and stabilize nucleic acids contained in biological material. Consequently, biological material preserved on FTA cards can be stored at room temperature for many years. On account of these properties, FTA cards have been used for collecting blood samples for DNA tests for a long time. However, considering that RNA is less stable than DNA, it becomes necessary to verify whether FTA cards are equally useful for the collection, transport and storage of blood for RNA testing. At the same time, it is important to note that different methods of RNA isolation may have an effect on the quantity and quality (and thus on the usability) of RNA extracts derived from FTA cards. The present study was an attempt to assess the suitability of FTA cards for the collection and storage of peripheral blood for RNA tests. The study also sought to verify which of the available isolation methods makes it possible to extract from FTA cards a sufficient quantity of high-quality RNA which can be used for gene expression analysis.

Aim of study

The primary aim of the study was to analyze the efficiency of three methods of RNA isolation from peripheral blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman). Another goal was to assess RNA stability in bloodstains deposited on FTA cards.

Material and methods

The study material consisted of bloodstains, approximately 1 ml in volume, collected on *FTA Classic Cards* (Whatman). Blood samples were taken from adolescent patients with acute lymphoblastic and myeloblastic leukaemias who were treated with multidrug combination chemotherapy. The study was approved by the Bioethics Committee at the

w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (zgoda nr: KB 605/2011). Próbkę krwi obwodowej pobrano do badań za zgodą opiekunów prawnych dzieci w Katedrze i Klinice Pediatrii, Hematologii i Onkologii *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy (CM UMK), a badania laboratoryjne przeprowadzono w Katedrze Medycyny Sądowej CM UMK.

Do oceny wydajności trzech metod izolacji RNA wykorzystano krew obwodową zabezpieczoną od 10 pacjentów na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) i pozostawioną do wysuszenia od ok. 24 do ok. 72 godzin w temperaturze pokojowej.

Do badań nad stabilnością RNA we krwi zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) użyto 59 próbek, przy czym próbki krwi zabezpieczone na kartach *FTA* od 6 pacjentów przechowywano w temperaturze pokojowej przez 24 miesiące, od 14 pacjentów przez 30 miesięcy, od 28 pacjentów przez 36 miesięcy, a od 11 pacjentów przez 48 miesięcy.

Izolacja RNA z kart FTA z wykorzystaniem zestawu *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx)

Krew zabezpieczoną od dziesięciu pacjentów na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) wykorzystano do izolacji RNA z użyciem zestawu *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx). Fragmenty kart o wielkości ok. 0,5 cm² inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w 400 µl buforu RL (EURx). Następnie dodawano 100 µl buforu Lyse ALL (EURx) i wirowano przy 12 000 rcf przez 2 minuty. Supernatant przenoszono do kolumny homogenizacyjnej i traktowano DNazą oraz ekstrakcji RNA zgodnie z protokołem podanym przez producenta zestawu. RNA zawieszano w 50 µl wody destylowanej, wolnej od RNaz i DNaz (Gibco).

Izolacja RNA z kart FTA z wykorzystaniem zestawu *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics)

Plamy krwi zabezpieczone od 10 pacjentów na fragmentach kart *FTA Classic Card* (Whatman) o wielkości ok. 0,5 cm² inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut w *Lysis/Binding Buffer* (Roche Diagnostics), a następnie umieszczano

Nicolaus Copernicus University *Collegium Medicum* in Bydgoszcz (permit no.: KB 605/2011). Samples of peripheral blood were collected for the study after obtaining written informed consent from the children's guardians. Blood sampling was performed at the Department of Paediatrics, Haematology and Oncology, Nicolaus Copernicus University *Collegium Medicum* in Bydgoszcz (CM UMK), and laboratory tests were carried out at the Department of Forensic Medicine (CM UMK).

Three RNA isolation methods were assessed for their efficiency using peripheral blood which was collected from 10 patients on *FTA Classic Cards* (Whatman) and left to dry at room temperature for a period ranging from about 24 to about 72 hours.

Tests investigating RNA stability in blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman) were conducted with 59 samples according to the following procedure. FTA card-preserved blood samples taken from 6 patients were stored at room temperature for 24 months, from 14 patients – for 30 months, from 28 patients – for 36 months and from 11 patients – for 48 months.

RNA isolation from FTA cards using the *Universal RNA/miRNA Purification Kit* (EURx)

Blood samples collected on *FTA Classic Cards* (Whatman) from 10 patients were used for RNA isolation using the *Universal RNA/miRNA Purification Kit* (EURx). FTA card pieces, approximately 0.5 cm² in size, were incubated in 400 µl of RL buffer (EURx) at room temperature for 30 minutes. Next, a 100 µl portion of the Lyse ALL buffer (EURx) was added, and the mixture was centrifuged at 12,000 rcf for two minutes. The supernatant was transferred into a homogenization column and treated with DNase. RNA was extracted according to the protocol specified by the kit manufacturer. RNA was suspended in 50 µl of distilled water free from RNases and DNases (Gibco).

RNA isolation from FTA cards using the *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics)

Bloodstains collected from 10 patients on pieces of *FTA Classic Cards* (Whatman), approximately in 0.5 cm² in size, were incubated in the *Lysis/Binding*

w kolumnie filtracyjnej *High Pure Filter Tube* (Roche Diagnostics), traktowano DNAzą oraz uzyskiwano RNA zgodnie z protokołem podanym przez producenta zestawu *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics). RNA zawieszano w 50 µl *Elution Buffer* (Roche Diagnostics).

Izolacja RNA z kart FTA z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies)

Krew zabezpieczoną od 59 pacjentów na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) wykorzystano do izolacji RNA z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies). Fragmenty kart o wielkości ok. 0,5 cm² umieszczano w 500 µl *TRIzol Reagent* (Life Technologies) i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 100 µl chloroformu (Avantor) i mieszano przez 15 sekund. Mieszaninę inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Próbkę wirowano przez 15 minut w 4°C przy 12 000 rcf. Górną fazę przenoszono do nowej probówki i dodawano 250 µl izopropanolu (Sigma-Aldrich). Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbkę wirowano przez 10 minut w 4°C przy 12 000 rcf. Osad przemywano w 500 µl 75% etanolu (Avantor) i wirowano przez 5 minut w 4°C przy 7500 rcf. Po wysuszeniu osad zawieszano w 50 µl wody destylowanej, wolnej od RNAz i DNAz (Gibco). Nie więcej niż 2 µg ekstraktu uzyskanego z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies) traktowano enzymem *DNase I (RNase-free)* (Life Technologies) zgodnie z protokołem producenta zestawu. Próbkę RNA traktowaną DNAzą oczyszczano na kolumnkach filtracyjnych (EURx) zgodnie z protokołem oczyszczania RNA po reakcjach enzymatycznych podanym przez producenta zestawu *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx).

Jakościowa i ilościowa analiza wyizolowanego RNA

Oczyszczone po traktowaniu DNAzą ekstrakty RNA oceniano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem aparatu *DS-11* (DeNovix).

Obecność zanieczyszczeń RNA w postaci DNA oceniano z wykorzystaniem zestawu *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scien-

Buffer (Roche Diagnostics) at room temperature for 30 minutes. In the next step, they were placed in a filtration column (*High Pure Filter Tube* (Roche Diagnostics)) and treated with DNase, producing RNA according to the protocol specified by the manufacturer of the *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics). RNA was suspended in 50 µl of the *Elution Buffer* (Roche Diagnostics).

RNA isolation from FTA cards using the *TRIzol Reagent* (Life Technologies)

Blood samples collected on *FTA Classic Cards* (Whatman) from 59 patients were used for RNA isolation using the *TRIzol Reagent* (Life Technologies). FTA card pieces, approximately 0.5 cm² in size, were placed in 500 µl of the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) and incubated at room temperature for 30 minutes. Next, a 100 µl portion of chloroform (Avantor) was added, and mixed for 15 seconds. The mixture was incubated at room temperature for three minutes. The sample was centrifuged at 12,000 rcf at 4°C for 15 minutes. The top phase was transferred to a new test tube and combined with 250 µl of isopropanol (Sigma-Aldrich). The mixture was incubated at room temperature for 10 minutes. In the next step, the sample was centrifuged at 12,000 rcf at 4°C for 10 minutes. The precipitate was washed in 500 µl of 75% ethanol (Avantor) and centrifuged at 7,500 rcf at 4°C for 5 minutes. After drying, the precipitate was suspended in 50 µl of distilled water free from RNAses and DNAses (Gibco). A portion of not more than 2 µg of the extract obtained with the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) was treated with the enzyme *DNase I (RNase-free)* (Life Technologies) according to the protocol supplied by the kit manufacturer. DNase-treated RNA samples were purified in filtration columns (EURx) according to the protocol for RNA purification after enzymatic reactions provided by the manufacturer of the *Universal RNA/miRNA Purification Kit* (EURx).

Quantitative and qualitative assessment of isolated RNA

The RNA extracts, following their purification after DNase treatment, were assessed spectrophotometrically using a *DS-11* spectrophotometer (DeNovix).

tific) zgodnie z protokołem producenta przy użyciu instrumentu *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Life Technologies).

10 µl RNA poddawano odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Life Technologies) zgodnie z protokołem producenta. Następnie cDNA poddawano reakcji PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem *TaqMan® Gene Expression Assay* dla genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* (Hs03929097_g1) (Life Technologies) przy użyciu instrumentu *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Life Technologies) zgodnie z wytycznymi producenta.

Analiza statystyczna

Średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe skalkulowano z wykorzystaniem programu Excel. Istotność statystyczną różnic w stężeniach RNA pomiędzy grupami analizowano za pomocą testu *t*-Studenta z wykorzystaniem pakietu STATISTICA v 12.5 (Statsoft).

Wyniki

Porównanie metod izolacji RNA z *FTA Classic Card* (Whatman)

Ogólną charakterystykę zastosowanych metod izolacji RNA przedstawiono w tabeli I. Najdłuższy czas przeprowadzenia procedury izolacji RNA oraz traktowania DNAzą otrzymanych ekstraktów wynosił ok. 4,5 godziny na jedną próbkę i dotyczył metody wykorzystującej odczynnik *TRIZOL Reagent* (Life Technologies). W przypadku dwóch pozostałych metod (z użyciem zestawu firmy EURx oraz zestawu firmy Roche Diagnostics) całkowity czas izolacji RNA oraz traktowania DNAzą był zbliżony i wynosił ok. jednej godziny.

Największe stężenie RNA (średnio ok. 24 ng/µl) uzyskano dla próbek izolowanych przy użyciu *TRIZOL Reagent* (Life Technologies). Stężenie ekstraktów RNA wyizolowanych zestawami dostępnymi komercyjnie było ponad trzykrotnie niższe i wynosiło średnio ok. 7 ng/µl w przypadku zestawu firmy Roche Diagnostics oraz ok. 3 ng/µl w przypadku zestawu firmy EURx. Czystość uzyskanych ekstraktów RNA, wyrażona stosunkiem A_{260}/A_{280} wynosiła średnio powyżej 2,2.

RNA contamination with DNA molecules were assessed with the *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol, using the *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Life Technologies).

10 µl portion of RNA was subjected to reverse transcription using the *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor* (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Next, cDNA was subjected to Real-Time PCR with the *TaqMan® Gene Expression Assay* for the housekeeping gene *GAPDH* (Hs03929097_g1) (Life Technologies) using the *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's guidelines.

Statistical analysis

The arithmetic mean and standard deviation were calculated using the Excel software. The statistical significance of differences in RNA concentration between the groups was determined with the use of Student's *t*-test, implemented in the STATISTICA v 12.5 package (Statsoft).

Results

Comparison of RNA isolation methods from *FTA Classic Cards* (Whatman)

The general characteristics of the RNA isolation methods employed in the study are listed in Table I. The procedure of RNA isolation and DNase treatment of the resulting extracts was the most time-consuming when the method based on the *TRIZOL Reagent* (Life Technologies) was used, taking approximately 4.5 hours per one sample to complete. In the other two methods studied (based on the EURx and Roche Diagnostics kits), the total time of RNA isolation and DNase treatment was similar and reached approximately one hour.

The highest RNA concentration (on average approximately 24 ng/µl) was obtained for samples isolated with the *TRIZOL Reagent* (Life Technologies). The concentrations of RNA extracts isolated using the commercially available kits were over three times lower, the mean values being ca. 7 ng/µl for the Roche Diagnostics kit and ca. 3 ng/µl for the EURx kit. The mean purity of the RNA extracts determined by the A_{260}/A_{280} ratio, was above 2.2

Tabela I. Charakterystyka metod izolacji RNA z krwi zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman)
Table I. Specification of different methods of RNA isolation from blood stains collected on *FTA Classic Card* (Whatman)

Metoda izolacji Isolation method	Czas izolacji próbki [min] Sample isolation time [min]	Średnie stężenie RNA [ng/μl] Mean RNA concentration [ng/μl]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Średnie stężenie DNA [ng/μl] Mean DNA concentration [ng/μl]	Próbki RNA pozabawione DNA [%] DNA-free RNA samples [%]	Wydajność amplifikacji mRNA [%] mRNA amplification efficiency [%]	Średnie CT Mean CT
EURx	50	3,32 ±2,54	2,93 ±0,85	0,01 ±0,003	90	100	25,58 ±5,98
Roche Diagnostics	60	6,77 ±4,53	2,20 ±0,62	0	100	80	31,13 ±6,65
TRIzol Reagent	270	23,82 ±11,34	2,45 ±0,59	0	100	100	26,43 ±6,54

Wszystkie ekstrakty RNA izolowane przy użyciu zestawu firmy Roche Diagnostics lub *TRIzol Reagent* (Life Technologies) były pozabawione DNA, który poddawałby się amplifikacji zestawem *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific). W przypadku jednego z ekstraktów RNA (próbka o stężeniu 2,6 ng/μl) wyizolowanych z wykorzystaniem zestawu firmy EURx zaobserwowano obecność DNA (0,009 ng/μl) po amplifikacji zestawem *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific). Pozostałe ekstrakty RNA (9 z 10 próbek) uzyskane przy użyciu zestawu firmy EURx wykazały brak DNA możliwego do powielenia zestawem *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Dla wszystkich ekstraktów RNA uzyskanych z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies) lub przy użyciu zestawu firmy EURx i poddanych odwrotnej transkrypcji stwierdzono obecność fragmentu genu *GAPDH* w wyniku PCR w czasie rzeczywistym (przykładowy wynik PCR w czasie rzeczywistym zamieszczono na ryc. 1.). W próbkach cDNA uzyskanych dla ekstraktów RNA wyizolowanych przy użyciu zestawu firmy Roche Diagnostics fragment genu *GAPDH* udało się oznaczyć w reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 8 z 10 badanych próbek.

Stabilność RNA we krwi zabezpieczonej na *FTA Classic Card* (Whatman)

Charakterystykę RNA uzyskanego z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies) z krwi przechowywanej w różnych odstępach czasu na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) przedstawiono w tabeli II.

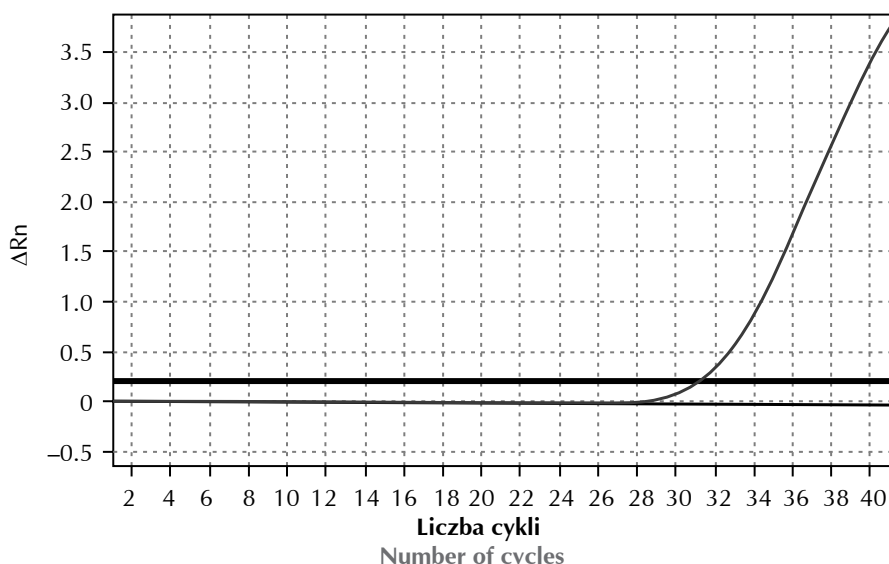
All the RNA extracts isolated with the Roche Diagnostics kit or the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) were free from DNA that could be amplified using the *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific). In contrast, one of the RNA extracts (sample with a concentration of 2.6 ng/μl) isolated with the EURx kit revealed the presence of DNA (0.009 ng/μl) after amplification performed with the *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific). The remaining RNA extracts (9 out of 10 samples) obtained using the EURx kit contained no DNA amplifiable with the *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

All the RNA extracts obtained using the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) or the EURx kit and subjected to reverse transcription were found to contain a fragment of the *GAPDH* gene after Real-Time PCR (a sample Real-Time PCR result is shown in Fig. 1). In the case of cDNA samples obtained for the RNA extracts isolated with the Roche Diagnostics kit, a fragment of the *GAPDH* gene was detected with Real-Time PCR in 8 out of 10 samples.

RNA stability in blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman)

The characteristics of RNA obtained with the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) from blood-stains stored on *FTA Classic Cards* (Whatman) for various time intervals are listed in Table II.

The highest RNA concentrations were obtained for the samples stored on *FTA Classic Cards* (What-



Rycina 1. Przykładowa krzywa amplifikacji fragmentu genu *GAPDH* uzyskana w wyniku reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Figure 1. An example of an Real – Time PCR amplification curve obtained for *GAPDH* gene

Największe stężenia RNA uzyskano dla próbek przechowywanych ok. dwóch lat na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) (średnio ok. 29,08 ng/μl). Stężenie RNA uzyskanego po pozostałych okresach przechowywania na kartach było zbliżone (średnio ok. 20 ng/μl). Różnice pomiędzy stężeniami ekstraktów RNA uzyskanymi z krwi przechowywanej na kartach FTA w różnych odstępach czasu nie były istotne statystycznie. Czystość uzyskanych ekstraktów RNA, wyrażona stosunkiem A_{260}/A_{280} wynosiła średnio powyżej 1,9. W otrzymanych izolatach RNA stwierdzono brak obecności DNA, który poddawał-

man) for about two years (on average approximately 29.08 ng/μl). The concentrations of RNA obtained after other periods of storage on the FTA cards were similar (on average approximately 20 ng/μl). Differences identified between the concentrations of RNA extracts derived from bloodstains stored on FTA cards at various time intervals were statistically insignificant. The mean purity of the RNA extracts, determined by the A_{260}/A_{280} ratio, was above 1.9. The RNA isolates failed to contain any DNA that could be amplified with the *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

Tabela II. Charakterystyka RNA uzyskanego z krwi przechowywanej w różnych odstępach czasu na kartach *FTA Classic Card* (Whatman)

Table II. Specification of RNA samples obtained from blood stains stored on *FTA Classic Card* (Whatman) for various time intervals

Czas przechowywania [miesiące] Storage time [months]	Liczba próbek Number of samples	Średnie stężenie RNA [ng/μl] Mean RNA concentration [ng/μl]	A_{260}/A_{280}	Średnie stężenie DNA [ng/μl] Mean DNA concentration [ng/μl]	Wydajność amplifikacji mRNA [%] mRNA amplification efficiency [%]	Średnie CT Mean CT
0	10	23,82 ±11,34	2,45 ±0,59	0	100	26,43 ±6,54
24	6	29,08 ±23,90	2,04 ±0,85	0	100	35,66 ±3,12
30	14	17,61 ±13,00	1,91 ±0,47	0	71	37,86 ±2,18
36	28	19,17 ±15,81	1,93 ±0,39	0	67	37,88 ±2,83
48	11	19,23 ±5,78	1,91 ±0,49	0	54	37,70 ±4,43

by się powieleniu zestawem *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit* (Thermo Fisher Scientific).

We wszystkich próbkach cDNA uzyskanych z materiału biologicznego przechowywanego na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) do ok. 72 godzin oraz przechowywanych do ok. dwóch lat stwierdzono w wyniku reakcji PCR w czasie rzeczywistym obecność fragmentu genu *GAPDH*. Możliwość oznaczenia cDNA dla fragmentu genu *GAPDH* malała wraz z upływem czasu w taki sposób, że tylko dla ok. 54% próbek inkubowanych na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) przez ok. 4 lata stwierdzono obecność fragmentu genu *GAPDH*.

Omówienie i wnioski

W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się na użyteczność analiz mRNA dla celów genetyki klinicznej i sądowej. Należy jednak mieć na uwadze, że materiał w postaci mRNA jest wysoce niestabilny, a zabezpieczony w warunkach innych niż głębokie zamrożenie bardzo szybko ulega degradacji, co uniemożliwia jego analizę. W niniejszej pracy wykorzystano karty *FTA Classic Card* (Whatman) do zabezpieczania i przechowywania w temperaturze pokojowej plam krwi dla celów analiz ekspresji genów. W pracy zastosowano i porównano trzy metody izolacji RNA z krwi obwodowej zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) oraz dokonano wstępnej oceny stabilności RNA w plamach krwi zabezpieczonych na tych kartach.

Do izolacji RNA wykorzystano dwa komercyjnie dostępne zestawy *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics) oraz *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx), a także odczynnik *TRIzol Reagent* (Life Technologies). Czystość preparatów RNA oceniano na podstawie współczynnika A260/A280. Otrzymane preparaty RNA o stężeniu większym niż ok. 10 ng/μl charakteryzowały się wysoką czystością (współczynnik A260/A280 mieścił się w przedziale 1,9–2,1). W przypadku próbek RNA o stężeniach poniżej ok. 10 ng/μl otrzymane wartości współczynnika A260/A280 pozostawały poza zakresem 1,9–2,1, co może bezpośrednio nie odzwierciedlać jakości wyizolowanego RNA, a wynikać z niewielkich różnic pomiędzy pomiarami przy 260 nm oraz 280 nm. Należy przy tym zauważyć, że badania z wykorzystaniem użytych w pracy metod izolacji pozwoliły uzyskać RNA, który nadawał się do dalszych analiz, tj. odwrotnej transkrypcji oraz PCR

All the cDNA samples obtained from the biological material stored on *FTA Classic Cards* (Whatman) for a period of up to about 72 hours and up to about two years showed amplification of the *GAPDH* gene fragment in Real-Time PCR. The possibility of the *GAPDH* gene amplification in Real-Time PCR reaction was found to decrease with time, so that only approximately 54% of all samples incubated on *FTA Classic Cards* (Whatman) for about 4 years showed *GAPDH* gene fragment amplification.

Discussion and conclusions

Recent years have seen a growing focus on the usefulness of mRNA analysis in clinical and forensic genetic applications. However, it is important to note that material in the form of mRNA is highly unstable and all collection methods with the exception of deep freezing cause rapid mRNA degradation, making it unsuitable for analysis. The present study was conducted with *FTA Classic Cards* (Whatman) which are designed for the collection and storage of bloodstains at room temperature for the purpose of gene expression analysis. The study analyzed and compared three methods of RNA isolation from peripheral blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman). In addition, a preliminary assessment of RNA stability in bloodstains deposited on FTA cards was performed.

RNA isolation was carried out using two commercially available kits – *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics) and *Universal RNA/miRNA Purification* (EURx) – and the *TRIzol Reagent* (Life Technologies). The purity of RNA samples was assessed by determining the A260/A280 ratio. The RNA samples with concentrations exceeding approximately 10 ng/μl exhibited high levels of purity (with the A260/A280 ratio in the range from 1.9 to 2.1). In contrast, the A260/A280 ratio determined for RNA samples with concentrations below approximately 10 ng/μl were outside the 1.9–2.1 range. The finding may not be a direct reflection of the quality of isolated RNA but be attributable to minor differences between measurements performed at 260 nm and 280 nm. Another point to be made is that assays based on the isolation methods employed in the study made it possible to obtain RNA that was suitable for further analyses including reverse transcription and Real-Time PCR.

w czasie rzeczywistym. Przeprowadzone badania pozwalają stwierdzić, że najlepszą spośród zastosowanych metod izolacji RNA z krwi zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) jest podejście wykorzystujące odczynnik *TRIzol Reagent* (Life Technologies). W istocie dzięki zastosowaniu tej metody uzyskiwano największe stężenia RNA, a otrzymany preparat był wolny od zanieczyszczeń DNA i pozwalał na oznaczenie genu metabolizmu podstawowego *GAPDH* we wszystkich próbkach krwi, które inkubowano na kartach FTA w czasie do ok. 72 godzin. Wcześniejsze doniesienia, uwzględniające ok. jeden miesiąc przechowywania w temperaturze pokojowej materiału biologicznego na kartach FTA również wskazują na wysoką stabilność RNA zabezpieczonego w ten sposób [9]. Jednocześnie badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują, że około dwuletnie przechowywanie plam krwi na kartach FTA nie wpływa znacząco negatywnie na możliwość analizy mRNA, ponieważ cząsteczkę tę udało się oznaczyć we wszystkich analizowanych próbkach. Przeprowadzona w pracy ocena stabilności RNA w plamach krwi zabezpieczonych na kartach FTA sugeruje jednak, że wraz z upływem czasu maleje szansa na analizę ekspresji genów w próbce. W istocie po upływie ok. 4 lat od czasu zdeponowania plam krwi na kartach FTA analiza ekspresji genu *GAPDH* była możliwa w mniej więcej połowie badanych próbek. Przyczyn spadku oznaczalności mRNA w próbkach krwi zabezpieczonych na kartach FTA należy najprawdopodobniej upatrywać w postępującej degradacji tych cząsteczek. W istocie wydajność izolacji RNA była podobna w próbkach zabezpieczonych w różnych odstępach czasowych (średnio ok. 20 ng/μl), przy czym możliwość oznaczenia ekspresji *GAPDH* stopniowo malała wraz z upływem czasu. Tym samym wskazane jest podjęcie dalszych badań zmierzających do weryfikacji, czy stopień degradacji mRNA na kartach FTA wraz z upływem czasu można zmniejszyć za pomocą głębokiego mrożenia plam krwi zabezpieczonej na kartach *FTA Classic Card* (Whatman) [9–11].

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że karty *FTA Classic Card* (Whatman) stanowią użyteczne podłoże do transportu i przechowywania w temperaturze pokojowej plam krwi do badań RNA przez okres do ok. 2 lat. Wykazano ponadto, że spośród wykorzystanych trzech metod izolacji, ta z wykorzystaniem odczynnika *TRIzol Reagent* (Life Technologies) charakteryzuje się najwyższą skutecznością

The study's findings show that the approach using the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) is the best of all studied methods of isolating RNA from blood collected on *FTA Classic Cards* (Whatman). The conclusion is warranted on the grounds that the method made it possible to obtain the highest RNA concentrations, and the resulting RNA sample was free of DNA contamination and suitable for amplification the housekeeping gene *GAPDH* in all blood samples incubated on FTA cards for a period of up to about 72 hours. Previous reports, based on the storage of biological material collected on FTA cards at room temperature for about a month, also indicate a high stability of RNA collected via this method [9]. At the same time, tests carried out within the framework of this study show that the storage of bloodstains on FTA cards for a period of about two years has no significant adverse effect on the possibility of mRNA analysis, as the molecule was successfully assayed in all the samples tested. However, the study's assessment of RNA stability in bloodstains collected on FTA cards suggests that the possibility of successful gene expression analysis in the sample decreases in the course of time. Indeed, about four years after bloodstain deposition on FTA cards the analysis of *GAPDH* gene expression was only possible in approximately a half of all the samples tested. The observed decline in mRNA quantifiability in blood samples collected on FTA cards can most likely be attributed to the progressive degradation of the molecules. Notably, the efficiency of RNA isolation was similar in samples collected at various time points (on average approximately 20 ng/μl), but the possibility of determining *GAPDH* expression decreased gradually with time. In view of the findings above, further studies are warranted to verify whether the degree of degradation affecting mRNA stored on FTA cards over time can be reduced by deep freezing bloodstains collected on *FTA Classic Cards* (Whatman) [9–11].

Summing up, the study demonstrates that *FTA Classic Cards* (Whatman) are useful tools for the transport and storage at room temperature the bloodstains intended for RNA analysis for a period of up to about two years. Another observation was that the *TRIzol Reagent* (Life Technologies) was superior to the other two isolation methods analyzed in the study in terms of having the highest capacity

w uzyskiwaniu wolnych od DNA preparatów RNA, które można przeanalizować z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym ze 100-procentową wydajnością w przypadku próbek przechowywanych do ok. 2 lat. Tym samym karty *FTA Classic Card* (Whatman) mogą stanowić użyteczne narzędzie w badaniach z zakresu genetyki klinicznej i sądowej

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/B/NZ6/01728.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

to produce DNA-free RNA samples which can be analyzed by Real-Time PCR with 100% efficiency in the case of samples stored for a period of up to about two years. The features outlined above make *FTA Classic Cards* (Whatman) a useful tool for conducting clinical and forensic genetic tests.

The project was funded with the support of the National Science Centre granted under decision no. DEC-2011/03/B/NZ6/01728.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Jakubowska J, Maciejewska A, Bielawski KP, Pawłowski R. mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 53-60.
2. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet* 2015; 18: 21-32.
3. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int* 2010; 203: 71-75.
4. Dickinson BT, Kisiel J, Ahlquist DA, Grady WM. Molecular markers for colorectal cancer screening. *Gut* 2015; 64: 148514-148594.
5. Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Hoen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 2004; 57: 903-911.
6. Velonas VM, Woo HH, dos Remedios CG, Assinder SJ. Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 11034-11060.
7. Xu MJ, Dorsey JF, Amaravadi R, Karakousis G, Simone CB 2nd, Xu X, Xu W, Carpenter EL, Schuchter L, Kao GD. Circulating tumor cells, DNA, and mRNA: potential for clinical utility in patients with melanoma. *Oncologist* 2016; 21: 84-94.
8. Bauer JW, Bilgic H, Baechler EC. Gene-expression profiling in rheumatic disease: tools and therapeutic potential. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 257-265.
9. Picard-Meyer E, Barrat J, Cliquet F. Use of filter paper (FTA) technology for sampling, recovery and molecular characterisation of rabies viruses. *J Virol Methods* 2007; 140: 174-182.
10. Michaud V, Gil P, Kwiatek O, Prome S, Dixon L, Romero L, Le Potier MF, Arias M, Couacy-Hymann E, Roger F, Libeau G, Albina E. Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. *J Virol Methods* 2007; 146: 257-265.
11. Jones S, Sutherland CJ, Hermsen C, Arens T, Teelen K, Hallett R, Corran P, van der Vegte-Bolmer M, Sauerwein R, Drakeley CJ, Bousema T. Filter paper collection of *Plasmodium falciparum* mRNA for detecting low-density gametocytes. *Malar J* 2012; 11: 266.

Adres do korespondencji

prof. Tomasz Grzybowski
Katedra Medycyny Sądowej
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz, Polska
e-mail: tgrzyb@cm.umk.pl

Address for correspondence

prof. Tomasz Grzybowski
Department of Forensic Medicine
Ludwik Rydygier *Collegium Medicum*
Nicolaus Copernicus University
Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz, Poland
e-mail: tgrzyb@cm.umk.pl