

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka



Metody extrakce DNA z historického kosterního materiálu

Bakalářská práce

Veronika Brynychová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Korabečná Marie, Ph.D.

Praha 2008

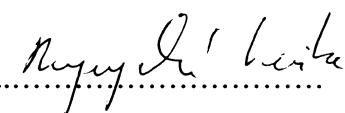
Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Doc. RNDr. Marii Korabečné z Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni za cenné připomínky při zpracování dané problematiky.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů.

V Praze 24.4. 2008


.....
Brynychová Veronika

Abstrakt

Pro archeologické nebo forenzní studie má úspěšná extrakce a analýza DNA z lidských ostatků obrovský význam, ale někdy je pro molekulárního biologa výzvou. Historická DNA je vysoce degradovaná a její množství je omezené. Následné molekulárně genetické analýzy jsou komplikovány kontaminacemi moderní DNA a inhibitory PCR. Tato práce se zabývá metodami extrakce DNA z historického kosterního materiálu. První kapitola stručně charakterizuje problematiku práce se starou a degradovanou kostní tkání a popisuje specifické vlastnosti historické DNA. Následuje výčet možných preventivních opatření a dekontaminačních technik používaných ke snížení potenciálních rizik kontaminace moderní DNA. Hlavní část této práce obsahuje podrobný popis dnes nejčastěji využívaných extrakčních metod s přehledem jejich aplikací a případných slabých a silných stránek. Krátká kapitola na závěr pojednává o inhibitech PCR.

Klíčová slova: historická DNA, kosterní ostatky, DNA extrakce

Abstract

Successful extraction and analysis of DNA from human remains in archeological and forensic cases has great importance, but sometimes it is a challenge for molecular biologist. Historic DNA is highly degraded and its quantity is reduced. Subsequent molecular genetic analyses are complicated by modern DNA contamination and PCR inhibitors. This thesis is focused on methods for DNA extraction from historic bone material. The first chapter introduces problems with old and degraded bone tissue and describes specific properties of historic DNA. The next chapters present the list of possible preventive measures and decontamination techniques which may be used to minimize potential risks of modern DNA contamination. The main part of the thesis includes detailed description of the most common extraction methods with overview of their applications to date and their eventual advantages and disadvantages. The last chapter briefly deals with PCR inhibitors.

Key words: historic DNA, skeletal remains, DNA extraction

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1. ÚVOD.....	6
2. HISTORICKÁ KOSTNÍ TKÁŇ JAKO ZDROJ DNA.....	7
2.1. HISTOLOGIE KOSTI A TYPY KOSTÍ.....	7
2.2. POSMRTNÁ DEGRADACE DNA	9
2.3. ZÁVISLOST ZACHOVÁNÍ DNA NA KOSTNÍ MATRIX.....	11
2.4. VNĚJŠÍ FAKTORY DEGRADACE	12
2.5. PREDIKCE ÚSPĚŠNÉ EXTRAKCE.....	13
3. KONTAMINACE A MOŽNOSTI ŘEŠENÍ	14
3.1. PROBLEMATIKA A ZDROJE KONTAMINACÍ	14
3.2. MOŽNOSTI PREVENCE	15
3.3. DEKONTAMINACE VZORKŮ	16
4. PRINCIPY EXTRAKCE	18
4.1. MECHANICKÁ PULVERIZACE	18
4.2. METODY EXTRAKCE.....	19
4.2.1. <i>EDTA dekalcefikace</i>	19
4.2.2. <i>Organická extrakce</i>	20
4.2.3. <i>Extrakční metody vázané na křemičité (silika) partikule</i>	21
4.2.3.1. Protokol založený na silika a guanidinium thiokyanátu (GnSCN).....	21
4.2.3.2. Silika extrakce pomocí QIAquick PCR purifikačního kitu	21
4.2.3.3. Tissue and Hair extrakční kit a DNA IQ™ izolační systém.....	23
4.2.3.4. OIAamp DNA Blood Maxi kit (Qiagen)	24
4.2.3.5. Silika mikropartikule, GnSCN a ionexové kolonky	26
4.2.4. <i>Využití alkoholové precipitace</i>	28
4.2.4.1. Ethanolová nebo isopropanolová precipitace	28
4.2.4.2. Modifikovaná ethanolová precipitace využívající Dextran Blue.....	29
4.2.5. <i>Odlíšné varianty extrakčních pufrů</i>	30
4.2.5.1. CTAB + isoamyl alkohol/chloroformová extrakce a silika purifikace.....	30
4.2.5.2. Kolágenáza typu I. a fosfátový pufr.....	31
5. INHIBITORY PCR	32
6. ZÁVĚR	34
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	35

Seznam použitých zkratk

aDNA - ancient DNA

BSA - kravský sérový albumin

CTAB - cetyltrimethylamonium bromid

DTT - dithyothreitol

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

GnSCN - guanidinium thiokyanát

PK pufr - extrakční pufr s proteinázou K

SDS - sodium dodecyl sulfát

1. Úvod

Molekulární analýzy DNA mají dnes nezastupitelné uplatnění skoro ve všech biologických oborech. Genetická informace přítomná v kosterních pozůstatcích člověka je významným studijním materiálem pro archeology, antropology, kriminalisty nebo evolučních biology. Historická DNA, tzv. ancient DNA (aDNA), se může uplatnit při identifikaci neznámých kostních nálezů, otázkách příbuzenských vztahů, objasňování starých kriminalistických zločinů a v neposlední řadě při charakteristice vlastností vymřelých populací a evolučních vztahů. Často jsou pro tyto analýzy k dispozici jen úlomky kostí nebo velmi degradovaná tkáň. Známé a jednotné metody či standardy pro běžné DNA extrakce se v tomto případě nedají použít. U aDNA je nutné počítat s její velmi malou koncentrací a degradací, s rizikem kontaminace moderní DNA a s přítomností látek, jež mohou znemožnit namnožení i úspěšně extrahované DNA. Z výše uvedeného vyplývá, že molekulární analýza historického materiálu vyžaduje specifický přístup. V posledních 20 letech byla vyvinuta řada extrakčních metod a stále nové dokonalejší postupy jsou rychle publikovány.

Jedním z cílů mé bakalářské práce je charakterizovat vlastnosti historických kostí a v nich obsažené genetické informace, ze kterých se vychází při volbě nebo přímo vytváření vhodné metodiky. Chtěla bych se zaměřit na problematiku práce s degradovanou kostní tkání a na překážky, jež je možné očekávat u analýz aDNA. Zároveň chci u popsanych problémů zmínit některé z novějších technik používaných k jejich překonání. Hlavním účelem této práce je ovšem vytvořit určitý souhrn dnes nejvíce používaných metod pro izolace aDNA ze starých a degradovaných kostí. Mým úmyslem není jejich absolutní výčet, ale spíše přehled základních přístupů, z kterých jednotlivé postupy vycházejí. Nejdříve bych chtěla shrnout základní principy charakterizující daný přístup a nakonec zdůraznit nejvýznamnější metody, jež byly nebo jsou v této době s úspěchem používány při práci s historickým nebo degradovaným kosterním materiálem. V teoretické rovině bych se ráda pokusila i o určité vzájemné srovnání a zdůraznění jejich výhod a nevýhod. Nakonec bych ještě zdůraznila, že tato práce se nebude přímo zaměřovat na izolace aDNA z prehistorických nebo paleontologických nálezů.

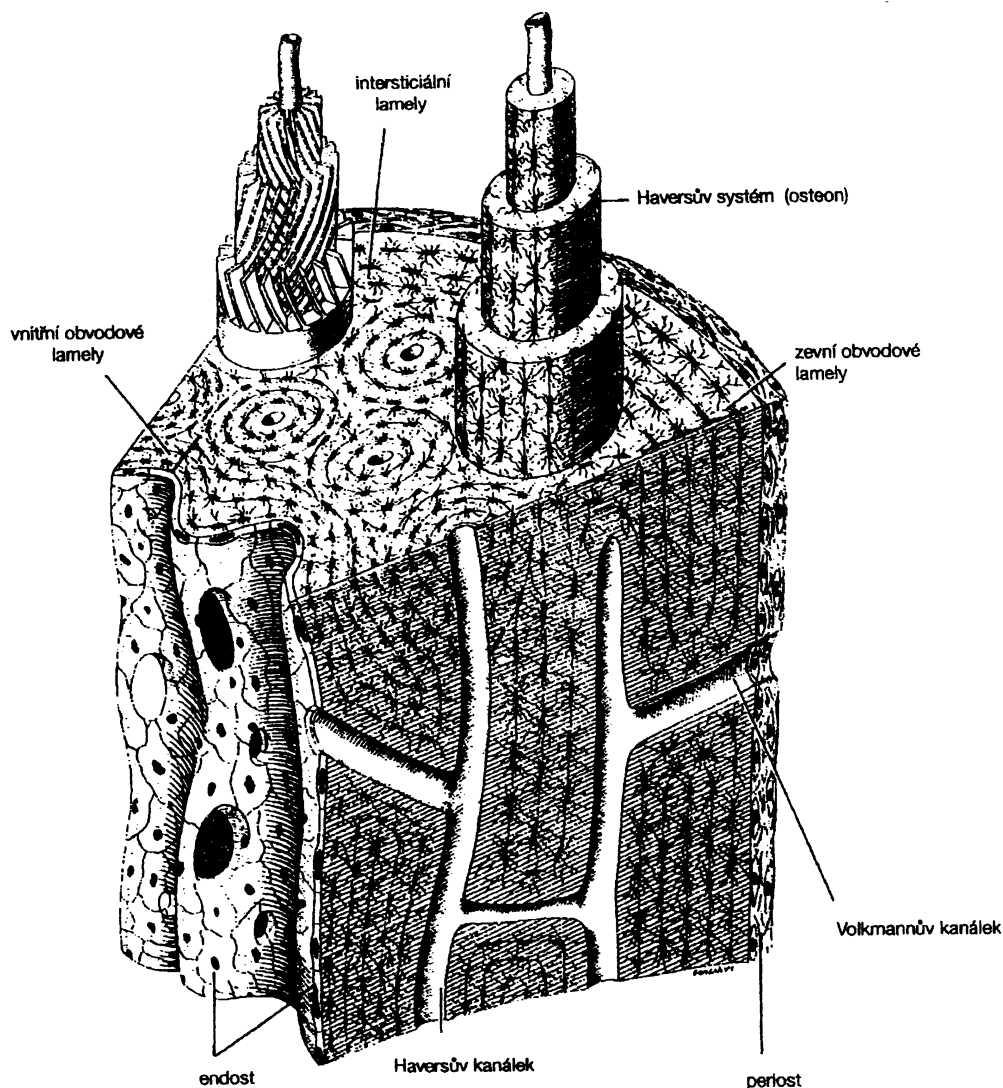
2. Historická kostní tkáň jako zdroj DNA

2.1. Histologie kosti a typy kostí

Kostní tkáň má oproti měkkým tkáním specifické vlastnosti, které jí předurčují k archeologickým analýzám. Prvním krokem k pochopení těchto vlastností je porozumění její histologické struktuře. Kost je specializovaná pojivová tkáň obsahující různé druhy buněk a zvápenatělou mezibuněčnou hmotu, tzv. matrix, tvořící 50% suché hmotnosti kosti. Z větší části je složena z anorganických látek, hlavně vápníku a fosforu. V menším množství je přítomen hydrogenuhličitan, citrát, hořčík, draslík a sodík. Vápník s fosforem vytvářejí krystalky hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, které jsou uloženy podél proteinových fibril jako ploché deskovité útvary. Menší ale významné množství tvoří nekystalický amorfní fosforečnan vápenatý. Organická složka mezibuněčné hmoty je složena z kolagenu typu I a amorfní hmoty tvořené glykoproteiny (osteokalcin, sialoprotein) a glykosaminoglykany. Základními buňkami kosti jsou osteocyty, jejich nezralé formy osteoblasty a osteoklasty. Osteocyty jsou uloženy v malých komůrkách, tzv. lakunách, ohraničených okolní mezibuněčnou hmotou. Na povrchu každé kosti se nachází vrstva periostu obsahujícího kromě kolagenních vláken a fibroblastů ještě osteoprogenitorové buňky. Tenká vrstva endostu vystýlá dutiny kostí. Uvnitř dlouhých kostí a v dutinkách kostí spongiozních je kostní dřev s hematopoietickou funkcí. Mezi periostem a endostem je kostní tkáň různého typu.

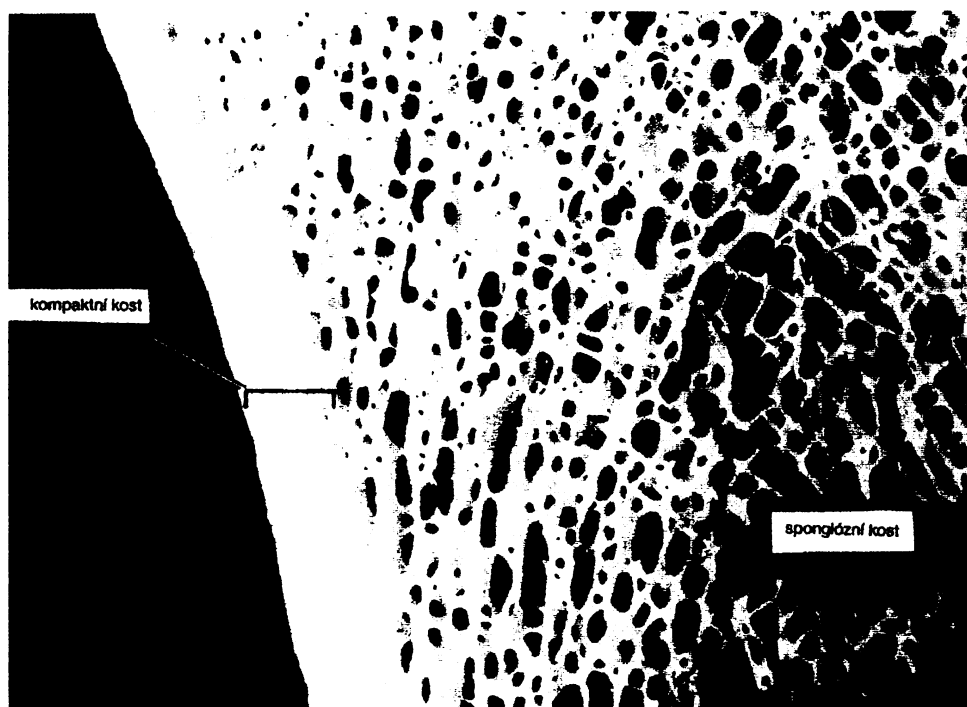
Během vývoje a při hojení např. zlomenin mluvíme o primární nezralé kostní tkáni. Ta je tvořena vláknitou hmotou a obsahuje nepravidelně uspořádaná jemná kolagenní vlákna, méně minerálů a více osteocytů. Zralá kost je tvořena kompaktní a houbovitou kostní tkání. V kompaktě jsou kolagenní vlákna uspořádána v lamelách paralelně nebo koncentricky kolem Haversova kanálku, a dohromady tvoří tzv. Haversův systém (osteon) (viz. obr.1). Spongióza obsahuje velké množství dutinek oddělených lamelózně upravenými trámčinky uspořádanými nepravidelně nebo architektonicky podle míry zátěže působící na kost. (Junqueira et al. 2002). Bližší studie anorganické části matrix ukázala na rozdíly v uspořádání hydroxyapatitu a kolagenních fibril. Krystaly silně asociované s fibrilami, přítomné spíše ve spongioze, se po rozrušení kolagenní složky snadno rozpadají na monomery. Naproti tomu krystalky lokalizované mezi fibrilami, typicky v kompaktě, mohou tvořit těsné agregáty, které se nerozpadají ani při působení silných oxidačních látek (Weiner & Price 1986). Uvnitř těchto

agregátů byla prokázána přítomnost DNA jak u moderních tak archeologických kostí (Salamon et al. 2005).



Obr. 1: Schéma stavby kompaktní kostní tkáně diafýzy dlouhé kosti (Junqueira et al. 1997).

Poměr kompakty a spongiozy se u různých kostí liší. Dlouhé kosti v epifýzách obsahují jen slabou vrstvu kompakty a většinu spongiozy. Naproti tomu kompakta je nejvýznamnější v diafýzách (viz. obr. 2). Krátké kosti mají většinou spongiozní jádro s rovnocennou vrstvou kompaktní tkáně. Ploché kosti tvoří dvě výrazné vrstvy kompakty oddělené slabou spongiozní vrstvou (Junqueira et al. 2002). Vzhledem k vysokému obsahu kompakty v kostech se obvykle při analýzách volí dlouhé kosti horní a dolní končetiny, nejčastěji femur a humerus, dále pak tibia, radius nebo ulna. Z ostatních druhů kostí jsou to především kosti lebky. Samozřejmě při volbě druhů kostí pro analýzy je nejdůležitějším určujícím faktorem stupeň zachování nálezu (Anđelinović et al. 2005, Kalmár et al. 2000).

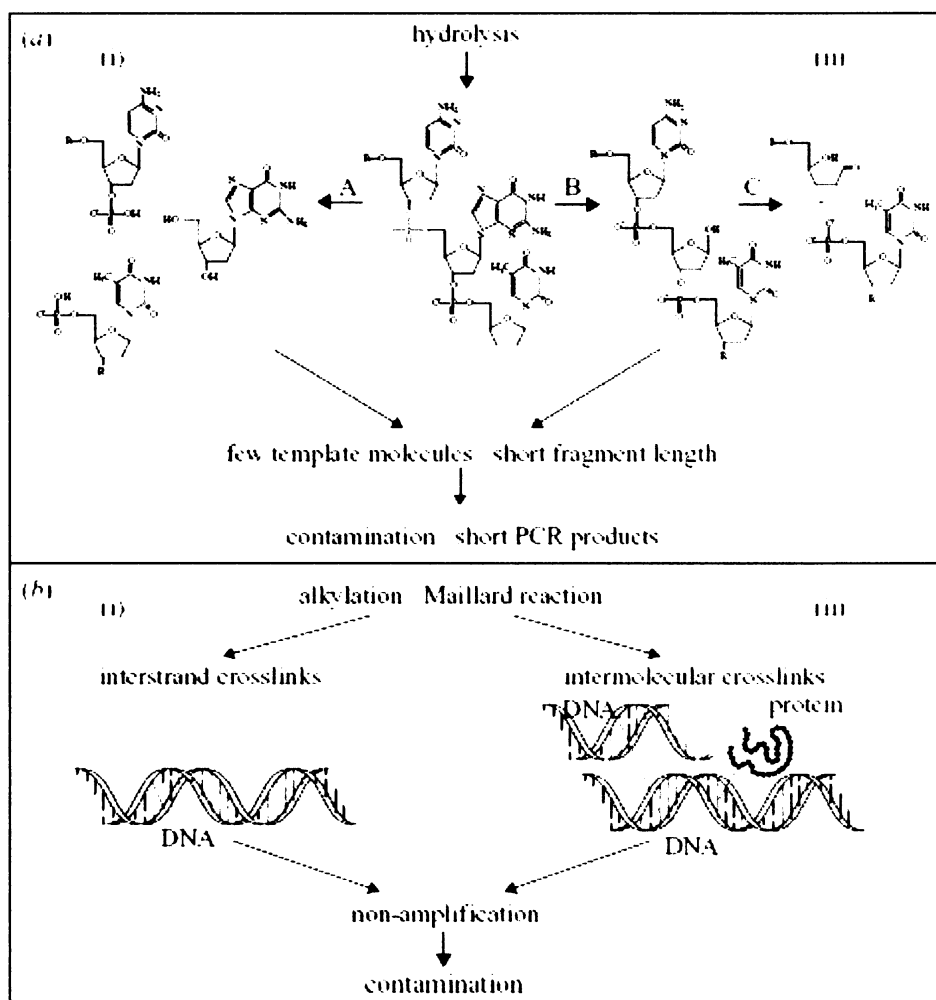


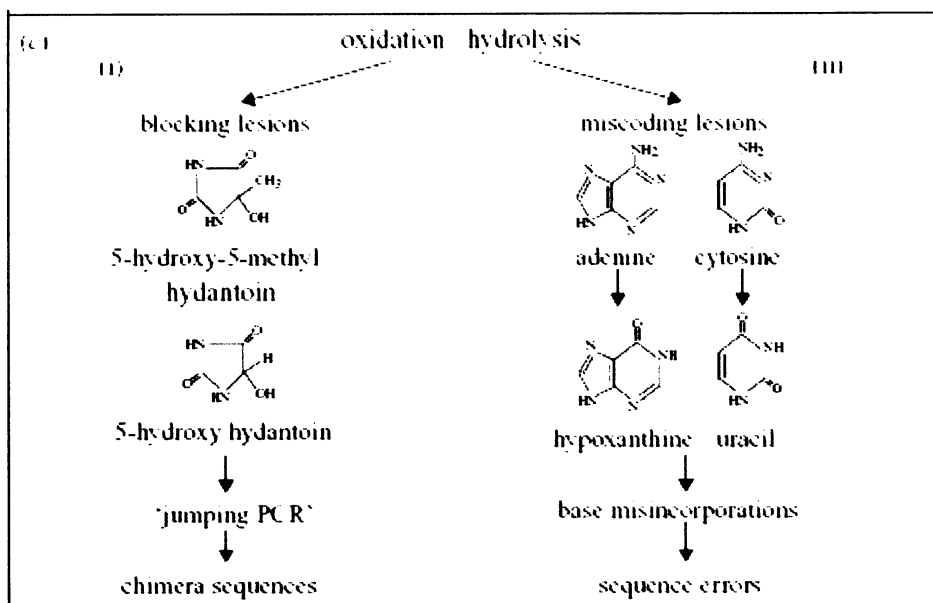
Obr. 2: Řez tibií znázorňující kompaktní a spongiózní část kosti (Junqueira et al. 1997).

2.2. Posmrtná degradace DNA

Přítomnost DNA je v kosti vázána na živé buňky. Po jejich smrti je vystavena vnitřním a vnějším degradačním vlivům. Z vnitřních faktorů jsou to endonukleázy, které jsou součástí směsi autolytických enzymů vylévaných z lysozomů. Dále též přirozené chemické procesy (hydrolýza, oxidace), jenž jsou v živé buňce opravovány reparačními procesy (Lindahl 1993). Vnější faktory, podrobněji popsané níže, způsobují enzymatickou degradaci (mikroorganismy) a změny v DNA způsobené hydrolýzou, oxidací, alkyací a Maillardovými kondenzačními reakcemi (Willerslev & Cooper 2005). V první řadě se post-mortem degradace DNA manifestuje fragmentací, která se při analýzách projeví amplifikací jen délkově omezených úseků. Hydrolýza je odpovědná za deaminaci bází nebo za úplnou ztrátu báze (Lindahl 1993). Deaminací vzniká z cytosinu uracil (analog thyminu) a adeninu hypoxantin (analog guaninu). Studie zkoumající frekvence všech tranzicí a transverzí u mtDNA z historických kostí potvrdila C->T a A->G tranzice jako nejčastější a tedy i deaminaci jako hlavní příčinu vzniku tzv. miskódujících lézí (miscoding lesions) (Gilbert et al 2003). Při amplifikaci produktů nedojde k zastavení polymerázy, ale dochází k přiřazení špatného nukleotidu a tedy k sekvenčním chybám (Hofreiter et al. 2001). Z oxidačních

produktů byly nejčastěji izolovány 5-hydroxy-5-methylhydantoin (5-OH-5-MeHyd) a 5-hydroxyhydantoin (5-OH-Hyd) jako degradační produkty thyminu a 8-hydroxyguanin (8-OH-Gua). První dva produkty mohou být příčinou zastavení polymerázy a možnosti amplifikace jen zkrácených produktů. Jen částečně prodloužené primery se mohou navazovat na jiné části templátu a následně vytvářet neautentické sekvence. Tento efekt je označován jako jumping PCR (Pääbo et al. 1990). Hydroxyguanin je další z miskódujících lézí (analog thyminu) (Höss et al. 1996). Jinými typy poškození DNA struktury je tvorba vnitřetězcových a meziřetězcových (DNA-protein) vazeb, které mohou bránit amplifikaci i při dobrém zachování DNA (Geigl 2002). Přehled posmrtných degradačních změn v DNA je shrnut v následujícím obrázku.



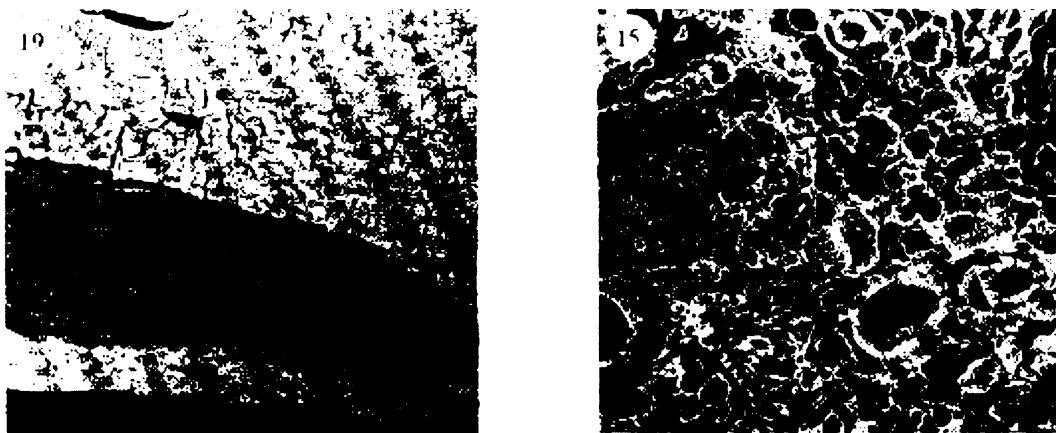


Obr. 3: Přehled post-mortem modifikací v DNA, místa poškození jsou označena červeně. (a) Vznik zlomů v DNA působením hydrolýzy. (i) Přímé rozštěpení fosfodiesterové vazby (A), (ii) depurinace (B) následovaná zlomem v deoxyribózovém kruhu beta-eliminací (C). (b) Vnitrořetězcová vazba vzniklá alkylací (i) a meziřetězcové vazby způsobené Maillardovými reakcemi (ii). (c) Oxidací nebo hydrolýzou způsobené modifikace bází mohou vyústit v blokační (i) nebo mutační oblasti (ii) (Cooper and Willerslev 2004).

2.3. Závislost zachování DNA na kostní matrix

Proti vnějším chemickým a biologickým degradačním vlivům je genetická informace na rozdíl od měkkých tkání částečně chráněna přítomností okolní matrix. Vzhledem k vysoké afinitě DNA k hydroxyapatitu je stupeň zachování histologie kosti u archeologických nálezů považován za nejdůležitější (Hagelberg et al. 1989, Lindahl 1993) (viz. obr. 4). Götherström a spol. (2002) ve své práci prokázal jasnou korelaci mezi úspěšností extrakce DNA a uchováním struktury hydroxyapatitu. Řada dalších studií včetně Götherströma poukázala na stejnou, i když mírnější, korelaci úspěšné DNA amplifikace a obsahu proteinů (Poinar et al. 1999, Götherström et al. 2002). Ochrana minerální matrix je silně svázána s přítomností proteinové složky, hlavně kolagenu, ale i osteokalcinu (Collins et al. 2002). Předpokládá se, že organické molekuly těsně vázané k povrchu hydroxyapatitu zpomalují jeho rozpouštění (Kleter et al. 1994), a naopak ztráty minerální části vystaví kolagen účinkům biodegradace (Krane 1975). Otázka, kde a jakým způsobem je DNA v kostech chráněna před vlivy prostředí, ještě nebyla jasně zodpovězena. Jedním z obecnějších závěrů je předpoklad, že DNA je

adsorbována a stabilizována hydroxyapatitem a kolagen je součástí komplexního systému zachovávající všechny tři složky (Götherström et al. 2002).



Obr. 4: Porovnání různého rozsahu degradace kostí. (19) Střední míra degradace části kompakty pod periostem. Patrné je rozšíření lakun a síť kanálků. Kosterní vzorek je ze středověkého pohřebiště (1100-1540). (15) Midkortikální region s výraznou post-mortem degenerací. Některé Hawersovy systémy jsou ale stále patrné. Kosterní vzorek z masového hrobu (1644-1663) (Hagelberg et al. 1991).

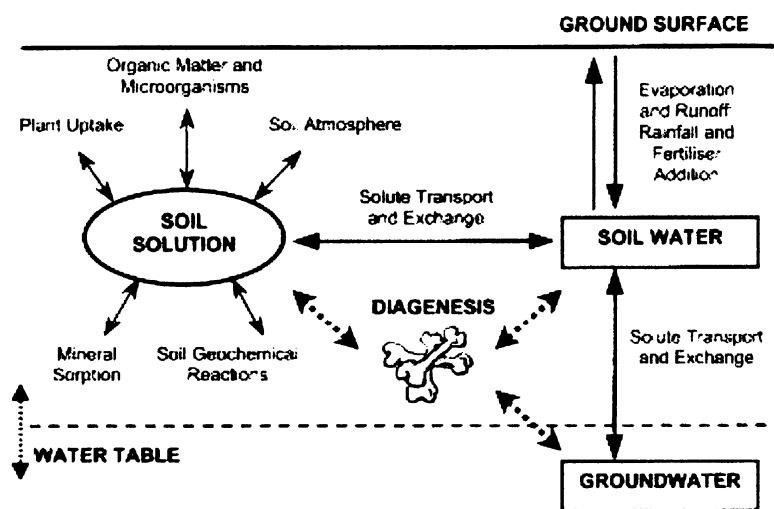
2.4. Vnější faktory degradace

Alespoň částečné pochopení degradačních procesů kostí a vlivu vnějších faktorů na tyto procesy může být využito k určité predikci úspěšnosti extrakce na podkladě znalostí o podmínkách, ve kterých se kosterní materiál nacházel.

Na degradaci se podílí fyzikální, chemické a biologické vlivy působící na organické i minerální složky kosti (Collins et al. 2002) (viz. obr 5). Biologickými vlivy se rozumí hlavně působení mikroorganismů, ale i rostlin (např. prorůstání kořinek). Mikroorganismy představují nejčastější rozkladný mechanismus a na kostech se jejich vliv objevuje brzy po smrti (Bell et al. 1996). Způsobují lokální destrukce a histologicky rozeznatelné mikroskopické tunýlky tak, že kolagenázami a jinými proteolytickými enzymy degradují volné proteiny. Mineralizovaný kolagen je ovšem biologicky nedostupný, protože těsné prostory nedovolí přístup enzymů a je tedy třeba působení dalších abiotických chemických faktorů. Přispívajícím biologickým faktorem by mohli být někteří zástupci plísni rodu *Ascomycetes*, kteří mají schopnost snižovat pH ve svém okolí a degradovat tak i minerální složku. Jako nejčastější typ plísně byli izolováni z archeologického kosterního materiálu společně s nejhodnějšími druhy bakterií, většinou z rodu *Pseudomonas* (Child 1995).

Zastoupení a počet mikroorganismů je ovlivněn teplotou a typem půdy, hlavně obsahem kyslíku, vody a dalších organických látek (Collins et al. 2002, Hedges 2002).

Chemická degradace zahrnuje hlavně hydrolýzu kolagenu, rozpouštění minerální matrix, a naopak rekrystalizaci a příjem některých organických látek z půdy, hlavně huminových kyselin. Tyto procesy jsou závislé na obsahu vody, jejich chemických vlastnostech a teplotě. Vysoký a stálý obsah vody v půdě umožňuje rychlé ztráty minerálních látek díky jejich prosté difúzi po koncentračním spádu a tím rychlejší ztráty minerální matrix. Časté vysychání a zvlhčování půdy (typ podnebí, změny počasí) ovlivňují hlavně kosti uložené blízko povrchu a ve více vodivých např. pískových půdách. Pohyb vody rozšiřuje už tak biologicky zvětšené póry a tím i plochu, na kterou mohou degradační faktory působit (Hedges and Miliard 1995). Geochemické vlastnosti zahrnují typy a koncentrace ve vodě rozpuštěných látek, pH a přítomnost kyslíku. Zjednodušeně se dá říci, že celkovou degradaci urychluje nízké pH, velké rozdíly koncentrací minerálů mezi kostmi a okolím a volný přístup kyslíku. Vysoká teplota urychluje hlavně ztráty kolagenu (Collins et al. 2002, Hedges 2002).



Obr. 5: Vzájemné působení vnějších vlivů na posmrtnou degradaci kostí (Wilson & Pollard 2002).

2.5. Predikce úspěšné extrakce

Všechny zmiňované faktory způsobují na kostech histologické a chemické změny, z jejichž rozsahu je možné posoudit možné zachování genetické informace v archeologickém materiálu. Jako “DNA marker“ se například používá stupeň racemizace L->D enantiomerů kyseliny asparagové (Poinar et al. 1996). Dalším ukazatelem by mohla být míra krystalinity

hydroxyapatitu nebo obsah kolagenu (Götherström et al. 2002). Jiné metody vychází ze znalostí o pohřebišti a působících faktorech prostředí. Určení tzv. termálního věku posuzuje závislost zachování DNA na čase s ohledem na teplotní podmínky (včetně teplotních změn). Tato metoda je založena na předpokladu, že depurinace je klíčovou cestou DNA degradace a její účinek je ovlivněn teplotou (Smith et al. 2001). Napovídajícím ukazatelem může být informace o způsobu pohřbení. Jedna ze studií například poukázala na problém analýzy DNA u kostí z hromadných hrobů kvůli rozsáhlému mikrobiologickému rozkladu (Hagelberg & Clegg 1991).

3. Kontaminace a možnosti řešení

3.1. Problematika a zdroje kontaminací

Přesto, že se archeologický kosterní materiál používá pro analýzy DNA skoro dvacet let, je problematika kontaminací stále jedním ze základních problémů a zájmem řady studií (Richards & Sykes 1995, Kolman & Tuross 2000, Malmström et al. 2005, 2007, Kemp & Smith 2005). Vzhledem k tomu, že aDNA v kostech je velmi málo a je různě degradována (Lindahl 1993, Gilbert et al. 2003), jsou její analýzy velmi ovlivnitelné i minimálním množstvím moderní DNA. Tento problém vychází z vysoké citlivosti PCR, která je sice ideální pro amplifikaci malého množství aDNA, ale při kompetici s moderní DNA, jež je vždy v lepším stavu a někdy i větším množství, je aDNA v jasné "nevýhodě". Moderní DNA může zcela zabránit amplifikaci, i když je aDNA přítomná (Kemp & Smith 2005). Závěry evolučních studií pracujících s aDNA jsou tak vystaveny vysokému riziku chybných výsledků. Proto je stejně jako prevence důležitá i následná autentizace výsledků resp. jistota, že byla opravdu amplifikována aDNA (Richards & Sykes 1995).

V podstatě existují tři příčiny kontaminace analyzovaných kostí (Kemp & Smith 2005). První a nejvýznamnější je exogenní DNA extrahovaná ze vzorků spolu s aDNA. V lepším případě je přítomná jen na povrchu kostí, ale často i v hlubších vrstvách, kam se dostává společně s vodou prostřednictvím pórů. Jejimi zdroji jsou mikroorganismy (bakterie, houby) a všichni lidé, kteří s materiálem od exkavace až do analýz manipulovali (archeologové, zaměstnanci muzeí, antropologové, pracovníci laboratoře). Pokud vykazují podobné nebo dokonce stejné haplotypy jako studovaná aDNA, může to vést ke špatným interpretacím

výsledků (Cooper et al. 1997, Serre et al. 2004a). Dalším zdrojem kontaminací je laboratorní vybavení, používané nástroje a reagentie. Jestliže nejsou distribuovány jako tzv. DNA-free, počítá se s jejich kontaminací lidskou nebo mikrobiální DNA (Schmidt 1995). Ale většina exogenní DNA v laboratořích pochází z minulých nebo souběžně probíhajících studií. Při manipulaci s otevřenými zkumavkami vzniká mikroskopický aerosol, který může být snadno vzduchem rozšířen po celé laboratoři. Kontaminovaný personál jej dále může přenášet při přechodu mezi laboratořemi (Willerslev and Cooper 2005). Někdy jsou tyto kontaminace tak malé, že je nezachytí ani negativní kontroly (Kolman and Tuross 2000). Bez tohoto efektu je množství DNA ve vzduchu a potenciálně možná kontaminace možná, ale velmi malá (Toledano et al. 1997). Třetí příčinou je přenos exogenní i aDNA mezi jednotlivými vzorky, tzv. cross contamination, hlavně při přípravě PCR reakcí (Kemp and Smith 2005).

3.2. Možnosti prevence

Postupným získáváním zkušeností bylo zavedeno několik různých přístupů, které více či méně řeší problematiku kontaminací (Handt et al.1994, Cooper and Poinar 2000, Pääbo et al. 2004, Richards and Sykes 1995, Kemp and Smith 2005, Malmström et al. 2007). Prvním z nich je prevence a tedy přímo zabránění laboratorní kontaminaci nebo „zamoření“ vzorků. Dalším postupem je odstranění už přítomné exogenní DNA na vzorcích. Kromě těchto kroků by se vždy měly používat kontroly zachycující případnou kontaminaci. Možnosti preventivních opatření a kontrol jsou shrnuty v následujících bodech (Handt et al.1994, Cooper and Poinar 2000, Pääbo et al. 2004).

- vzorky kostí by měly být studovány co nejdříve po exkavaci, přímý kontakt s lidskou DNA by se měl omezit na minimum; máčení kostí a nevhodné podmínky skladování (vysoká vlhkost, teplota, světlo) podporuje mikrobiální kontaminaci a snižuje obsah aDNA (Pruvost et al. 2007).
- pro aDNA výzkum by měla být vyhrazena samostatná laboratoř, musí být oddělené prostory pro čištění kostí, mechanické zpracování, extrakce a PCR amplifikace
- laboratorní povrchy musí být pravidelně sterilizovány (UV, HCl, roztok NaOCl); používané nástroje a reagentie by měly být jednorázové a DNA-free nebo by měly být sterilizovány (UV, autokláv); reagentie se sterilizují vždy v malých objemech (vyhnutí se opakovanému používání); špičky pipet by měly být aerosol rezistentní

- všichni pracovníci musí nosit ochranné pomůcky a oblečení (min. plášť, rukavice, přezůvky) pro každé pracoviště zvlášť; rukavice se během pokusů pravidelně sterilizují (roztok NaOCl) kvůli prevenci přenosu kontaminace mezi vzorky
- každá extrakce by měla být prováděna nejméně ve dvou nezávislých vzorcích; stoprocentní autentizaci zajistí nezávislé zopakování studie jinou laboratoří se stejnými výsledky
- pro extrakce a PCR musí být zavedeny negativní kontroly v co možná nejvyšší frekvenci; pozitivní kontroly by se neměly používat kvůli dalšímu riziku kontaminací
- nápomocným ukazatelem je tzv. appropriate molecular behaviour, jež předpokládá zvýšený počet krátkých fragmentů a snížení dlouhých fragmentů vzhledem k degradaci aDNA
- primery by měly být vybírány jako specifické jen pro daný druh
- část PCR produktů by měla být amplifikována a sekvenována k posouzení poškození v aDNA a k přehledu haplotypů cizorodé DNA (např. pro porovnání s haplotypy pracovníků) (Malmström et al. 2005); kvantifikace molekul exogenní DNA a aDNA v extraktech a PCR produktech je vhodná k posouzení zdrojů kontaminace (laboratorní vs. ze vzorků) a vlivu míry kontaminace na amplifikaci aDNA (Handt et al. 1996)

3.3. Dekontaminace vzorků

Dnes jsou při práci s aDNA preventivní opatření maximálně dodržována a většina amplifikované cizorodé DNA tak pochází z kontaminovaných kosterních vzorků (Richards and Sykes 1995, Malmström et al. 2005). Postupně bylo zavedeno několik metod dekontaminace kostí předcházejících samotnou extrakci (viz. tab. 1). Zahrnují fyzikální a chemické přístupy, jež mají své výhody i nevýhody. Mechanické odstranění vrchní vrstvy kosti je součástí prakticky všech studií. Používají se různé brusky (např. zubařské), skelný papír nebo tryskové abrazivní techniky. V průměru se odstraňuje 2-3 mm silná většinou různě zbarvená vrstva až k bílé vnitřní části (Yang et al. 1998, Kalmár et al. 2000, Alonso et al. 2001, Davoren et al. 2007). Následuje omývání ve sterilní destilované H₂O (Davoren et al. 2007) nebo vodě s mírným detergentem (Alonso et al. 2001). Důvodem je hlavně odstranění zbytků prachu po broušení, který je stále zdrojem kontaminace. Jinou fyzikální metodou, jež obvykle následuje, je UV ozáření (1.0 J/cm² 30-60 min) jako varianta (Malmström et al. 2005) nebo doplnění k chemickým dekontaminacím (Ye et al. 2004, Kim et al. 2008).

Vybrané studie	Omytí vnější vrstvy	Odstranění svrchní vrstvy	HCl	UV	NaOCl koncentrace (% m/V)	Ethanol (%)
Kalmár et al. 2000					Neuvedeno	
Alonso et al. 2001 (A)					komerční bělidlo 5% (V/V) **	80,0
Ye et al. 2004					0,5	
Kemp & Smith 2005					6,0	
Andelinović et al. 2005*					komerční bělidlo	70,0
Malmström et al. 2007					0,5 ***	neuvedeno
Davoren et al. 2007*					0,5	96,0
Palo et al. 2007*					1/10 roztok bělidla 8% (V/V) a 70% ethanolu	
Kim et al. 2008					~5,4	

Tab. 1: Přehled nejčastěji používaných dekontaminačních metod. Použití metody v protokolu je vyznačeno modrou barvou. U dvou nejčastějších chemických metod je uvedena použitá koncentrace látky. * Protokoly byly použity na kostech méně než 100 let starých. ** Objem bělidla/vodě. *** NaOCl byl aplikován na kosterní prášek.

Chemická dekontaminace dnes nejčastěji zahrnuje máčení nebo omývání získané části kosti v roztoku s hypochloridem sodným (NaOCl) (Ye et al. 2004, Andelinović et al. 2005, Davoren et al. 2007) nebo přímo kosterního prášku (Kolman & Tuross 2000, Malmström et al. 2007). Vhodná koncentrace NaOCl a doba působení byla studována v několika pracích. Richards a Sykes (1995) demonstrovali, že použití 0,5% (m/V) NaOCl je pro dekontaminaci účinnější než jen fyzikální metoda. Totéž následně potvrdili Kemp a Smith (2005). V této jednodušší studii nejdříve „uměle“ kontaminovali vzorky kostí, na kterých pak testovali různé koncentrace a dobu expozice. Jako dostatečná se ukázala metoda s 3% NaOCl 15 min, přesto do své další praxe zavedli máčení 15 min v 6% NaOCl. Dále ukázali, že ani vyšší koncentrace (6%) nesnížily množství ani kvalitu aDNA. Na závěr poukázali na možnou „přirozenou“ dekontaminaci u vzorků, které byly také úmyslně kontaminovány a následně ponechány 14 měsíců v prostředí s přístupem vzduchu a v pokojové teplotě. U těchto vzorků se kontaminace neprojevila. Malmström (Malmström et al. 2007) úspěšně použila metodu s 0,5% NaOCl 15 min na velmi kontaminovaných zvířecích kostech (Malmström et al. 2005). Nejprve vzorky ošetřila 0,1M HCl a 95% ethanolu a následně použila bělidlo na kosterní prášek. Tato metoda odstranila 99% kontaminace, ale i 77% aDNA. Vyšší koncentrace NaOCl (3%) se na množství aDNA už nijak neprojevily.

Obvykle po ošetření bělidlem následuje promytí/inkubace v ethanolu v koncentracích pohybujících se mezi 70-100% a promytí ve sterilní dH₂O (Alonso et al. 2001, Anđelinović et al. 2005, Davoren et al. 2007, Malmström et al. 2007).

4. Principy extrakce

Při molekulárních analýzách kosterních ostatků je prvním a hlavním cílem izolovat co největší množství přítomné nukleové nebo mitochondriální aDNA. Zároveň je důležité očistit finální vzorek co nejdůkladněji od všech látek, které by mohly inhibovat následnou amplifikaci (viz. kap. 5. Inhibitory PCR) a vyhnout se jakékoli kontaminaci cizorodou DNA. Všem těmto požadavkům musí být přizpůsobená zvolená metodika. Všechny metody jsou různými variantami a modifikacemi obecného protokolu, který by měl obsahovat tyto kroky: dekalifikaci, lyzaci proteinů, izolaci aDNA, purifikaci a koncentraci finálního vzorku pro následnou amplifikaci pomocí PCR. Mohou být prováděny samostatně nebo být různě spojeny do jednoho procesu. Následující podkapitoly by měly být určitým přehledem možných přístupů vhodných pro práci s kosterními pozůstatky.

4.1. Mechanická pulverizace

První překážkou na cestě k vytyčenému cíli jsou fyzikální a chemické bariéry, které normálně chrání aDNA v kosti proti okolní degradaci a biologickému ataku (Salamon et al. 2005, Loreille et al. 2007). Po očištění a dekontaminaci zkoumané kosti je tedy nutná dokonalá pulverizace vzorku. K tomuto účelu se používá nepřeberné množství pomůcek, speciálně k tomuto účelu navržených, nebo vhodné nástroje s jiným využitím (např. dentální ruční vrtačka). Při drcení kosti se využívá nejdříve zamražení kosterního vzorku a někdy i drtiče v tekutém dusíku. Pokud se kosterní prášek získává vrtáním, mělo by se zabránit vysokým teplotám, které by mohly degradovat přítomnou aDNA (Alonso et al. 2001). Společnou podmínkou všech používaných pomůcek je sterilita, a to včetně sterilizace nástrojů mezi jednotlivými vzorky (Kemp & Smith 2005).

4.2. Metody extrakce

4.2.1. EDTA dekalifikace

Kosterní prášek je možné před samotnou extrakcí dekalifikovat v samostatném předřazeném kroku pomocí ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA). Tento postup byl použit už v jedné z prvních prací zabývajících se aDNA (Hagelberg and Cleg 1991). Kosterní prášek byl inkubován v 0,5 M EDTA, pH 8,5 po dobu 72 h. V této práci se kompletní dekalifikace neprokázala jako potřebná pro úspěšnou extrakci aDNA a v některých případech dokonce úspěch zmenšila. Naproti tomu kratší inkubace se ukázala jako výhodná k odstranění tmavého zbarvení (humínové kyseliny nebo železo). Někdy se doporučuje po dekalifikaci zbavit vzorek všech zbytků EDTA důkladným promytím sterilní destilovanou vodou. V lyzačním pufru se pak tato látka vynechává a navíc se přidává CaCl_2 , což by mělo zajistit optimální aktivitu proteinázy (Parr et al. 1996). Loreille a spol. (2006) ve své práci zavedla velmi úspěšný demineralizační protokol, při kterém dojde k absolutnímu fyzikálnímu rozpuštění kosterního prášku. Tímto postupem se podařilo extrahovat aDNA ze vzorků, u kterých opakovaně selhaly standardní metody (Loreille et al. 2006).

S úspěchem byl dekalifikační krok používán v letech 1993-2005 v Laboratoři pro klinickou a forenzní genetiku v Chorvatsku na kosterních ostatcích z masových hrobů (Anđelinović et al. 2005). Použitý protokol byl velmi účinný jako následný krok u vzorků, u kterých selhala i opakovaná fenol/chloroform/isoamyl alkoholová extrakce (viz. kap. 4.2.2. Organická extrakce), proto uvádím celý postup .

Ke 2 g kosterního prášku se přidá 16 ml 0,5 M EDTA, pH 7,5 a ponechá při pokojové teplotě 24 h na třepačce. Roztok je následně centrifugován (15 min, 2 000 rpm) a supernatant odstraněn. Ke vzorku se přidá opět 16 ml EDTA a celý proces se opakuje v průběhu 3-5 dnů. Nakonec je pelet rozpuštěn v 16 ml destilované vody, centrifugován (15 min 2 000 rpm) a supernatant odstraněn. Tento krok se dvakrát i víckrát opakuje.

Dekalifikace následována obvyklou extrakcí byla zvolena u 132 vzorků s 84,9 % úspěšností. Účinné byly i dalších varianty protokolů, hlavně se zkrácením časových intervalů (Anđelinović et al. 2005).

4.2.2. Organická extrakce

Základní metodou používanou pro izolaci aDNA z historického kosterního materiálu je fenol/chloroform/isoamyl alkoholová extrakce zavedená Sambrookem a spol. (1989). V jednodušší podobě bez isoamyl alkoholu byla použita jako nejlepší ze tří testovaných metod v práci Hagelbergové a Clega (1991). Od té doby bylo publikováno mnoho různých variant této metody. V následujícím odstavci jsem se pokusila shrnout základní kroky.

Kosterní prášek se nejdříve nechá dekalifikovat a naštěpit v extrakčním pufru obohaceným o proteinázu K (PK pufr). Ve většině případů obsahuje Tris-HCl, NaCl, chelační činidlo EDTA a některý z detergentů, např. sodium dodecyl sulfát (SDS). Proteináza K se přidává pro štěpení bílkovinné složky kosterní matrix. Vzorek se nechá inkubovat za mírného míchání několik hodin (18-24) při zvýšené teplotě (37-56°C). Při těchto podmínkách by mělo dojít k uvolnění DNA od kosterní matrix. Následně proběhne organická extrakce. K naštěpenému vzorku se přidá směs fenol/chloroform/isoamyl alkohol v poměru 25:24:1, za mírného promíchávání nechá inkubovat (30 s až 10 min) a následně se centrifuguje. Tento krok se opakuje až do odstranění přítomného zbarvení. K odstranění zbytků fenolu se supernatant přenesse do jiné zkumavky obsahující směs chloroform/isoamyl alkohol 24:1 a znovu následuje inkubace (30 s až 5 min) a centrifugace. Tento krok se opět může opakovat (Alonso et al. 2001, Davoren et al. 2007). Přestože se vodná fáze většinou nachází nad organickou, může vysoká koncentrace solí ve vzorcích způsobit opačné rozdělení fází. Tento problém může nastat speciálně při extrakcích aDNA z kostí (Sambrook and Russell 2001). Finální vzorek s aDNA se nakonec koncentruje pomocí některého z centrifugačních filtračních systémů (např. Centricon YM- 100). Tyto mikrokoncentrátory obsahují anisotropní membránu, která zadržuje makromolekuly jako je DNA a propouští nízkomolekulární polutanty včetně rozpouštědla. Zároveň se tedy zvyšuje koncentrace DNA ve vzorku. Nevýhoda přímého použití mikrokoncentrátoru po organické extrakci spočívá v tom, že zároveň koncentruje i případné inhibitory PCR. Z tohoto důvodu je množství aDNA získané touto metodou většinou menší než při použití některého z purifikačních kroků (Yang et al. 1998, Davoren et al.2007).

Vhodnějším postupem je kombinace organické extrakce s následnou purifikací komerčními kolonkami (viz. dále). Jeden z úspěšných protokolů využívající tuto kombinaci byl například použit v letech 1993-2007 pro identifikaci asi 60-70 let starých kosterních zbytků Finských vojáků z Druhé světové války pohřbených na dnešním ruském území. Inkubace kosterního prášku proběhla ve standardním PK pufru, následovala

fenol/chloroform/isoamyl alkoholová extrakce a koncentrace na mikrokonzentrátoru Centrex UF-2 (Schleicher & Schuell). Purifikace od případných nečistot a inhibitorů byla provedena pomocí QIAquick™ kitu (Qiagen 2007). Ze 181 molekulárně testovaných kosterních vzorků se DNA podařila extrahovat ze 167. Devadesáti procentní úspěšnost byla u dlouhých kostí jako je humerus, tibie nebo femur, oproti jen 51,2% úspěchu izolací z krátkých kostí (Palo et al. 2007).

4.2.3. *Extrakční metody vázané na křemičité (silika) partikule*

4.2.3.1. Protokol založený na silika a guanidinium thiokyanátu (GnSCN)

Poprvé byly pro extrakci aDNA použity křemičité (silika) mikročástice v metodě Hösse a Pääba (1993). Vzorek kosterního prášku byl nejdříve inkubován ve standardním extrakčním pufru navíc obohaceným o guanidinium thiokyanát (GnSCN). Po centrifugaci se získaný supernatant nechal dále inkubovat znovu ve stejném pufru spolu se suspenzí obsahující silika mikropartikel (dioxid křemíku) nebo skleněné mikrokuličky. GnSCN působí jako chaotropní činidlo, které napomáhá denaturaci proteinů a zároveň zprostředkovává vysoce specifickou vazbu aDNA na silika mikropartikel (Höss and Pääbo 1993). Pelet s mikročásticemi byl pak důkladně promyt a aDNA byla za vhodných podmínek uvolněna. Takto byla extrahována aDNA z kostí 25 tis let starých. Vysoké riziko kontaminace pufrů obsahujících GnSCN moderní DNA bylo rovněž řešeno vyvázáním případné DNA mikropartikelmi. Výhodou této metody je vyšší specifita pro DNA a menší pro přítomné PCR inhibitory. Nicméně samotné silika partikule mohou být silným inhibitorem a je tedy nutné věnovat velkou pozornost dokonalému oddělení finálního extraktu od peletu mikropartikel (Höss and Pääbo 1993). Komparativní studií porovnávající silika metody pro izolace DNA z historických kostí bylo prokázáno, že komerčně dostupné silika kolonky (viz. dále) jsou mnohem více účinné než tento postup (Bouwman and Brown 2003).

4.2.3.2. Silika extrakce pomocí QIAquick PCR purifikačního kitu

O pět let později publikoval Yang a spol. (1998) protokol vycházející z práce Hösse a Pääba (1993) a ze standardní metody organické extrakce s využitím mikrokonzentrátoru

Centricon-30 (Amicon) (Hagelberg and Cleg 1991). Z první metody využil výhody navázání aDNA na mikročástice tím, že použil QIAquick PCR purifikační kit. Tento komerčně dostupný kit obsahuje kolonku s pevně navázanými silika partikulami, čímž byl vyřešen problém vysokého rizika inhibice PCR volnými mikropartikulami. QIAquick kolonky jsou navrženy tak, aby zachycovaly molekuly DNA o velikosti mezi 100 bp a 10 kb a zároveň propouštěly volné nukleotidy, proteiny a sole. Tyto kolonky jsou tedy obzvláště vhodné pro extrakce aDNA, která je vždy velmi degradovaná. Většinou se amplifikují molekuly okolo 300 bp dlouhé. U delších řetězců DNA (nad 10 000 bp) by se dalo předpokládat, že je vzorek kontaminovaný moderní DNA. Protokol popisující práci s těmito kolonkami je popsán v následujícím odstavci.

Po inkubaci kosterního prášku v extrakčním pufru a dvou centrifugacích se k supernatantu přidá pět objemů QIAquick PB pufru a 750 µl této směsi se za sterilních podmínek přenesou přímo na QIAquick kolonku. Následuje centrifugace (12 800 g 1 min) a tento krok se opakuje až celý objem extraktu projde přes kolonku. Navázaná aDNA se následně promyje 750 µl PE pufru a nakonec uvolní 100 µl TE pufru při stejných podmínkách centrifugace.

Yang a spol. (1998) testoval novou metodu na kosterních vzorcích starých od 15 do 5 000 let. Pro účely porovnání účinnosti vyzkoušel 4 protokoly:

A. Fenol/chloroformová extrakce následovaná koncentrací pomocí Centriconu-30 (Hagelberg and Cleg 1991)

B. Fenol/chloroformová extrakce následovaná koncentrací a QIAquick purifikací

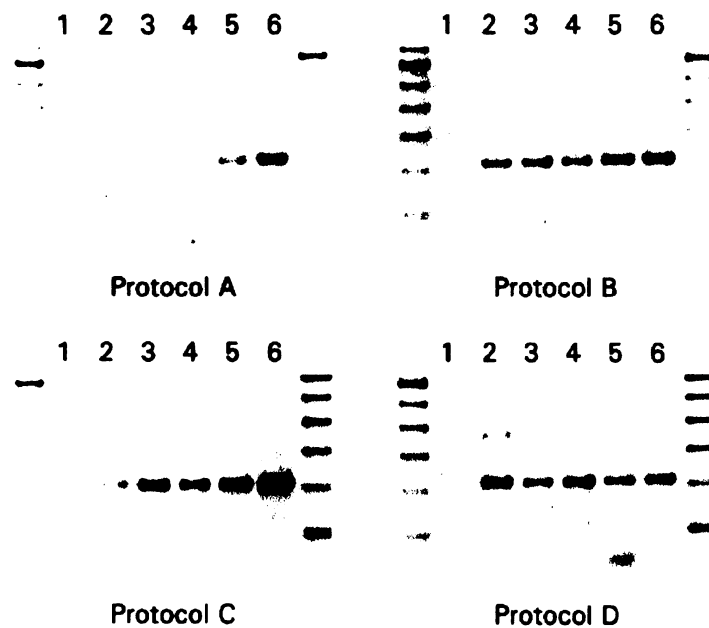
C. Přímé použití Centricon-30 mikrokoncentrátoru a následné QIAquick purifikace po inkubaci vzorku v extrakčním pufru (bez fenol/chloroformové extrakce)

D. Přímé použití QIAquick kolonky po inkubaci v extrakčním pufru (bez fenol/chloroformové extrakce a koncentračního kroku)

V protokolu využívajícím Centricon-30 po inkubaci v extrakčním pufru (C) byl vzorek přenesen do mikrokoncentrátoru a centrifugací (2 000 g) byl jeho objem redukován na požadovanou úroveň. Retentát byl pak normálně smísen s 5 objemy PB pufru a nanesen na kolonku.

Výsledky po amplifikaci ukázaly na úspěšné použití protokolů B, C a D. Metodou A se podařilo získat aDNA jen ze vzorků 15 a 200 let starých (viz. obr. 6). Navíc byly takto získané vzorky výrazně hnědě pigmentované a PCR amplifikace nebyla úspěšná. Naproti tomu vzorky z ostatních protokolů byly úplně čisté a aDNA byla amplifikována ze všech vzorků. To ukazuje na nedostatečné odstranění PCR inhibitorů u přímého použití Centricon mikrokoncentrátorů po organické extrakci. Negativní kontroly neodhalily kontaminaci a

nepřímo potvrdily autenticitu výsledků. U protokolu C a D byla kolonka QIAquick použita pro extrakci i purifikaci a byl tedy maximálně snížen počet kroků pro manipulaci se vzorky (hlavně u protokolu D). Velmi se tím snížilo riziko kontaminace moderní DNA a navíc může být tato metoda díky své jednoduchosti a nenáročnosti na vybavení používána i v méně vybavených laboratořích. Potencionální limitací protokolu D je ovšem objemová kapacita kolonek (750 μ l = 125 μ l vzorku a 625 μ l PB pufru). Jako praktické pro využití se doporučuje 4-5 nanesení na kolonku při vyšším objemu vzorku než 125 μ l (Yang et al. 1998).



Obr. 6: Srovnání produktů PCR z extrahovaných vzorků získaných protokoly A, B, C a D. 1- blank, 2- 5 tis. let, 3- 2 tis. let, 4- 300 let, 5- 200 let a 6- 15 let starý kosterní vzorek (Yang et al. 1998).

4.2.3.3. Tissue and Hair extrakční kit a DNA IQ™ izolační systém

Dalším komerčně dostupným kitem, který je použitelný pro DNA izolaci z kosterního materiálu je DNA IQ™ izolační systém od Promega. Tento systém je speciálně navržen pro forenzní účely k izolaci DNA z krve, tělních tekutin a z biologických skvrn. Extrakce DNA je zprostředkována specifickým navázáním na silikou obalené paramagnetické částice (DNA IQ™ Resin), jež se následně separují pomocí magnetického systému (např. PolyAtract® System 1000 Magnetic Separation Stand, Promega). Velkou výhodou je vynechání centrifugačních kroků a menší potřebný počet promývacích kroků, čímž se redukuje množství ztrát DNA. Systém je navržen pro izolaci maximálně 100 ng DNA. Vzhledem k obvykle

malému množství aDNA ve starých nebo velmi degradovaných kostech je tato metoda pro izolaci aDNA optimální (Ye et al. 2004). Extrahovaná aDNA by měla být vysoce purifikována od případných PCR inhibitorů a jiných nečistot (Promega 2005). Protože lyzační pufr DNA IQ™ systému není dostatečně účinný pro tvrdé tkáně, byl vyvinut Tissue and Hair Extraction kit s následným použitím DNA IQ™. Set pro extrakce z kostí obsahuje speciálně pro kosti určený inkubační pufr, proteinázu K, inkubační pufr a dithiothreitol (DTT) (Promega 2006).

Komerční kit byl testován Anđelinovićem a spol. (2005) jako doplňková metoda se standardní metodou inkubace vzorku v lyzačním pufru s následnou fenol/chloroform/isoamyl alkoholovou extrakcí (Alonso et al. 2001). Použitý postup byl modifikací Promega protokolu pro DNA IQ™ systém (Promega 2005) a obsahuje tyto kroky:

Ke 2 g pulverizovaného vzorku se přidají 3 ml Lyzačního/Extrakčního pufru a 200 µl roztoku proteinázy K (20 mg/ml) a směs se 15 min při 56°C nechá inkubovat. Po centrifugaci (4 min 4 000 rpm) se k supernatantu přidají dva objemy Lyzačního pufru a 15 µl DNA IQ™ Resin a vzorek se 10 min znovu inkubuje při pokojové teplotě. Separace je provedena jako v protokolu od Promegy pomocí magnetického stojanu. K peletu mikročástic s navázanou aDNA se přidá Lyzační pufr (100 µl) a separace se opakuje. Stejný postup se ještě třikrát opakuje, ale s Promývacím pufrem. Získaný pelet se nechá oschnout 5-15 min na magnetickém stojánku. Navázané nukleové kyseliny jsou uvolněny 30 µl Elučního pufru (inkubace 5 min při 65°C) a separovány od mikročástic opět pomocí magnetismu. Všechny reagenty a pomůcky jsou komerčně dostupné (Anđelinović et al. 2005).

Při porovnávání množství úspěšně izolovaných vzorků byl DNA IQ™ systém stejně spolehlivý jako organická metoda. Ovšem po srovnání průměrného množství aDNA pomocí spektrofotometrické analýzy se ukázal tento systém skoro dvakrát účinnější (v průměru 64 ng DNA oproti 100 ng).

4.2.3.4. OIAamp DNA Blood Maxi kit (Qiagen)

Jedním z novějších postupů pro izolaci DNA z kostí využívá komerčně dostupného kitu od firmy Qiagen. OIAamp DNA Blood Maxi kit byl původně navržen pro extrakce genomové, mitochondriální nebo virové DNA z krve a ostatních tělních tekutin. DNA o velikosti od 200 bp do 50 kb se v tomto případě váže na membránu tzv. silica gelu, což je synteticky vyrobená pórovitá forma dioxidu křemíku (silica mikroparticulí). Tato metoda je

používaná pro identifikaci 10 až 15 let starých kosterních ostatků z masových hrobů v oblasti bývalé Jugoslávie. Ve článku Davorena a spol. (2007) byl popsán používaný protokol a zároveň byla srovnána jeho účinnost se standardní fenol/chloroform/isoamyl alkoholovou extrakcí. Získaná aDNA z obou metod byla kvantifikována real time PCR a přítomnost PCR inhibitorů byla zároveň posuzována podle zvýšených hodnot Ct. Identifikace byla provedena pomocí profilu STR Power Plex 16. Protokol extrakce byl následující:

Pulverizovaný kosterní prášek (5-10 g) je nejprve vystaven působení 15 ml ATL extrakčního pufru, 10 mg proteinázy K (20 jednotek/ μ g; Invitrogen) a 300 μ l 1 M DTT po dobu 18 h za mírného míchání v 56°C vodní lázni. Následuje druhý inkubační krok se 14 ml AL pufru (všechny používané pufrы jsou součástí kitu), 1 h při 70°C. Po centrifugaci (1000 g po 5 min) se supernatant přenesse do nové zkumavky a společně s 22 ml 96 % ethanolu míchá invertací 15 s. DNA je pak navázána na membránu ve třech krocích, ve kterých je směs nanášena na kolonku a centrifugována (2000 g 3 min). Od navázané DNA jsou následně odstraněny všechny nečistoty a potencionální PCR inhibitory během prvního a druhého promývání. Nejdříve 10 ml AW1 pufru a po centrifugaci (2000 g 3 min) ještě AW2 pufrem. Doba centrifugace je prodložen na 10 min, aby došlo k odstranění všech zbytků pufru. Nakonec je DNA uvolněna 3 ml AE pufru ohřátého na 72°C a centrifugací (2000 g 3 min). Tento krok se ještě jednou opakuje. Výsledných 100 μ l finálního roztoku DNA je získáno dvoukrokovou koncentrací a promytím na kolonce Centricon YM-100 od firmy Millipore a použitím vakuového koncentrátoru od Eppendorfu.

Vzorky extrahované pomocí OIAamp DNA Blood Maxi kitu obsahovaly množství DNA vztažené na hmotnost kosterního prášku v rozmezí od 0,25 ng/g do 9,58 ng/g (medián: 1,49), naproti tomu množství DNA získané organickou metodou se pohybovalo v intervalu 0,0016-4,48 ng/g (medián: 0,27). Plný profil 16 lokusů se podařilo pomocí organické metody amplifikovat jen u 14 z 20 vzorků a při amplifikaci se také více projevila inhibice v porovnání s druhou testovanou metodou. Výsledky studie dokumentuje obr. 7.

Davoren vysvětluje větší účinnost nové metody dokonalejšími extrakčními vlastnostmi ATL a AL pufrů, jež jsou schopné lépe uvolnit DNA od kostní matrix. Hlavním činidlem by mohla být vyšší koncentrace EDTA (její koncentrace není známa). Dalším možným důvodem je vysoká schopnost silika membrány vázat a extrahovat DNA (Davoren et al. 2007).

Sample	Mass (g)	Method			
		silica		organic	
		concentration (pg/ μ L)	bone (ng/g)	concentration (pg/ μ L)	bone (ng/g)
9100990	9.8	147	1.50	0.16*	0.0016*
9100856	8.8	82	0.94	0.22*	0.0025*
9101158	7.3	197	2.70	6*	0.0777*
9100880	7.6	135	1.78	6*	0.0751*
9100850	5.7	164	2.88	7	0.1160
9102659	8.9	23	0.25	9	0.0965
9100830	8.1	199	2.45	11	0.1339
9100986	7.1	48	0.68	11	0.1566
9100835	5.6	53	0.95	11*	0.2017*
9102658	8.1	39	0.48	15*	0.1887*
9100993	5.9	92	1.56	20	0.3380
9102665	8.0	44	0.55	27	0.3391
9100828	8.4	125	1.48	31	0.3662
9100854	5.7	50	0.88	39	0.6888
9100822	8.7	92	1.06	63	0.7246
9102654	5.6	186	3.31	68	1.2116
9102913	7.0	174	2.49	85	1.2192
9100838	8.0	152	1.91	121	1.5149
9102612	8.1	108	1.33	141	1.7440
9101338	5.7	546	9.58	256	4.4880

*Fewer than 16 loci with reportable alleles.

Obr. 7: Množství úspěšně izolované DNA (z 10-15 let starých kostí) silika a standardní organickou extrakcí (Davoren et al. 2007).

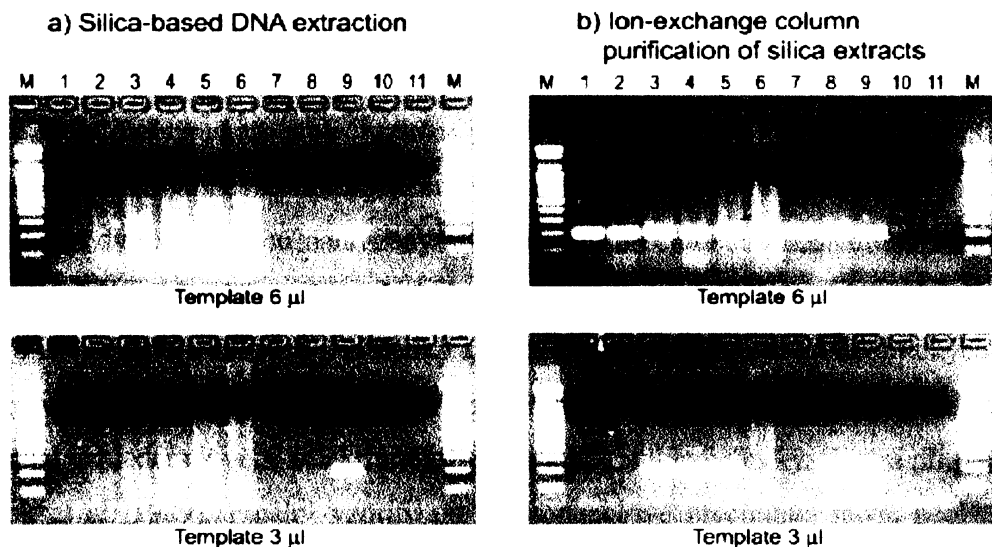
4.2.3.5. Silika mikropartikule, GnSCN a ionexové kolonky

Poměrně nedávno byla publikována studie porovnávající velkou část zatím používaných organických nebo silika metod. Jejím výsledkem bylo zavedení poměrně jednoduchého, rychlého a ekonomického protokolu pro extrakci aDNA z historických a prehistorických kostí a zubů. Rohland a Hofreiter (2007) přímo navazují na metodu Hösse a Pääba (1993), kterou ještě více zjednodušují a optimalizují. Vyhýbají se dlouhé dekalcificační inkubaci, použití detergentů, potenciálně nebezpečných organických rozpouštědel, nutných při fenol-chloroformových extrakcích, a drahým mikrokoncentrátorům. Naopak využívají kombinaci extrakčního pufru s EDTA a proteinázou K, velmi účinné purifikace DNA pomocí silika partikulí a vysoké koncentrace guanidinium thiokyanátu. Zároveň se snaží snížit riziko ještě další degradace aDNA tím, že se všechny kroky mohou provádět při pokojové teplotě (Rohland & Hofreiter 2007, Kim et al. 2008).

Výše zmíněnou metodu dále modifikuje Kim a spol. (2008). Publikovaný protokol Rohlanda a Hofreitera použil na různě starých kosterních ostatečích (od 100 až do 3 300 let). Pro potřeby dokonalejší purifikace u obtížně analyzovatelných vzorků zavedl další krok

s ionexovou kolonkou (QIAGEN Genomic-tip 20/G, Qiagen). Purifikace ionexovými kolonkami byla do té doby používána pro DNA extrahovanou z půdních organismů, která obsahuje velké množství PCR inhibitorů z půdy. Ionexová kolonka je tedy velmi vhodná pro pročištění extrahované aDNA (Kim et al. 2008).

Protokol začíná inkubací kosterního prášku (asi 1 g) v 10 ml lyzačního pufru s 0,45 M EDTA a 0,5 mg/ml proteinázy K přes noc. Po centrifugaci se k supernatantu přidá 35 ml extrakčního pufru (5,5 M GnSCN, 20 mM Tris-HCl, pH 4,8) a 180 µl silika suspenze, pH se upraví na 4. Následuje inkubace 3 h za stálého míchání a centrifugace. Získaný pelet se promyje 1 ml extrakčního pufru a dvakrát 1 ml promývacího roztoku (51,3 % ethanol, 125 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Silika pelet se nechá 15 min na vzduchu oschnout, resuspenduje se v 200 µl 1x TE a po 8 min inkubace se znovu centrifuguje (při maximální rychlosti). Uvolněná aDNA v supernatantu je dále purifikována na ionexových kolonkách. Směs 100 µl supernatantu a 2 ml QBT pufru (Qiagen) se nanese na kolonku, promyje 15 ml QC pufru a aDNA se uvolní 7 ml QF pufru. Získaný vzorek se koncentruje na přibližně 200 µl pomocí centrifugačního filtračního systému (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit s Ultracel-30 membránou). Koncentrát je nakonec ještě více koncentrován a dvakrát promyt 500 µl 1x TE, aby se snížilo množství solí a isopropanolu z QF pufru, na Microcon YM-30 centrifugačním filtru (Millipore).



Obr. 8: Srovnání amplifikovaného produktu amelogeninu (201 bp) na agarozovém gelu. a) Extrakce silika metodou (Rohland & Hofreiter 2007), b) extrakce pomocí silika s purifikací ionexovými kolonkami. Vzorky 2, 3, 4 (5. až 7. st.), 5, 6, 9 (14. až 19. st.), 1, 7, 8 (3. až 13. st. př.n.l.), M- marker, 10- blank, 11- dH₂O (Kim et al. 2008).

Metoda byla porovnáována s protokolem bez ionexových kolonek podle úspěchu amplifikace dvou úseků mtDNA (263 a 440 bp) a amelogeninu (pro určení pohlaví) na devíti vzorcích (viz. obr. 8). Demonstrovány výsledky ukázaly, že purifikace ionexovými kolonkami po silika extrakci zvyšuje šance na pozitivní výsledky PCR. Navíc se s testovanou metodou podařilo amplifikovat všechny tři sekvence u třech vzorků, u kterých byl negativní výsledek se silika metodou a tyto vzorky mohly být považovány za falešně negativní (Kim et al. 2008).

4.2.4. Využití alkoholové precipitace

4.2.4.1. Ethanolová nebo isopropanolová precipitace

Jedním z hlavních cílů úspěšné extrakce aDNA je odstranění všech potenciálních inhibitorů PCR. K tomuto účelu se využívá purifikace precipitací pomocí sodium-acetátu, ethanolu nebo isopropanolu (Cattaneo et al. 1995, Hänni et al. 1995). Catherine Hänni a spol. (1995) obohatila klasickou organickou extrakci o krok isopropanolové precipitace a zároveň porovnála účinnost tohoto postupu s použitím ethanolu. Následující odstavec shrnuje metodický postup a dosažené výsledky. Metody zvolené pro očištění a dekontaminaci kosterních vzorků nebyly v práci popsány.

Vzorek kostního prášku se tradičně inkubuje v extrakčním pufru a aDNA je izolována fenol/chloroformovou metodou (Hagelberg & Cleg 1991). Při tomto postupu je získaná vodná fáze ještě 4 h dialyzována proti roztoku EDTA a Tris-HCl a následně koncentrována centrifugačním mikrokonzentrátořem (Centricon 30) (viz. kap. 4.2.2. Organická extrakce). Právě poslední dva kroky jsou nahrazeny alkoholovou precipitací a následným rozpuštěním peletu ve sterilní vodě. Při pokusech byly porovnávány výsledky protokolů při použití ethanolu a isopropanolu zároveň s výsledky klasického protokolu u dvou neolitických vzorků kostí. Ancient DNA byla amplifikována jen při použití isopropanolu. Tento výsledek se předpokládá vzhledem k větší selektivitě isopropanolu k nukleovým kyselinám při precipitaci (Sambrook et al. 1989). Finální vzorky po isopropanolové precipitaci navíc neobsahovaly (nebo jen mírně) tradiční hnědé zbarvení přítomné obvykle při organických extrakcích. Hnědé pigmenty jsou brány jako jeden z možných indikátorů potenciálních PCR inhibitorů. Dalším takovým znakem je fluorescenční modravé zbarvení DNA nanesené na agarózový gel po ozáření UV světlem. Intenzita tohoto indikátoru byla také výrazně snížena u isopropanolových vzorků, ale v různé míře byla stále patrná. Hänni a spol. (1995) tedy

zároveň prokázala pozitivní korelaci mezi intenzitou hnědého zbarvení, modré fluorescence a mírou inhibice PCR.

4.2.4.2. Modifikovaná ethanolová precipitace využívající Dextran Blue

V roce 2000 Kalmár a spol. publikoval maximálně zjednodušenou metodu pro izolaci aDNA, jež vychází ze zkušeností do té doby publikovaných metod. V protokolu popsaném podrobněji níže je využito alkoholového srážení pro DNA extrakci i purifikaci od PCR inhibitorů (Hänni et al. 1995). Zcela vynechán je krok organické extrakce, včetně dalších pomocných kroků jako je dekalifikace, dialýza nebo koncentrace na mikrokoncentrátoru. Metoda byla testována na 10 kosterních vzorcích ze 7. až 15. st. ze čtyř maďarských pohřebišť.

Pulverizovaný vzorek se nejprve nechá inkubovat s 1,6 ml klasického extrakčního pufru (0,1 M EDTA, 0,5% sodium N-laurylsarkosin, 100 mg/ml proteinázy K) při 37°C přes noc za stálé vertikální rotace. Po centrifugaci (12 000 rpm 10 min) se 250 µl supernatantu smísí s 3,5 µl Dextranu Blue (1 µg/µl, Sigma), 250 µl 4 M NH₄-acetátu a 500 µl 96% ethanolu a promíchá vortexováním. DNA se precipituje při -70°C po dobu 7 min. Na srážení malé koncentrace nukleových kyselin se s ethanolem podílí vysokomolekulární Dextran Blue, jež zároveň zbarvuje pelet. Získaný vzorek s aDNA se nakonec centrifuguje (14 000 rpm 15 min, při 4°C) a pelet se resuspenduje v 20-30 µl deionizované H₂O. Z izolovaných vzorků byla amplifikována mDNA *Taq* DNA polymerázou v jedné reakci s 35 cykly.

Získané výsledky byly porovnávány s protokolem Hänni a spol. (1995). Vzorky, u nichž byla použita metoda isopropanolového srážení, stále projevovaly modré fluorescenční zbarvení, které bylo důsledkem přítomných Maillardových produktů (Kalmár et al. 2000). Inhibiční efekt se snížil s vyšším naředěním vzorků. Na agarózovém gelu s nanesenými vzorky získanými Kalmárovou metodou se modré zbarvení vůbec neobjevilo a aDNA byla amplifikována ze všech deseti vzorků. K amplifikaci DNA z "isopropanolových" vzorků bylo navíc vzhledem k přítomnosti inhibitorů potřeba dvou po sobě jdoucích PCR reakcí s 40 cykly, čímž se zvýšilo riziko kontaminace moderní DNA. Úspěšné odstranění inhibitorů PCR je vysvětlováno aplikací Blue Dextranu, který sráží jen DNA. Rozdílem je také použití ethanolu místo isopropanolu (Kalmár et al. 2000).

4.2.5. Odlišné varianty extrakčních pufků

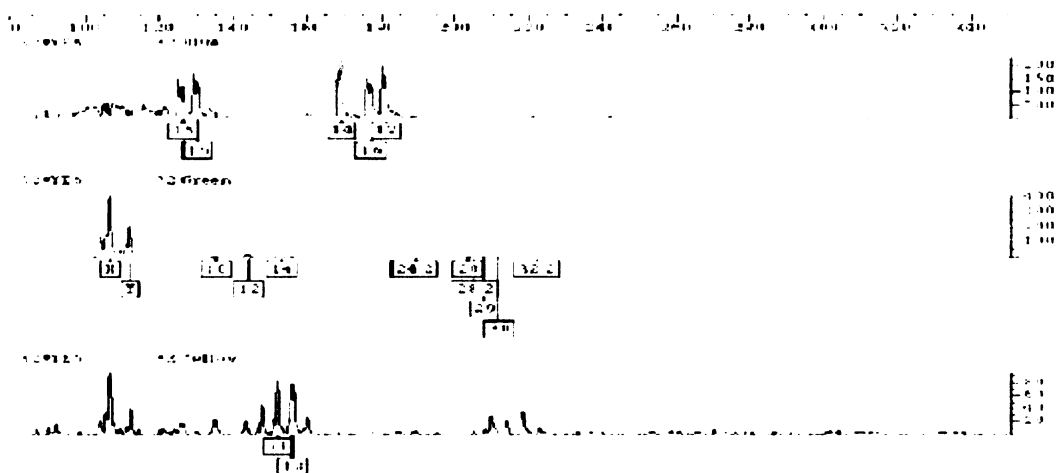
4.2.5.1. CTAB + isoamyl alkohol/chloroformová extrakce a silika purifikace

Metoda publikovaná v roce 2004 (Ye et al. 2004) se v první řadě zaměřuje na volbu složek extrakčního pufku, která bývá kritickým krokem při izolaci DNA ze starých a různě poškozených kostí. Místo klasického je použit extrakční pufk obohacený o cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a 2-merkptoethanol. CTAB je kationtový detergent, který je velmi efektivní při disintegraci buněk (Yang et al. 1997). Společně s 2-merkptoethanolem používaným k denaturaci proteinů je velice účinný při disintegraci kostní tkáně a uvolňování DNA. Tento pufk byl již v minulosti použit (Yang et al. 1997) na muzejních a fosilních kostech, od 2 do 46 000 let starých, na kterých byla porovnávána účinnost tehdy využívaných metod. Yang a spol. (1997) po inkubaci kosterních vzorků v CTAB pufku následně aDNA extrahoval fenol/chloroformem a vysrážel ethanolem. Níže popsáný protokol je modernější variantou použití CTAB pufku (Ye et al. 2004). Kosterní vzorky použité v této práci byly dekontaminovány hypochloridem sodným a UV ozářením bez odstranění svrchní vrstvy.

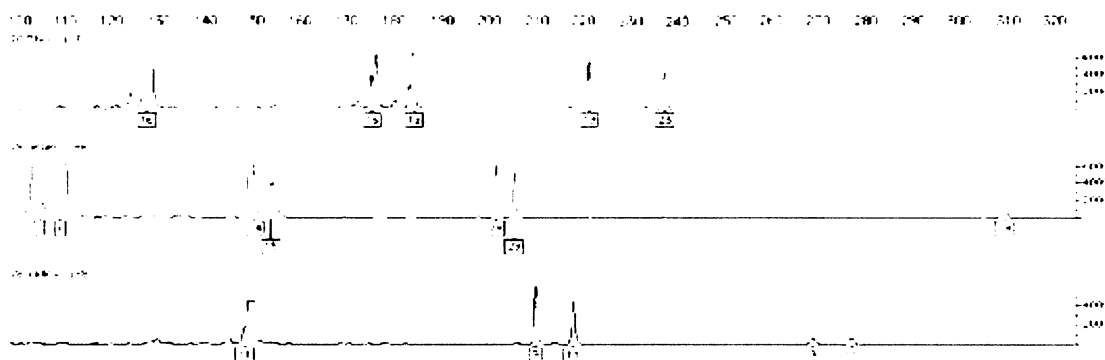
Navrtáním získaný vzorek kosterního prášku (1-3 g) se smísí s CTAB pufkem (2 % CTAB, 100 mmol/l Tris-HCl pH 8,0, 20 mmol/l EDTA, 1,4 mmol/l NaCl a 0,2 % 2-merkptoethanol) a třením v hmoždíři se dokonale spojí. Získaná pasta se přenesse do 5 ml zkumavky, naředí stejným CTAB pufkem (1 ml CTAB pufku na 1 g prášku) a nechá inkubovat při pokojové teplotě přes noc. Aby se DNA od kosterní tkáně uvolnila, nechá se směs zahřívát 1-1,5 h ve vodní lázni o 65°C a každých 10-15 min se promíchá. Po centrifugaci (5 000 rpm 25 min) se k získanému supernatantu přidá stejný objem směsi chloroform/isoamyl alkohol 24:1. Po jemném promíchání se vzorek centrifuguje (5 000 rpm 25 min) a horní vodná fáze se přenesse do nové zkumavky. K purifikaci je možné použít DNA IQ™ systému (Promega 2005) nebo QIAquick™ kitu od Qiagenu (viz. kap. 4.2.3.2. Silika extrakce s kolonkami QIAquick™ nebo metodu dle Yanga et al. 1998).

Vzorky použité pro pokus byly 1 až 9 let staré, dále kosti přibližně po dobu dvou let vystavené účinkům vody a spálené vzorky kostí nalezené po dopravních nehodách. Úspěšnost byla porovnávána s výsledky izolace jednou z klasických fenol/chloroformových extrakcí s použitím Centriconu- 100 na koncentraci vzorku a DNA Clean- UP systému pro purifikaci (Promega). Pro srovnání bylo nejprve použito celkové množství izolované DNA a výsledky elektroferogramů po STR genotypizaci (AmpF STR Profiler Plus PCR Amplification kit,

Applied Biosystems). Metodou s CTAB pufrém bylo získáno větší množství DNA a podstatně lepší výsledky STR genotypizace (viz. obr. 9a,b) (Ye et al. 2004).



Obr. 9a: STR elektroferogram DNA vzorku kosti tři roky po smrti. DNA byla extrahována fenol-chloroformem a koncentrována Centricon-100 kolonkami, s následnou purifikací DNA Clean-up systémem (Ye et al. 2004).



Obr. 9b: STR elektroferogram DNA vzorku kosti, která byla dva roky po smrti máčena ve vodě. Extrakce byla provedena metodou CTAB pufr + isoamyl alkohol-chloroform, s následnou purifikací kolonkami QIAquick (Ye et al. 2004).

4.2.5.2. Kolagenáza typu I. a fosfátový pufr

Poměrně odlišné složení extrakčního pufru bylo zvoleno pro postup použitý ve studii analyzující mitochondriální aDNA z prehistorických (až 5 000 let) a historických (11.-15.st.) kosterních ostatků skotu. V tomto případě se pulverizovaný vzorek kosti (70 mg) nejprve inkubuje při 37°C v 1 ml kolagenázového pufru (1 mM EDTA/10 mM NaCl/10 mM Tris-HCl, pH 7,5) a 5 mg kolagenázy typu I po dobu 16 h. Po centrifugaci (300 x g 5 min) se

odstraní supernatant a pelet se rozmíchá s 1 ml fosfátového pufru (0,2 M K_2HPO_4 , pH 7,0) a znovu centrifuguje (1 300 x g 10 min). Získaný vzorek s aDNA se koncentruje pomocí centrifugačního filtračního systému (30000 MWCO Amicon Ultra-4 Centrifugal filter, Millipore). Fosfátový extrakční pufr a kolagenáza typu I by měly zajistit velmi účinnou lýzi kostní matrix a uvolnění aDNA od hydroxyapatitu. Navíc je díky kolagenáze odstraněn jeden z nejdůležitějších PCR inhibitorů (Anderung et al. 2005).

5. Inhibitory PCR

Jak už bylo několikrát poznamenáno, DNA je v historickém nebo degradovaném kosterním materiálu obvykle zoufale málo. Po extrakci je tedy nezbytně nutná amplifikace pomocí PCR. Jedním z největších úkolů extrakční metody je odstranit ze vzorku organické nebo anorganické látky, které bývají nejzávažnější překážkou při amplifikaci získané aDNA. Takzvané PCR inhibitory jsou častou příčinou domněnky, že se v analyzovaných kostech žádná aDNA nenachází. Typy inhibitorů se mohou měnit v závislosti na místě resp. podmínkách pohřebiště. Z půdy pocházející inhibitory mohou mít formu huminových, fulviových nebo tříslových kyselin (taninu) a iontů (Fe^{2+}). Jako inhibitor může působit kontaminace moderní DNA, formou kompetice s málo koncentrovanou aDNA. Značná část inhibice je následkem degradačních procesů a chemických modifikací v kostech. Typickými příklady jsou Maillardovy produkty nebo meziřetězcové a vnitřetězcové vazby (viz. kap. 2.2. Posmrtná degradace DNA) (Kalmár et al. 2000). U extrakcí aDNA z kostí se silně projevuje inhibice kolagenem a možná dalšími proteiny přítomnými v matrix (Scholz et al. 1997). Třetí skupinu inhibitorů tvoří reagenty používané při extrakci jako je NaCl, ionické detergenty (SDS), ethanol, isopropanol, fenol (Weyant et al. 1990) nebo silika partikule (Höss and Pääbo 1993). Inhibitory způsobí buď modifikace v templátové DNA, která je tak pro DNA polymerázu nerozeznatelná nebo přímo omezují aktivitu polymerázy, např. snížením koncentrace kofaktoru Mg^{2+} nebo přímou spoluúčastí v enzymatické reakci (huminové kyseliny) (Sutlović et al. 2005).

Inhibice PCR se může řešit na různých úrovních. Nutností je dokonalá dekontaminace kostí a správně zvolená extrakční metoda (viz. kap. 4. Principy extrakce). Pokud se inhibitory neodstraní při extrakci existují další možnosti navržené přímo pro PCR reakci. Standardní strategií je přidání kravského sérového albuminu (BSA) do reakční směsi PCR. BSA je

schopný navázat případné inhibitory (Comey et al. 1994). Pro amplifikaci je možné zvolit jinou polymerázu než standartně používané *AmpliTaq Gold®* a *TaqDNA*, které jsou k inhibici nejcitlivější (Al-Soud & Rådström 1998). V případě huminových kyselin se ukázalo jako účinné zvýšit množství *Taq* polymerázy o 1,25 U (Sutlović et al. 2005). Méně vhodné v případě aDNA extraktů je ředění vzorků, vzhledem k malým koncentracím nukleových kyselin. Přímo nevhodné je použití NaOH repurifikace, kvůli značným ztrátám DNA (Anđelinović et al. 2005).

6. Závěr

Kostní tkáň je díky svým vlastnostem ideální pro mnohaleté zachování genetické informace. To dokazuje řada publikací informujících o výsledcích analýz ancient DNA z historického materiálu. Závěry stále nových prací ukazují, že úspěch nezávisí vždy na absolutním stáří zkoumaných vzorků. Rozhodující vliv mají vnější vlivy prostředí, které buď zajistí perfektní zachování kostní tkáně a s ní i aDNA nebo jsou odpovědné za to, že i z relativně mladých kosterních ostatků analyzovatelnou aDNA nelze získat. Spolu s rozpadem okolní matrix jsou chemicky degradovány i nukleové kyseliny. Při molekulárních analýzách se to projeví např. možností amplifikace jen krátkých úseků, z důvodu modifikace bází sekvenčními chybami nebo efektem jumping PCR. Některé typy poškození brání PCR amplifikaci, i když je aDNA přítomná a v relativně dobrém stavu. Změny v barvě a hlavně struktuře kostní tkáně nebo informace o historii uchování kostních vzorků mohou být určitým vodítkem pro odhad, v jakém stavu a množství se aDNA nachází a jak s takovým materiálem zacházet.

Hlavním účelem mé práce bylo vytvořit souhrn dostupných informací potřebných pro práci molekulárních biologů s historickými kosterními pozůstatky a s aDNA v nich obsažené. Takové studie vždy vyžadují komplexní přístup. Používané metody musí být schopné izolovat málo koncentrovanou a nekvalitní aDNA a odstranit co nejvíce inhibitorů PCR, které by znemožnily analýzu získané genetické informace. Zároveň musí být navrženy tak, aby se minimalizovalo vysoké riziko kontaminace moderní DNA. Při vývoji nových technik je patrná snaha o snížení počtu kroků a zároveň jejich zdokonalení. Pro širší využití aDNA se vyvíjejí stále nové komerčně připravené kity pro celý postup izolace. Specializované laboratoře mají častěji více než jednu zavedenou techniku a komerční kolonky nebo sety jsou používány hlavně pro účely dokonalé purifikace. Vzájemné srovnání dnes používaných metodik je spíše otázkou praktického vyzkoušení na konkrétních kosterních vzorcích. V publikovaných pracích jsou spíše upřednostňovány extrakce pomocí silika a to buď formou kolonek nebo volných mikroparticulí. Vhodnými technikami pro historické pozůstatky se mohou ukázat i postupy používané na relativně mladém kosterním materiálu.

Na závěr bych ráda zdůraznila, že archeologický materiál je většinou velmi vzácný a proto by použití poměrně destruktivních metod molekulárních studií měla předcházet dokonalá příprava a praktické zkoušky, nejlépe na zvířecích ostatcích.

Seznam použité literatury:

- Anđelinović Š., Sutlović D., Ivkošić I.E., Škaro V., Ivkošić A., Paić F., Režić B., Definic-Gojanović M., Primorac D.:** Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat. Med. J.* 46, 530-9 (2005).
- Anderung C., Bouwman A., Persson P., Carretero J.M., Ortega A.I., Elburg E., Smith C., Arsuaga J.L., Ellegren H., Götherström A.:** Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated by genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle. *PNAS* (102) 24, 8431-35 (2005).
- Alonso A., Anđelinović Š., Martín P., Sutlović D., Erceg I., Huffine E., Fernández de Simon L., Albarrán C., Definis-Gojanović M., Fernández-Rodríguez A., García P., Drmić I. et al.:** DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat. Med. J.* 42, 260-66 (2001).
- Al-Soud W.A., Rådström P.:** Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *J. Clin. Microbiol.* (64) 10, 3748-53 (1998).
- Bell L. S., Skinner M. F., Jones S. J.:** The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci Int.* 82, 129-40 (1996).
- Binladen J., Wiuf C., Gilbert M.T., Bunce M., Barnett R., Larson G., Greenwood A.D., Haile J., Ho S.Y., Hansen A.J.:** Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics* 172, 733-41 (2006).
- Bouwman, A. S. & Brown, T. A.:** Comparison between silica-based methods for the extraction of DNA from human bones from 18th to mid-19th century London. *Ancient biomol.* 4, 173-8 (2003).
- Cattaneo C., Smillie D.M., Gelsthorpe K., Piccinini A., Gelsthorpe A.R., Sokol R.J.:** A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *J. Forensic Sci.* 74, 167-74 (1995).
- Collins M. J., Nielsen-Marsh C. M., Hiller J., Smith C. I., Roberts J. P., Prigodich R. V., Wess T. J., Csapò J., Millard A., and Turner-Walker G.:** The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44, 383-94 (2002).
- Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B.:** DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 39, 1254-69 (1994).

- Cooper A.:** Ancient DNA: how do you really know when you have it? *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1001-2 (1997).
- Cooper A. & Poinar H.N.:** Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 18, 289 (2000).
- Davoren J., Vaněk D., Konjhodzić R., Crews J., Huffine E., Parsons T.J.:** Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat. Med. J.* 48, 478-85 (2007).
- Geigl, E.-M.:** On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* 44, 337–342 (2002).
- Gilbert M. T. P., Hansen A. J., Willerslev E., Rudbeck L., Barnes I., Lynnerup N., Cooper A.:** Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 48-61 (2003).
- Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., and Lidén, K.:** Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44, 395–404 (2002).
- Hagelberg E. and Clegg J.B.:** Isolation and characterization of DNA from archeological bone. *Proc. R. Soc. Lond. B* 244, 45-50 (1991).
- Hagelberg, E., Sykes, B., and Hedges, R.:** Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342, 485 (1989).
- Handt O., Höss M., Konga M., Pääbo S.:** Ancient DNA: methodological challenges. *CMLS* 50, 524-9 (1994).
- Handt O., Krings M., Ward R.H., Pääbo S.:** The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 376-86 (1996).
- Hänni C., Brousseau T., Laudet V., Stehelin D.:** Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acid Res.* 23 (5), 881-2 (1995).
- Hedges R. E. M.:** Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44, 319–28 (2002).
- Hedges R. E. M. and Millard A. R.:** Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *J. Archaeol. Sci.* 22, 155–64 (1995).
- Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., von Haeseler A., Pääbo S.:** DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 4693–9 (2001).
- Höss M., Jaruga P., Zastawny T., Dizdaroğlu M., Pääbo S.:** DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissue. *Nucleic Acids Res.* 24, 1304–7 (1996).
- Höss M., Pääbo S.:** DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21, 3913-4 (1993).

- Child A. M.:** Towards an understanding of the decomposition of bone in the archaeological environment. *J. Archaeol. Sci.* 22, 165–74 (1995).
- Junqueira C.L., Carneiro J., Kelley R.O.:** *Základy histologie* (7. vyd.), kap. 8, str. 133-140. H+H, Jinočany 1997.
- Kalmár T., Bachrati C.Z., Marcsik A., Raskó I.:** A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 28, e67 (2000).
- Kemp B.M. & Smith D.G.:** Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci. Int.* 154, 53-61 (2005).
- Kim K., Kim K.Y., Jeon E., Togloom A., Cho Y.O., Lee M.S., Lkhagvasuren G., Choi J.H., Tumen D., Park A.J., Kim J.H., Noh M., Yoo K.J., Lee K.H.:** Technical note: Improved ancient DNA purification for PCR using ion-exchange columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 136, 114-21 (2008).
- Kolman C.J. & Tuross N.:** Ancient DNA analysis of human populations. *Am. J. Phys. Anthropol.* 111, 5-23 (2000).
- Kleter G. A., Damen J. J. M., Everts V., Niehof J., Tencate J. M.:** The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. *J. Dent. Res.* 73, 1523–9 (1994).
- Krane, S.:** Degradation of collagen in connective tissue diseases. Rheumatoid arthritis. V knize: *Dynamics of connective tissue macromolecules* (Burleigh P.M.C, A. R. Poole A.R., ed.), str. 309–26. North Holland, Amsterdam 1975.
- Lindahl T.:** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–15 (1993).
- Loreille O., Diegoli T.M., Irwin J.A., Coble M.D., Pardone T.J.:** High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 1, 191-5 (2007).
- Malmström H., Storå J., Dalén L., Holmlund G., Götherström A.:** Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Mol. Biol. Evol.* 10 (22), 2040-47 (2005).
- Malmström H., Svensson E.M., Gilbert M.T.P., Willerslev E., Götherström A., Holmlund G.:** More on contamination: The use of asymmetric molecular behavior to identify authentic ancient human DNA. *Mol. Biol. Evol.* 24 (4), 998-1004 (2007).
- Pääbo S., Irwin D.M., Wilson A.C.:** DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J. Biol. Chem.* 265, 4718-21 (1990).

- Pääbo S., Hendrik P., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.:** Genetic analyses from ancient DNA (review). *Annu. Rev. Genet.* 38, 645-79 (2004).
- Palo J.U., Hedman M., Söderholm, Sajantila A.:** Repatriation and identification of Finnish World War II Soldiers. *Croat. Med. J.* 48, 528-35 (2007).
- Parr R.L., Carlyle S.W., O'Rourke D.:** Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake wetlands. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99, 507-18 (1996).
- Poinar, H. N., and Stankiewicz, B. A.:** Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8426–31 (1999).
- Poinar H. N., Hoss M., Bada J. L., and Pääbo S.:** Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272, 864–9 (1996).
- Promega:** Tissue and hair extraction kit (for use with DNA IQ™) protocol (on-line). 2006 (cit. 2008-04-06).
Dostupné na: <http://www.promega.com/applications/hmnid/productprofiles/tissuehairkit/>
- Promega:** Genetic Identity: Bone Extraction Protocol to be Used With DNA IQ™ System (on-line). 2005 (cit. 2008-04-06). Dostupné na:
<http://www.promega.com/techserv/apps/hmnid/referenceinformation/BoneProtocol.htm>.
- Pruvost M., Schwarz R., Correia V.B., Champlot S., Braguier S., Morel N., Fernandez-Jalvo Y., Grange T., Geigl E.M.:** Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *PNAS* 104 (3), 739-44 (2007).
- Qiagen:** Generation™ capture card handbook (on-line). 2007 (cit. 2008-04-06). Dostupné na:
<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000254>
- Richards M.B. and Sykes B.C.:** Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *J. Archeol. Sci.* 22, 291-9 (1995).
- Rohland N. and Hofreiter M.:** Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Biotechniques* 42, 343–52 (2007).
- Salamon M., Tuross N., Arensburg B., Weiner S.:** Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13783-8 (2005).
- Sambrook J., Russell D.W.:** *Molecular cloning: a laboratory manual* (3. vyd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2001.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.:** *Molecular cloning: a laboratory manual* (2. vyd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.

- Serre D., Langaney A., Chech M., Teschler-Nicola M., Paunovic M., Mennecier P., Hofreiter M., Possnert G., Pääbo S.:** No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans. *PLoS Biol.* 2, 313-7 (2004a).
- Schmidt T., Hummel S., Hermann B.:** Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82, 423-31 (1995).
- Scholz M., Giddings I., Pusch C.M.:** A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal. Biochem.* 259, 283-6 (1997).
- Smith C. I., Chamberlain A. T., Riley M. S., Cooper A., Stringer C. B., and Collins M. J.:** Not just old, but old and cold. *Nature* 410, 771-2 (2001).
- Sutlović D., Gojanović M.D., Anđelinović Š., Gugić D., Primorac D.:** Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat. Med. J.* 46 (4), 556-62 (2005).
- Toledano T., Quarino L., Leung S., Buffolino P., Baum H., Shaler R.C.:** An assessment of DNA contamination risks in New York city medical examiner facilities. *J. Forensic Sci.* 42, 721-4 (1997).
- Weiner, S. & Price, P.:** Disaggregation of bone into crystals. *Calcif. Tissue Int.* 39, 365-75 (1986).
- Weyant R.S., Edmonds P., Swaminathan B.:** Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques* 9 (3), 308-9 (1990).
- Willerslev E. and Cooper A.:** Ancient DNA (Review Paper). *Proc. R. Soc. B* 272, 3-16 (2005).
- Wilson L. & Pollard M.:** Here today, gone tomorrow? Integrated experimentation and geochemical modeling in studies of archeological diagenetic change. *Acc. Chem. Res.* 35, 644-51 (2002).
- Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S., Dudar J.Ch., Saunders S.R.:** Technical note: Improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am. J. Phys. Anthropol.* 105, 539-543 (1998).
- Yang H., Golenberg E.M, Shoshani J.:** Proboscidean DNA from museum and fossil specimens: an assessment of ancient DNA extraction and amplification techniques. *Biochem. Genet.*, 35, 5-6 (1997).
- Ye J., Ji A., Parra E.J., Zheng X., Jiang Ch., Zhao X., Hu L., Tu Z.:** A simple and efficient method for extracting DNA from old and burned bone. *J. Forensic Sci.* 49 (4), 1-6 (2004).