

Streszczenie

Obecnie proces izolacji DNA można przeprowadzić przy zastosowaniu gotowych zestawów odczynników, z dodaną przez producenta instrukcją i opisem. Przebieg procedury zależy ściśle nie tylko od wybranej metody ale również od tego, jaki materiał biologiczny jest do dyspozycji. Standardowo, przy wyodrębnianiu DNA z zębów czy też kości technikę rozpoczyna się od oczyszczenia próbki. Następnie wycina się z kości fragment (w przypadku małych kości i zębów wykorzystujemy materiał w całości), a następnie mrozi w ciekłym azocie i rozdrabnia na pył kostny. Kolejnym etapem jest dodanie buforu ekstrakcyjnego o pH=8 i inkubacja, w trakcie której dodaje się proteinazę K. Uzyskany lizat wykorzystuje się do izolacji DNA stosując jeden z wielu dostępnych komercyjnie zestawów. Można też izolować go starą metodą z zastosowaniem mieszaniny fenol-chloroform, w której białka wiążą się z chloroformem, a DNA pozostaje w fazie organicznej z fenolem.

W przypadku izolacji z plam na podłożach takich jakich papier, tkanina czy inne nasiąkliwe podłoża, początkowym etapem również jest wycięcie fragmentu z wybranego miejsca. Natomiast jeżeli materiałem do izolacji jest kawałek tkanki (mięsień, mózg itp.), należy ją pociąć na jak najmniejsze kawałki i zhomogenizować. Dalsze etapy polegają na oczyszczeniu materiału badanego, analogicznie z zastosowaniem procedury ręcznej albo gotowych procedur i odczynników takich jak zestawy kolumnowe lub kulki magnetyczne.

Ostatnim krokiem jest zwielokrotnienie materiału genetycznego z zastosowaniem techniki PCR, stosując jego wybrane rodzaje. Dzięki reakcji z niewielkiej ilości DNA możemy otrzymać dużo jego powielonych kopii. Jest to szczególnie przydatne w przypadku próbek o małej wydajności izolacji z powodu degradacji. Następnie uzyskane wyniki uwidacznia się stosując różnorakie algorytmy wizualizacji np. elektroforezę kapilarną.

Badanie DNA wykorzystuje się w medycynie np. do określenia predyspozycji zachorowania na określoną chorobę, wykrycia zakażenia albo monitorowania terapii. Coraz częściej test PCR ma zastosowanie także w innych dziedzinach takich jak archeologia i medycyna sądowa – jako główny sposób ustalania tożsamości szczątków ludzkich i pośmiertnym ustaleniu pokrewieństwa. Od niedawna ta technika jest wykorzystywana również w antropologii – aby pogłębić wiedzę o dawnych cywilizacjach i plemionach, a ostatnio także w muzealnictwie (do badań posiadanych eksponatów muzealnych) oraz w religioznawstwie (do badań relikwii). Reasumując, analiza materiału genetycznego jest najlepszym narzędziem do weryfikacji wielu hipotez^{1,2}.

Niestety, powyżej wymienione standardowe metody izolacji DNA nie nadają się do zastosowania przy próbkach o dużej wartości historycznej, religijnej czy też emocjonalnej. Takich materiałów nie można niszczyć czy też uszkadzać, bo są one cenne i unikatowe. Celem pracy było zaproponowanie nowych możliwości izolacji z materiałów biologicznych, aby wyeliminować etap destrukcji. Wdrożenie nowych, niedestrukcyjnych rozwiązań będzie przydatne w przypadku badań szczątków postaci historycznych, relikwii czy też eksponatów muzealnych. Prezentowane badania są innowacyjne, będą nimi zainteresowani kustosze muzeów, antropolodzy, genetycy, historycy i medycy sądowi.

Materiałem do badań były niewykorzystane fragmenty kości ludzkich, uprzednio zbadane na wniosek prokuratury metodą destrukcyjną. Niezużyte fragmenty zostały wykorzystane, zgodnie z treścią zlecenia, do powtórki profilowania DNA, lecz tym razem przy użyciu opracowywanych nieniszczących metod izolacji. Procedury polegały na wywierceniu w kościach tunelu i wymyciu DNA ze środka, przy zastosowaniu różnych modyfikacji zarówno wstępnego trawienia, jak i izolacji. Wyniki i wnioski zawarto w prezentowanej rozprawie doktorskiej. Dodatkowo, przy użyciu opracowanej metody zbadano relikwie Alojzego Ligudy, pasiak obozowy ojca Maksymiliana Kolbe i fragment tkaniny z materiałem biologicznym Tadeusza Kościuszki z Muzeum Miejskiego w Poznaniu. Jednakże z powodu braku wyników uzyskanych technikami niszczącymi, a co za tym idzie braku możliwości porównania obu procedur, opis tych dodatkowych badań i uzyskane wyniki zawarto nie w treści, ale jedynie w dyskusji i aneksie prezentowanej rozprawy doktorskiej.

Summary

Currently, the DNA isolation process can be performed using ready to use reagent kits, with protocols added by the manufacturer. The procedure depends not only on the chosen method, but also on type of biological material available. Typically, when extracting DNA from teeth or bones, the technique begins with purifying the sample. Then a fragment is cut out of the bone (in the case of small bones and teeth, the material is used integrally), then it is frozen in liquid nitrogen and ground into bone dust. The next step is to add the extraction buffer at pH = 8 and start incubation, during which proteinase K is added. The obtained lysate is used for DNA isolation using one of many commercially available kits. There is also a possibility to isolate it with the old method using a phenol-chloroform mixture, in which proteins bind with chloroform and DNA remains in the organic phase with phenol.

In the case of stain isolation on substrates such as paper, fabric or other absorbent substrates, the initial stage involves cutting out a fragment from the selected place. However, if the material for isolation is a piece of tissue (muscle, brain, etc.), it should be cut into the smallest possible pieces and homogenized. The next steps consist in the purification of the test material, similarly using a manual procedure or ready to use procedures and reagents such as column sets or magnetic beads. The last step is the multiplication of the genetic material using the PCR technique, using its selected types. Starting from a small amount of DNA, we can get a lot of duplicate copies of it. This is especially useful for samples with low isolation efficiency due to degradation. Then, the obtained results are visualized using various visualization algorithms, e.g. capillary electrophoresis.

DNA testing is used in medicine, for example, to determine the predisposition to developing a specific disease, to detect an infection or to monitor therapy. The PCR tests are more and more frequently used in other fields, such as archeology and forensics - as the main means of determining the identity of human remains and establishing kinship after death. Recently, this technique has also been used in anthropology - to deepen the knowledge of ancient civilizations and tribes, and recently also in museology (for research on museum exhibits) and in religious studies (for research on relics). Summing up, the analysis of genetic material is the best tool to verify many hypotheses^{1,2}.

Unfortunately, the above-mentioned standard DNA isolation methods are not suitable for samples of high historical, religious or emotional value. Such materials cannot be destroyed or damaged, because they are valuable and unique. The aim of the study was to propose new

possibilities of isolation from biological materials in order to eliminate the destruction step. The implementation of new, non-destructive solutions will be useful in the case of research on the remains of historical figures, relics or museum exhibits. The presented research is innovative and will be of interest to museum curators, anthropologists, geneticists, historians and forensics. The material for the research were unused fragments of human bones, previously examined at the request of the prosecutor with a destructive method. Unused fragments were utilized, in accordance with the order, to repeat DNA profiling, but this time using non-destructive isolation methods under development. The procedures consisted of drilling a tunnel into the bones and washing the DNA inside, using various modifications to both pre-digestion and isolation. The results and conclusions are included in the presented doctoral dissertation. Additionally, using the developed method, the relics of Alojzy Liguda, father Maksymilian Kolbe's striped camp uniform and a fragment of fabric with the biological material of Tadeusz Kościuszko from the City Museum in Poznań were examined. However, due to the lack of results obtained with destructive techniques, and hence the inability to compare the two procedures, the description of these additional tests and the obtained results are not included in the main text, but only in the discussion and appendix of the presented doctoral dissertation.