

Optymalizacja metod izolacji kopalnego DNA ze szczątków kostnych



Kajetan Lubacki¹, Maciej Chyleński^{1*}, Agnieszka Szyca¹, Anna Juras¹

¹Institut Biologii i Ewolucji człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet im Adama Mickiewicza w Poznaniu
*maciej.ch@amu.edu.pl

Problem badawczy:

Stosunek endogennego do egzogenego (środowiskowego) materiału genetycznego w izolatach kopalnego DNA, rzadko przekraczający 5%, jest największym czynnikiem limitującym w badaniach genetycznych populacji pradziejowych i wczesnohistorycznych. Optymalizacja metod izolacji DNA mająca na celu maksymalizację ilości DNA endogennego jest więc niezwykle istotna z punktu widzenia badań archeogenetycznych.

Celem prezentowanego badania było przetestowanie modyfikacji protokołu izolacji DNA z materiałów pochodzących z pochówków szkieletowych badanych w ramach projektu UMO-2020/39/B/HS3/00159. Zaproponowana modyfikacja polega na zastąpieniu homogenizacji mechanicznej fragmentów szkieletu przeznaczonych do izolacji, ich stopniowym rozpuszczaniem w buforze ekstrakcyjnym.

Metoda:

Z 21 wybranych fragmentów kości przeprowadzono izolację DNA dwoma metodami:

1) Standardowo używaną w naszym zespole metodą wykorzystującą mechaniczną homogenizację wybranych fragmentów (struktur ucha wewnętrznego w przypadku części skalistych kości skroniowej, oraz cementu korzeni w przypadku zębów) i rozpuszczanie uzyskanego proszku przy użyciu buforu ekstrakcyjnego z proteinazą K¹. Następnie uzyskane ekstrakty zostały zagęszczane na filtrach nitrocelulozowych, a DNA oczyszczono na kolumnkach z filtrami krzemionkowymi według protokołu producenta z drobnymi modyfikacjami².

2) Identyczną metodą, w której rozpuszczanie proszku kostnego zastąpiono powolnym (min 120h) rozpuszczaniem całych fragmentów kostnych przy użyciu buforu ekstrakcyjnego z proteinazą K. Bufor wymieniano co około 24h, a następnie całkowitą jego objętość zagęszczono do ≈200 μl przy użyciu filtrów nitrocelulozowych i oczyszczono jak w pkt. 1.

Z obu izolatów przygotowano biblioteki genomowe zgodnie z protokołem używanym standardowo w naszym laboratorium³. Uzyskane biblioteki zostały zsekwencjonowane na platformie Novaseq 6000 firmy Illumina. Po uzyskaniu sekwencji zostały one przeanalizowane przy użyciu skryptów i zasobów obliczeniowych laboratorium kopalnego DNA w ramach infrastruktury PI-Grid.

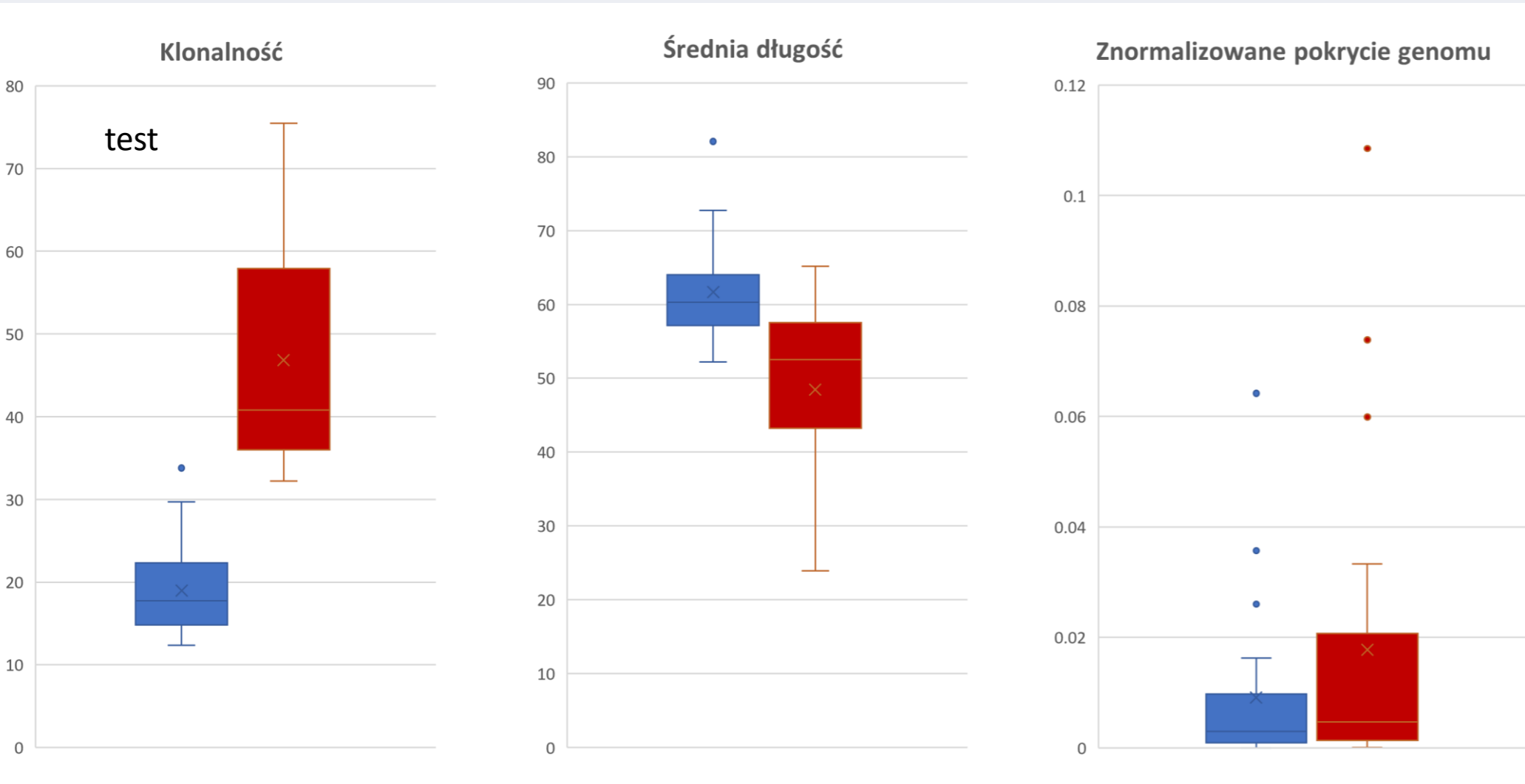
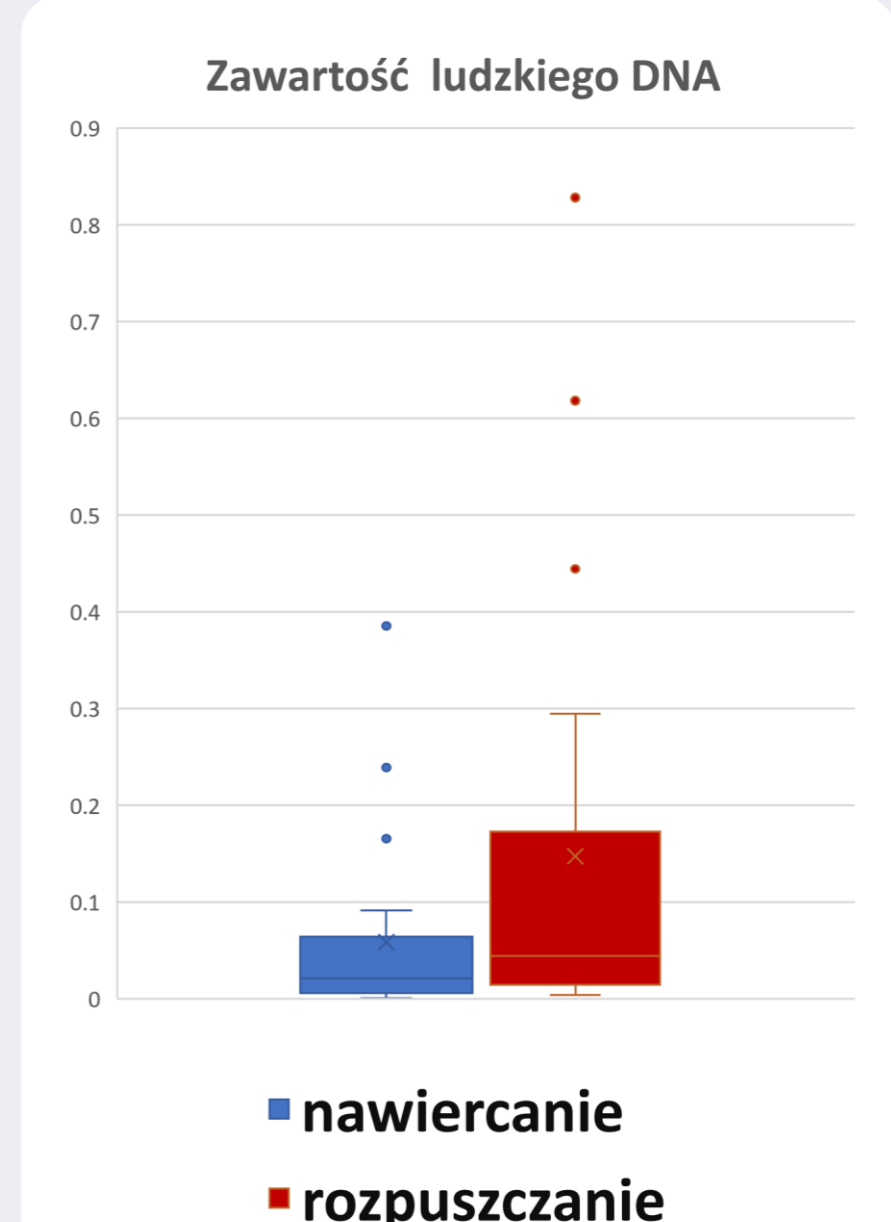
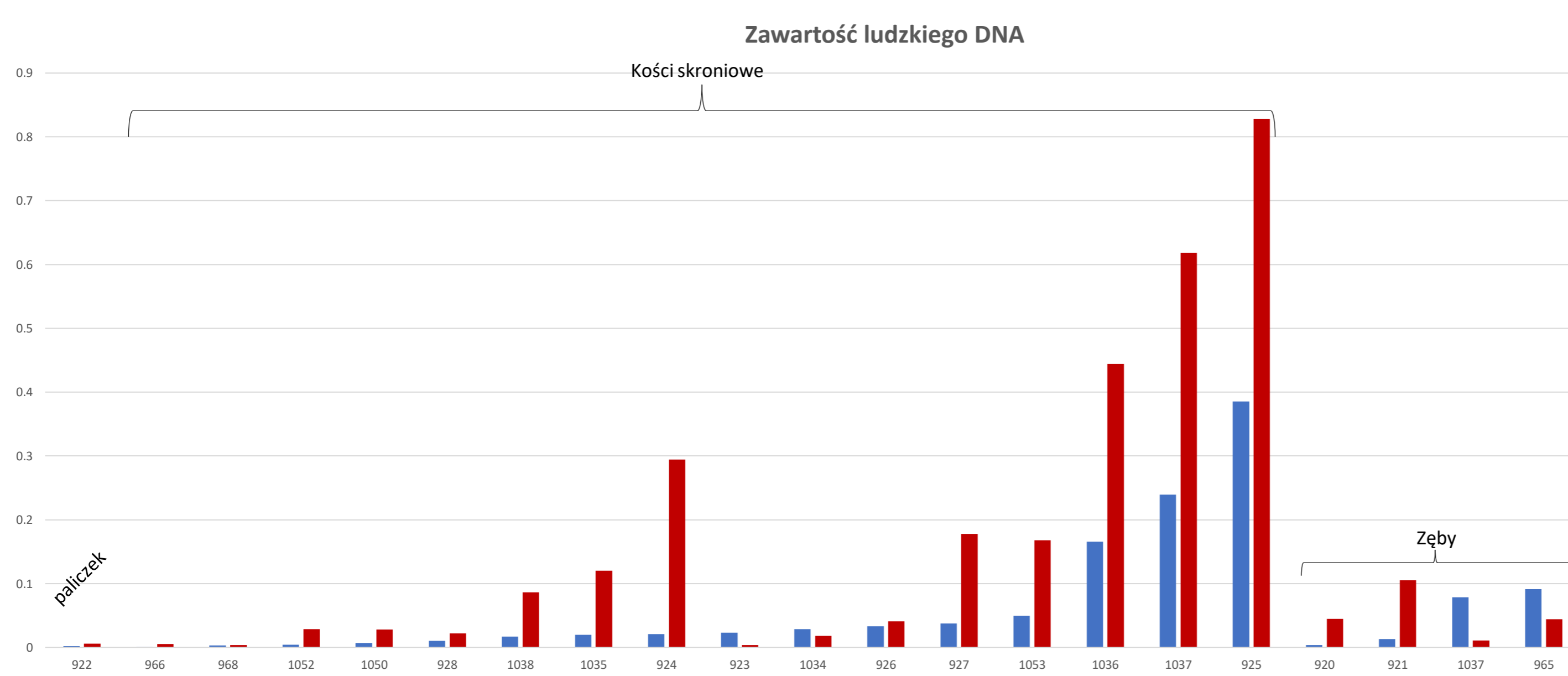


- 1) Przecięta wzdłużnie część skalista kości skroniowej z widocznymi śladami po nawiercaniu
- 2) Odcięty fragment ślimaka z tej samej kości przeznaczony do rozpuszczenia
- 3) Ten sam fragment po ≈ 24h przed pierwszą zmianą buforu
- 4) Ten sam fragment po ≈ 48h przed drugą zmianą buforu



- 1') Ząb wyselekcjonowany do rozpuszczania z widocznymi śladami po nawiercaniu
- 2') Wybrany do rozpuszczenia fragment korzenia
- 3') Ten sam fragment po ≈ 24h przed pierwszą zmianą buforu
- 4') Ten sam fragment po ≈ 48h przed drugą zmianą buforu

Wynik: Znaczący wzrost ilości endogennego DNA



Wyniki i wnioski:

- Znaczący wzrost ilości endogennego ludzkiego DNA
- Wzrasta klonalność sekwencji
- Maleje średnia długość sekwencji
- Mimo malejącej śr. długości sekwencji i wzrostu klonalności, wzrost znormalizowanego pokrycia genomu wskazuje na użyteczność zaproponowanej modyfikacji protokołu

BestStudentGrant 033/39/UAM/0016

UMO-2020/39/B/HS3/00159

Bibliografia:

- 1) Yang, D. Y., Eng, B., Waye, J. S., Dudar, J. C. & Saunders, S. R. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105, 539–543 (1998).
- 2) Svensson, E. M. et al. Tracing genetic change over time using nuclear SNPs in ancient and modern cattle. *Anim. Genet.* 38, 378–383 (2007).
- 3) Juras, A. et al. Investigating kinship of Neolithic post-LBK human remains from Krusza Zamkowa, Poland using ancient DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 26, 30–39 (2017).