



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

Ian Marques Cândido

---

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE  
EXTRAÇÃO DE DNA EM OSSO HUMANO  
POR PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E COLUNA  
DE SÍLICA**

---

Dissertação de Mestrado

Goiânia  
2013

Ian Marques Cândido

---

**COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE  
EXTRAÇÃO DE DNA EM OSSO HUMANO POR  
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E COLUNA DE  
SÍLICA**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rejane da Silva Sena Barcelos

Goiânia  
2013

Cândido, Ian Marques.

C217c Comparação entre as técnicas de extração de DNA em osso humano por partículas magnéticas e coluna de sílica [manuscrito] / Ian Marques Cândido. – 2013.

70 f. : il. ; graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Genética, 2013.

**“Orientadora: Profa. Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos”.**

1. Genética legal. 2. DNA – Extração. 3. Ossos – DNA. I.  
Título.

CDU: 340.6(043)

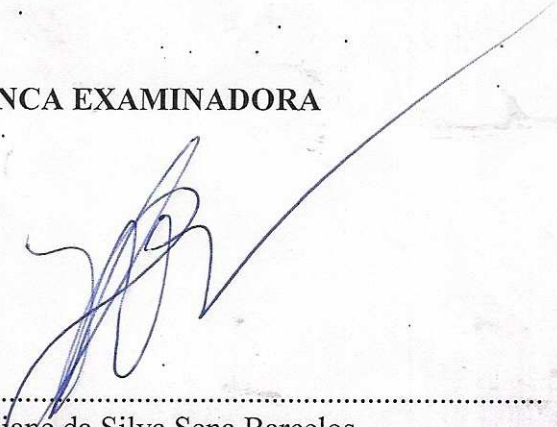
ATA COMPLEMENTAR Nº 70/2012

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

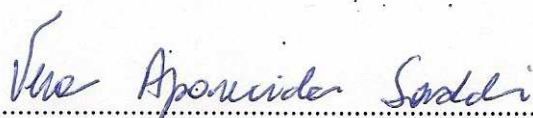
DISCENTE: IAN MARQUES CÂNDIDO

DEFENDIDA EM 08 DE FEVEREIRO DE 2013 E aprovado COM CONCEITO..... **A**

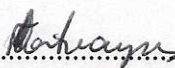
BANCA EXAMINADORA



Dr.ª Rejane da Silva Sena Barcelos  
(presidente-orientadora)



Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás  
(membro interno)



Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG  
(membro externo)

Ian Marques Cândido

---

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA  
EM OSSO HUMANO POR PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E  
COLUNA DE SÍLICA

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Mestrado em Genética da  
Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
como requisito parcial para obtenção do  
Título de Mestre em Genética.

Profª Drª. Rejane da Silva Sena Barcelos  
Orientadora  
Mestrado em Genética-PUC-GO

ProfªDrª.Vera Aparecida Saddi  
Membro da Banca  
Mestrado em Genética-PUC-GO

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres  
Membro da Banca  
Universidade Estadual de Goiás

Goiânia  
2013

***Dedico este trabalho...***

*A todos os meus familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, pelo apoio incondicional e por tornarem possível a realização desse sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, fé e bênçãos que tem me proporcionado durante todas as minhas lutas.

À minha esposa Tatiane N. R. Marques pelo incentivo, companheirismo, paciência, e por dividir comigo todo sacrifício e alegrias proporcionados em todos momentos de luta da minha vida.

Ao meu filho Henri N. Marques por proporcionar momentos de alegria e descontração neste período de tanta dedicação e pela paciência em dividir seu parceiro com o Mestrado.

Aos meus pais, Jesus M. da Silva e Marize C. Marques pelo apoio, incentivo e exemplo de perseverança que sempre me deram durante minha trajetória acadêmica.

Às peritas criminais do Laboratório de Biologia e DNA Forense da Polícia Científica de Goiás Neide, Mariana e Laryssa e aos peritos criminais da Seção de Antropologia e Odontologia Legal da Polícia Científica de Goiás Rhonan e Solon pelo apoio técnico, opiniões e correções do trabalho científico.

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Rejane da Silva Sena Barcelos pela orientação no trabalho e pelo apoio técnico e incentivo ao trabalho como Superintendente da Polícia Técnico-Científica de Goiás.

A toda equipe de auxiliares e administrativos do Laboratório de Biologia e DNA da Polícia Científica de Goiás pela colaboração e compreensão para que eu desenvolvesse esse projeto nestas instalações.

Aos professores e colegas do Programa de Mestrado em Genética pelas trocas de informações, conhecimentos e experiências no decorrer do curso.

Aos funcionários do Programa de Mestrado em Genética, em especial ao Renato, por todo o suporte e ajuda prestada durante o curso.

À PUC-GO pela estrutura e pelas condições propiciadas aos projetos.

## RESUMO

A identificação humana de restos mortais em avançado estado de decomposição, carbonizados, desastres em massa e esqueletizados pode ser realizada pela Genética Forense e, na maioria das vezes, ossos e dentes são as únicas fontes de DNA viáveis para análise. Dessa maneira, considerando o grande número de ossos utilizados na identificação humana e a necessidade de padronização da técnica de extração de DNA nesse tipo de amostra, o objetivo do presente trabalho é comparar duas técnicas de extração de DNA, com possibilidade de automação. A análise foi realizada em vinte e cinco ossos humanos avaliando a quantidade do material genético extraído, os perfis genéticos obtidos em cada amostra e o tempo de análise gasto pela metodologia de extração. Com a metodologia de extração por partículas magnéticas utilizando plataforma automatizada, o tempo de análise foi de 3 horas para processar 12 amostras, enquanto que por coluna de sílica 4 amostras em 27 horas. Partícula magnética recuperou uma maior quantidade de DNA em 88% das amostras. 68% das amostras extraídas por partículas magnéticas tiveram uma amplificação parcial alta (9/16 loci) e por coluna de sílica apenas 36%. Por conseguinte, a metodologia de extração por partículas magnéticas é apropriada para a automatização dos processos de extração.

**Palavras-chave:** Genética Forense, extração de DNA, osso, automação, STR



## **ABSTRACT**

*The identification of human remains in decomposition, charred, skeletal remains and mass disasters can be performed by Forensic Genetics and, in most cases, bones and teeth are the only viable source for DNA typing .Thus, considering the large number of bones used in human identification and the need for standardization of DNA extraction in this kind of sample, the aim of this study is to compare two techniques of DNA extraction, with the possibility of automation. The analysis was performed on twenty five human bones evaluating the quantity of the extracted genetic material, genetic profiles obtained for each sample and the time analysis by method used. With magnetic bead in platform automated, analysis time was 3 hours to process 12 samples, whereas by silica column four samples in 27 hours. Magnetic bead recovered a larger amount of DNA in 88% of samples. 68% of the samples magnetic particle had a high amplification partial (9/16 loci) and silica column only 36%. Therefore, the method used magnetic bead is suitable for automating the extraction processes.*

*Keywords: Forensic Genetics, DNA extraction, bone, automation, STR*

---

## SUMÁRIO

---

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Identificação Humana	12
1.2 Extração de DNA em Amostras Forenses	13
1.3 Análise de Osso na Genética Forense	14
1.4 Métodos de Extração de DNA em Osso Humano	16
1.3.1 Fenol-clorofórmio	16
1.3.2 Coluna de Sílica	17
1.3.3 Partículas magnéticas	18
1.5 Automação da Extração de DNA	19
1.6 Quantificação do DNA Extraído	19
1.7 Novos Marcadores Moleculares para Amplificação do DNA	21
1.8 Inibição de PCR	22
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Amostragem	25
3.2 Pré-tratamento	25
3.3 Métodos de Extração	25
3.4 Quantificação	25
3.5 Amplificação	26
3.6 Eletroforese	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
8 ANEXOS	47
8.1 Artigo a ser submetido à Forensic Science International: Genetics	47
8.2 Protocolo de Extração do kit QIAamp®DNA Investigator-Quiagen	62
8.3 Protocolo de Extração do kit Prepfiler®BTA®-Applied Biosystems	65

---

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

---

Tabela 1 Comparação da quantificação por PCR em tempo real e análise do perfil STR de dois métodos de extração em 25 ossos humanos	28
Tabela 2 Resultados do perfil STR do DNA extraído de ossos humanos usando partículas magnéticas ou coluna de sílica	29
Figura 1 Eletroferograma da amostra de osso identificada como LD 127-11 extraída por partícula magnética	30
Figura 2 Eletroferograma da amostra de osso identificada como LD 127-11 extraída por coluna de sílica	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

BTA	Do inglês <i>Bone, Tape, Adesive</i>
DNA	Do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DNAmt	DNA mitocondrial
DVI	Do inglês <i>Disasters Victim Identification</i>
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ICMP	Do inglês <i>International Comimtion on Missing People</i>
IN/DEL	Do inglês <i>Insertion/deletion</i>
IPC	Do inglês <i>Internal Positive Control</i>
LD	Registro Interno do Laboratório de DNA
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pg/μL	Picogramas por microlitro
SNP	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STR	Do inglês <i>Short Tandem Reapets</i>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Identidade é o conjunto de sinais, propriedades e características que individualizam uma pessoa, enquanto que identificação corresponde aos diversos processos, métodos e sistemas para reconhecer uma pessoa viva ou morta ou ainda os restos cadavéricos, bem como os atos mediante os quais se podem determinar ou estabelecer a identidade de alguém (Figini *et al.*, 2003).

A Interpol (Polícia Internacional) é a organização internacional que coordena a cooperação entre as polícias de diversos países. Em seu guia para identificação de vítimas de desastre os métodos de identificação humana são classificados em primários e secundários. Datiloscopia, odontologia legal e o exame de DNA são considerados métodos primários para identificação, enquanto que as descrições pessoais, os achados médicos (sexo, altura, idade etc.) e as evidências coletadas no local de crime (aliança, roupas etc.) são consideradas métodos secundários. Segundo a Interpol, os métodos secundários isolados não identificam o cadáver e são considerados como triagem em um processo de identificação humana (Interpol, 2012).

A datiloscopia é definida por Juan Vucetich como *“a ciência que se propõe a identificar as pessoas fisicamente consideradas, por meio das impressões ou reproduções físicas dos desenhos formados pelas cristas papilares das extremidades digitais”*. O método baseia-se na existência e disposição das cristas papilares ou papilas dérmicas, que, na polpa dos dedos, se dispõem em fileiras regulares, separadas e limitadas entre si por sulcos, constituindo desenho característico, individual e que não se modificam por toda a vida. É considerado o método mais fácil e mais barato de identificação humana (Neumann *et al.*, 2012).

A Odontologia legal é uma ciência que busca as particularidades anatômicas normais e/ou patológicas, microscópicas e/ou macroscópicas dos dentes humanos, utilizando para comparação registros odontológicos, radiografias e fotografias (Berketa *et al.*, 2003).

Em 1985, Jeffreys *et al.* publicaram um trabalho na revista Nature sobre regiões hipervariáveis denominadas minissatélites, as quais conferiam aos indivíduos uma espécie de “impressão digital” do DNA. A partir destes trabalhos foi iniciada a fase molecular da identificação humana, popularizando no meio científico a Genética Forense, que por intermédio de comparação da amostra questionada do local de crime (material biológico do cadáver e outros vestígios) e de amostra referência de familiares em primeiro grau é possível verificar a probabilidade de vínculo genético entre as amostras.

## 1.2 EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS FORENSES

Uma amostra biológica obtida a partir de uma cena de crime, sob a forma de uma mancha de sangue ou um tecido (osso, dente etc.) contém inúmeras substâncias além de DNA. Por isso, métodos de extração foram desenvolvidos para separar as proteínas e outros materiais celulares das moléculas de DNA (Butler, 2012).

Idealmente, o processo de extração de DNA remove moléculas que reduzem ou inibem a polimerase na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Deve também produzir uma solução estável contendo DNA de alta qualidade que não irá degradar ao longo do tempo durante o armazenamento da amostra. Os objetivos do processo de extração de DNA são, tipicamente: (1) lizar as células para libertar as moléculas de DNA, (2) separar as moléculas de DNA de outros materiais celulares (solventes orgânicos), e (3) isolar o DNA, ou seja, purificação (Stray *et al.*, 2010).

Todas as amostras devem ser cuidadosamente manipuladas independentemente do método de extração de DNA para evitar a contaminação ou introdução de um DNA estranho. O processo de extração é provavelmente a etapa que a amostra de DNA é mais susceptível a contaminação no laboratório forense. Por esta razão, os laboratórios geralmente processam as evidências de local de crime (amostra questionada) em horários distintos e, por vezes, até mesmo locais diferentes da manipulação de amostra referência (Butler, 2012).

### 1.3 ANÁLISE DE OSSO HUMANO NA GENÉTICA FORENSE

Geralmente, em acidentes aéreos, catástrofes ambientais, pessoas desaparecidas, conflitos armados e outros desastres em massa, a identificação humana pela Papiloscopia, Antropologia e Odontologia Forense ficam prejudicadas pelo estado de conservação, dificultando-se a identificação por estes métodos. Nestes casos, a Genética Forense é a alternativa para identificação dos cadáveres ignorados em estado avançado de decomposição e de restos mortais, sendo que quase sempre ossos e dentes são as únicas e melhores amostras para a identificação genética (Davoren *et al.*, 2007; Murdoff *et al.*, 2009; Pajnic *et al.*, 2010). A justificativa para essa qualificação de melhor amostra se deve, em parte, devido matriz mineral do osso que oferece uma barreira física e química contra a deterioração ambiental e o ataque biológico, contribuindo para a conservação do material biológico (Loreille *et al.*, 2007). Esta preservação do DNA dos restos humanos é influenciada por complexas interações de processos tafonômicos como: condições do solo, exposição à umidade, fogo, radiações ultravioleta, microrganismos, fauna e flora (Mundorff *et al.*, 2009). Entretanto, com a melhoria nos processos de descontaminação e das técnicas laboratoriais, hoje é possível extrair e amplificar DNA até de ossos humanos antigos obtidos de sítios arqueológicos (Gilbert *et al.*, 2005; Kemp & Smith, 2005) ou submersas em água (Courts & Madea, 2011).

A escolha de qual osso utilizar para extração de DNA parece ter influência direta no sucesso do exame. Milos *et al.* (2007) analisaram geneticamente mais de vinte mil elementos ósseos no laboratório do *International Commission on Missing Persons* (ICMP). Nesse trabalho obtiveram maior sucesso na extração e amplificação do DNA quando utilizaram amostras de fêmur e dente. Estas amostras também já foram reportadas como preferenciais para extração de DNA em outros estudos, isto porque, os ossos de maior massa possuem a parte cortical, que é a utilizada no exame, mais espessa (Milos *et al.*, 2007; Westen *et al.*, 2008).

O osso humano é composto por cerca de 70% de minerais inorgânicos (fosfato de cálcio, carbonato e citrato de cálcio e outros) que conferem a consistência de tecido duro. Estas extensas áreas de mineralização representam uma barreira física para os reagentes de extração dificultando a recuperação do DNA (Lee *et al.*, 2010a). A pulverização do osso aumenta a superfície de contato dos reagentes com a amostra incrementando a quantidade de DNA extraído (Lee *et al.*, 2010b)

As principais dificuldades no sucesso do exame de DNA de osso em amostras forenses são: DNA degradado, presença de inibidores de PCR e elevada presença de DNA não-humano como fungos e bactérias (Milos *et al.*, 2007; Putkonen *et al.*, 2010). Diante disso, diversos autores têm discutido formas de ampliar a quantidade de DNA extraído e de eliminar inibidores obtendo um DNA de boa qualidade com novos protocolos de extração ou com combinação de métodos já existentes, o que implica em uma falta de consenso mundial sobre a melhor técnica de extração de ossos (Davoren *et al.*, 2007; Loreille *et al.*, 2007; Rohland & Hofreiter, 2007; Kitayama *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Seo *et al.*, 2010; Barbaro *et al.*, 2011; Pagan *et al.*, 2012).



## 1.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM OSSO HUMANO

### 1.4.1. Fenol-clorofórmio

Hochmeister *et al.* (1991) relataram pela primeira vez o uso de DNA extraído de fêmur para identificação humana. A metodologia de extração utilizada por estes autores foi baseada na descalcificação parcial, lise celular e fenol-clorofórmio e ficou conhecida como Extração Orgânica clássica. Depois disso, diversas pesquisas têm sido publicadas com pequenas alterações na técnica de extração tradicional com fenol-clorofórmio para tentar melhorar o seu desempenho (Del Valle *et al.*, 2004; Davoren *et al.*, 2007; Irwin *et al.*, 2007). No entanto, Rohland & Hofreiter (2007) afirmaram que muitos reagentes químicos rotineiramente adicionados à técnica de fenol-clorofórmio não incrementam a quantidade de DNA extraído.

Em 2007, Loreille *et al.* publicaram um protocolo de extração de DNA de osso humano com fenol-clorofórmio após desmineralização total com EDTA. Segundo os autores, em concentrações específicas, o EDTA provoca a total dissolução física do pó de osso e inativa a enzima DNase quelando íons cátions bivalentes, o que aumenta a quantidade de DNA recuperado. O principal problema das técnicas que utilizam fenol-clorofórmio é que extraem uma significativa quantidade de DNA, contudo não eliminam os inibidores de PCR. Para minimizar este problema, Jakubowska *et al.* (2012) compararam três metodologias que utilizam fenol-clorofórmio e sugerem que os melhores resultados associam a desmineralização total a uma técnica de purificação com membrana.

Apesar de que ainda é a metodologia padrão-ouro para extração de DNA, o reagente fenol-clorofórmio é comprovadamente tóxico e cancerígeno e a técnica tradicional utiliza uma quantidade muito grande de osso humano (cerca de 1-2 gramas), além disso, é uma metodologia bastante trabalhosa dificultando sua automação (Davoren *et al.*, 2007).

#### 1.4.2 Coluna de Sílica

Validado para amostras forenses pela primeira vez por Greenspoon *et al.* (1998), o método de extração por coluna de sílica se baseia na atração entre o DNA e a membrana de sílica devido à diferença de cargas elétricas. Na última década, outros pesquisadores propuseram modificações no protocolo extração de DNA com coluna de sílica e recomendam a sua utilização com bom rendimento em amostras de osso humano. As principais vantagens desta metodologia relatadas por estes autores são: não utilizar reagentes cancerígenos (como o fenol-clorofórmio) e o grau de pureza do DNA extraído (retirando inibidores de PCR) (Holland *et al.*, 2003; Marjanovic *et al.*, 2007; Milos *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2012).

O ICMP (*International Commission on Missing People*) é uma comissão internacional que tem como principal objetivo assegurar a cooperação dos governos para localizar e identificar as pessoas que desaparecem vítimas de violação de direitos humanos. Com mais de 21.000 amostras de ossos analisadas em seu laboratório, participaram na identificação de pessoas em diversos desastres em massa, tais como o Tsunami na Tailândia, Furacão Katrina nos Estados Unidos e outros conflitos armados no leste Europeu (Milos *et al.*, 2007). O protocolo de extração de DNA de ossos é baseado em modificações no kit de coluna de sílica (QIAGEN's Blood Maxi Kit) e, segundo os autores, com um alto índice de sucesso na identificação de mais de 11.600 indivíduos (Davoren *et al.*, 2007).

Todavia, os primeiros protocolos com coluna de sílica necessitavam de uma grande quantidade de material ósseo, grande volume de reagentes e todos os procedimentos eram realizados manualmente. Amory *et al.* (2012) propuseram um novo protocolo que requer uma quantidade menor de pó de osso, utiliza a desmineralização total na etapa de lise e os procedimentos de purificação são realizados com coluna de sílica em equipamento automatizado (QIAcube<sup>®</sup>).

Recentemente, Rucinsky *et al.* (2012) compararam o protocolo usado no ICMP com o método de fenol-clorofórmio utilizando 38 ossadas humanas e a conclusão deste estudo é que o método de coluna de sílica não produziu significativas diferenças na quantidade de DNA extraído nem no perfil genético de marcadores STR, contradizendo estudos anteriores (Davoren *et al.*, 2007; Milos *et al.*, 2007).

#### 1.4.3 Partículas magnéticas

Esta metodologia de extração de DNA se baseia na adição de partículas magnéticas à resina que se liga ao DNA em solução, e posteriormente, os complexos DNA-partículas magnéticas são capturados por um ímã. Após separação do complexo o DNA é eluído e as partículas magnéticas descartadas. Diversas empresas disponibilizam conjuntos de reagentes comerciais (kits) para extração de DNA que utilizam partículas magnéticas. Estes kits podem ser manipulados tanto de maneira manual quanto automatizada (Barbaro *et al.*, 2009; Pajnic *et al.*, 2010; Karija Vlahovic & Kubat 2012).

Os mais comuns kits comerciais para extração de DNA que utilizam partículas magnéticas são: Prepfiler<sup>®</sup>-Applied Biosystems, EZ1<sup>®</sup>-Qiagen e DNA-IQ<sup>®</sup>-Promega, todos validados para diversas amostras forenses, inclusive algumas consideradas desafiadoras como fio de cabelo e ossos (Hashiyada *et al.*, 2009; Almeida *et al.* 2011; Bowden *et al.*, 2011; Petersen & Kaplan, 2011).

Em 2009, Barbaro *et al.* desenvolveram e validaram o kit Prepfiler<sup>®</sup>-Applied Biosystems para amostras forenses. Em seguida, a dificuldade de se extrair DNA de amostras forenses mais complexas, fez com que fosse desenvolvido um tampão de lise específico para amostras de osso, fita e adesivo, que é o tampão BTA<sup>®</sup> (Barbaro *et al.*, 2011).

As principais vantagens do uso da extração por partículas magnéticas é o fato de não utilizar reagente tóxico (fenol-clorofórmio), possibilidade de automação e resistência a inibidores de PCR (Barbaro *et*

*al.*, 2009; Brevnov *et al.*, 2009; Stray *et al.*, 2009; Zimmermman *et al.* 2009; Balsa *et al.*, 2011; Wang & McCord, 2011).

### 1.5 AUTOMAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO DO DNA

A automação dos procedimentos de extração em Genética Forense compreende plataformas de pipetadores robotizados e podem ser classificadas como de média e alta capacidade (Davis *et al.*, 2012). As plataformas de média e alta capacidade manipulam de 12-16 amostras de uma só vez e existem as que utilizam kits de extração por partículas magnéticas e por coluna de sílica (Balsa *et al.*, 2011; Karija Vlahovic & Kubat, 2012; Phillips *et al.* 2012). Já as plataformas de alta capacidade chegam a manipular até 96 amostras de uma vez e podem ser acopladas em sua operação o preparo de placas para quantificação com PCR em tempo real, da placa de amplificação e eletroforese capilar (Jaffredo *et al.*, 2011; Stangegaard *et al.*, 2013).

Davis *et al.* (2012) compararam três plataformas de extração por partículas magnéticas, EZ1<sup>®</sup>, Maxwell<sup>®</sup> e Automate Express<sup>®</sup>. No estudo eles utilizaram diversos tipos de amostras forenses e sugeriram que não há diferenças significativas entre o desempenho das três marcas.

As vantagens da automação da extração são: (1) padronizar os procedimentos, (2) reduzir o tempo de análise manipulando diversas amostras de uma vez, (3) diminuir interferência humana, reduzindo possibilidade de contaminação e (4) economia com redução do volume de amostra e de reagentes (Butler *et al.*, 2012).

### 1.6 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Quando a evidência biológica a partir de uma cena de crime é processada para isolar o DNA presente, todas as fontes de DNA presentes nas amostras são extraídas. Assim, DNA não humano, tais como bactérias, fungos, material de planta ou outro animal, podem também estar presentes no DNA total recuperado, juntamente com o DNA humano de interesse. Para garantir que o DNA recuperado a partir de

uma extração é humano, em vez de uma outra fonte, tais como bactérias, é necessário uma quantificação humano específica (Niklas & Buel, 2003).

O propósito principal de quantificação do DNA no tratamento de casos forenses é determinar a quantidade adequada de molde de DNA de modo a evitar a concentração de DNA fora de escala e dados associados a artefatos em amplificação por PCR de *loci* STR. A reação de PCR multiplex com marcadores do tipo STR funciona melhor em uma estreita faixa de concentrações, normalmente entre 0,5-2,0 ng/ $\mu$ L de DNA humano para os kits comerciais com marcadores STR (Barbisin & Shewale, 2010).

Os métodos mais usados para quantificação do DNA em amostras forenses são: espectrofotometria (absorbância em luz ultra-violeta), eletroforese em gel com corante (geralmente brometo de etídio) e PCR em tempo real. As duas primeiras metodologias estão em desuso na área forense por ter baixa sensibilidade, consumindo grande quantidade do material forense que na maioria das vezes é exíguo e também por não ser tão específico e quantificar também DNA não-humano e outras moléculas como proteínas (Butler, 2012).

PCR em tempo real é o somatório da PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados, diminuindo o risco de contaminação da amostra e dando maior precisão aos resultados (Niklas & Buel, 2003)

Várias abordagens para realizar PCR em tempo real vem sendo publicadas. As mais comuns são: nuclease 5' fluorogênica conhecida como Taqman e o corante intercalante altamente específico pelo DNA fita dupla, SYBR Green (Krenke *et al.* 2008; Butler *et al.*, 2012).

O procedimento de quantificação do DNA, por PCR em tempo real, é uma ferramenta muito útil para o sucesso da amplificação do material

genético oriundo de amostras de osso. Com esta metodologia, é possível quantificar o DNA extraído, analisar a presença ou não de inibidores da reação de PCR com a avaliação do IPC (*Internal Positive Controls*) de cada amostra (Opel *et al.*, 2010; Putkonen *et al.*, 2010; Harder *et al.*, 2012).

Diversos kits comerciais para quantificação do DNA extraído foram desenvolvidos nos últimos anos como exemplo: Plexor HY<sup>®</sup>-Promega, Quantifiler DUO<sup>®</sup>-Applied Biosystems e Investigator Quantiplex<sup>®</sup>-Qiagen. A maioria dos equipamentos de PCR em tempo real utiliza os reagentes para quantificação exclusivos do fabricante. Contudo alguns aparelhos são abertos para qualquer kit de quantificação (Krenke *et al.* 2008; Barbisin *et al.* 2009; Pasquale *et al.* 2011).

## 1.7 NOVOS MARCADORES MOLECULARES PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O método de amplificação do DNA mais comum utilizado em laboratório forenses é o de PCR e a maioria dos casos são resolvidos com marcadores do tipo STRs por usar reação multiplex (geralmente 16 marcadores) e ter um alto poder de discriminação (Zietkiewicz *et al.*, 2012).

O uso de novos marcadores moleculares, principalmente os baseados em repetições curtas em tandem (STR) e suas variações (mini-STR), sequenciamento de DNA mitocondrial (DNAmt), marcadores IN/DEL (*Insertion/Deletion*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) de DNAmt permite o trabalho com amostras degradadas e com pouca quantidade de DNA. Estes marcadores aumentam a sensibilidade do exame, sendo assim uma nova perspectiva de uso nos laboratórios de Genética Forense para amostras de osso e outras amostras com pequena quantidade de DNA ou com DNA degradado (Parsons *et al.*, 2007; Francez *et al.*, 2011; Köhnemann & Pfeifer, 2011; Harder *et al.*, 2012; Romanini *et al.*, 2012).

## 1.8 INIBIÇÃO DE PCR

A amplificação do DNA por PCR pode ser afetada por diversas substâncias denominadas genericamente como inibidores de PCR. Estes inibidores podem estar presentes nas amostras biológicas coletadas em local de crime e serem co-extraídas com o DNA de interesse (Kontanis & Reed, 2006; Hedman & Radström, 2013).

Os inibidores de PCR podem: (1) interferir na lise celular da extração do DNA, (2) degradar ou capturar o ácido nucleico de interesse, (3) inibir a atividade da polimerase responsável pela amplificação enzimática do DNA alvo (Wilson, 1997).

O ácido húmico presente no solo, colágeno e cálcio são inibidores de PCR frequentes em amostras de osso humano e com a metodologia de PCR em tempo real é possível verificar a presença destas substâncias possibilitando a otimização de reações de amplificação com marcadores moleculares do tipo STRs (Funes-Huacca *et al.*, 2011). O próprio EDTA presente na solução de lise e desmineralização de diversos protocolos de extração de osso pode complexar com os íons magnésio, que são cofatores da reação de PCR, e resultar na inibição da amplificação (Loreille *et al.*, 2007).

Como estratégias para minimizar ou neutralizar os efeitos da presença de inibidores de PCR em amostras forenses pode-se inferir: (1) diluição da DNA extraído com conseqüente diluição dos inibidores presentes (2) aumentar a quantidade de DNA polimerase (3) utilizar métodos de purificação do DNA que possam eliminar estas substâncias. O uso de membranas filtradoras ou concentradoras (Microcon<sup>®</sup>-100, Amicon<sup>®</sup>-100 ou Centricon<sup>®</sup>-100) separam o DNA alvo de substâncias inibidoras de PCR. Os métodos de extração de DNA de fase sólida, como coluna de sílica e partículas magnéticas, foram validados para extrair um DNA mais puro, ou seja, livre de inibidores de PCR se comparados aos

métodos orgânicos tradicionais (Davoren *et al.*, 2007; Barbaro *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2009).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar qualitativamente e quantitativamente dois métodos automatizáveis para a extração de DNA em amostras de osso, visando identificação humana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Extrair o DNA em amostras de osso humano utilizando duas metodologias: partículas magnéticas com o kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems) e coluna de sílica com o kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator-Qiagen;

b) Determinar a quantidade de DNA extraído, pela técnica de extração com coluna de sílica e partículas magnéticas, utilizando a metodologia de PCR em tempo real;

c) Obter os perfis genéticos de marcadores moleculares do tipo STR autossômico dos produtos da extração do kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup> (Applied Biosystems) e do kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator (Qiagen);

d) Comparar as duas técnicas utilizadas, avaliando a quantidade absoluta de DNA extraído em cada amostra e qual a que obtêm um maior percentual de perfis genéticos completos de STR autossômico;

e) Comparar o número de amostras manipuladas de uma vez e o tempo gasto nos procedimentos de extração de cada metodologia.

f) Verificar a presença de inibidores de PCR no produto extraído para avaliar o grau de pureza do DNA recuperado;

g) Avaliar as vantagens e desvantagens de se utilizar extração de DNA automatizada;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

Foram selecionados randomicamente no Laboratório de Biologia e DNA Forense da Polícia Científica do Estado de Goiás-Brasil vinte e cinco (25) casos de identificação humana que possuem fêmur como amostra questionada, independente da idade ou sexo do desaparecido, do tempo de desaparecimento e das condições de conservação que se encontrava o material. Estas amostras foram registradas no Laboratório entre os anos de 2006 e 2011.

#### 3.2 PRÉ-TRATAMENTO

Todas as amostras de osso passaram pelas mesmas etapas de pré-tratamento. Após lixar a superfície externa e interna do osso utilizando microrretífica (Dremel<sup>®</sup>), foi obtido por corte um fragmento ósseo com massa próxima de três gramas, que foi posteriormente congelado em freezer -80°C/24horas e triturado em moinho mineralógico (Ika<sup>®</sup>).

#### 3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Vinte e cinco alíquotas de 100mg do osso pulverizado tiveram o DNA extraído por dois métodos diferentes:

- Partículas magnéticas com o kit Prepfiler<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems utilizando a plataforma de automação Automate Express<sup>®</sup> (Applied Biosystems);
- Coluna de sílica utilizando o kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator- Quiagen, com a manipulação manual das amostras.

Os procedimentos de ambas as metodologias foram realizados sem adaptações conforme protocolos dos kits de extração (Anexos 2 e 3).

#### 3.4 QUANTIFICAÇÃO

Todos os produtos da extração de DNA foram quantificados por PCR em tempo real, utilizando o kit Plexor HY<sup>®</sup> (Promega, 2012) e o

termociclador IQ5<sup>®</sup> Biorad. A presença de inibidores da reação de PCR foi avaliada utilizando o Internal PCR Control (IPC) do kit Plexor HY<sup>®</sup> (Promega, 2012).

### 3.5 AMPLIFICAÇÃO

Após a normalização do DNA na concentração recomendada pelo fabricante, as amostras foram amplificadas por PCR utilizando o kit multiplex comercial Identifiler Plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems, 2011a) que utiliza 16 marcadores moleculares do tipo STR simultaneamente com volume total da reação de 25 µL. As amostras em que não se obteve perfis genéticos completos foram concentradas em centrífuga à vácuo, ressuspensas e uma nova tentativa de amplificação foi procedida para cada amostra utilizando os kits Minifiler<sup>®</sup> e/ou NGM<sup>®</sup> (Applied Biosystems, 2011b,c). Estes kits de amplificação são mini-STR formando amplicons com número menores de pares de base e aumentam a possibilidade de amplificação em amostras degradadas.

Todas as amplificações do DNA foram realizadas no termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700-Applied Biosystems. A quantidade de ciclos, tempo de incubação e quantidade dos reagentes seguiram a orientação do fabricante do kit de amplificação.

### 3.6 ELETROFORESE

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese capilar no equipamento ABI<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyser-Applied Biosystems, utilizando polímero POP 4<sup>®</sup> Applied Biosystems e software de coleta de dados Genemapper Datacollection<sup>®</sup> Applied Biosystems.

## 4 RESULTADOS

O tempo de processamento dos procedimentos de extração de cada uma das metodologias foi comparada desde o início da incubação do tampão de lise até o DNA extraído ser ressuspenso. O kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems, que foi utilizado com automação, teve um tempo de aproximadamente três horas para analisar 12 amostras e com o kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator-Quiagen, que foi realizado de maneira manual, foi de aproximadamente 27 horas para analisar quatro amostras.

A quantidade de DNA recuperado pelas duas metodologias de extração pode ser evidenciada na Tabela 1. Em 88% (22/25) das amostras testadas foi obtida uma quantificação de DNA (pg/ $\mu$ L) maior pela técnica de partículas magnéticas que de coluna de sílica, sendo possível obter até quatro vezes mais a quantidade de DNA. A média da concentração de DNA extraído por partículas magnéticas (53,6 pg/ $\mu$ L) foi quase o triplo em relação ao de coluna de sílica (18,7 pg/ $\mu$ L).

Na avaliação da presença de inibidores de PCR no produto extraído não foi encontrado, em nenhuma das amostras extraídas pelas duas metodologias, um valor de IPC acima do esperado.

Nas amostras amplificadas pelo método de partículas magnéticas o número de *loci* variou de cinco a dezesseis (perfil completo) sendo que no método de coluna de sílica essa variação foi de um a dezesseis (Tabela 1).

A quantidade de *loci* amplificados utilizando partículas magnéticas foi igual ou superior às que foram extraídas por coluna de sílica em todas as amostras, exceto a de registro LD 135/09 e LD 12/08.

Tabela 1

Comparação da quantificação por PCR em tempo real e análise do perfil de 16 loci STR de dois métodos de extração em 25 ossos humanos

Sample	Partículas magnéticas		Coluna de sílica	
	pg/ $\mu$ L	<i>Loci</i> amplificados	pg/ $\mu$ L	<i>Loci</i> amplificados
LD 02-07	8,76	9	5,78	9
LD 07-07	3	8	1,03	2
LD 67-07	50	16	12,7	16
LD 03-08	1,48	11	7,1	4
LD 12-08	7,72	0	1,49	2
LD 102-08	24,8	16	6,81	5
LD 121-08	17,5	16	5,53	1
LD 22-09	122	16	38,8	16
LD 34-09	874	16	263	16
LD 54-09	1,91	0	0	0
LD 61-09	10,8	15	7,51	2
LD 135-09	21,2	5	9,59	11
LD 02-10	68,2	16	18	13
LD 36-10	6,98	13	3,13	4
LD 67-10	11,9	8	4,05	0
LD 68-10	7,83	13	2,4	9
LD 84-10	3,03	0	1,16	0
LD 119-10	17,3	16	13,2	16
LD 122-10	51,9	16	49,9	16
LD 62-11	4,64	0	2,6	0
LD 65-11	2,67	9	1,89	0
LD 77-11	1,16	0	2,47	0
LD 127-11	9,07	16	2,39	0
LD 151-11	8,08	16	3,54	4
LD 307-11	5,04	9	5,35	2

Como pode ser evidenciado na Tabela 2, dez amostras (40%) apresentaram perfis genéticos completos (16 *loci* amplificados) e foram extraídas com o kit Prepfiler®BTA®-Applied Biosystems enquanto que com o kit QIAamp®DNA Investigator-Quiagen foram obtidos apenas cinco amostras (5%) com perfis completos. Foram observadas amostras com nove ou mais *loci* amplificados em 68% (17/25) dos casos das extrações que utilizaram o método de partículas magnéticas, enquanto que com coluna de sílica o índice foi de 36% (9/25). Os resultados de ampliações acima de nove *loci* aumentam a probabilidade de identificação genética da amostra analisada.

Tabela 2

Resultados do perfil STR do DNA extraído de ossos humanos usando partículas magnéticas ou coluna de sílica

Perfil Genético	Partículas magnéticas		Coluna de sílica	
	Nº	%	Nº	%
Completo (16 loci)	10	40	5	20
Parcial Alto (9-15 loci)	7	28	4	16
Parcial Baixo (1-9 loci)	3	12	9	36
Sem resultados (0 locus)	5	20	7	28
Total	25	100	25	100

Em dois casos (LD 127/11 e LD 121/08) o número de *locus* amplificado pela técnica de coluna de sílica foi extremamente baixo (0 e 1 respectivamente) enquanto que por partículas magnéticas, em ambas as amostras citadas o resultado foi de perfil completo (16 *loci* amplificados).

A quantidade de *loci* de marcadores moleculares do tipo STR amplificados das amostras extraídas por partículas magnéticas foi maior em quase todas as amostras analisadas. No osso registrado com LD 127-11, o kit Prepfiler®BTA®-Applied recuperou uma pequena quantidade de

DNA (9,07 pg/ $\mu$ L), mas produziu um perfil genético completo, ou seja, com a identificação dos alelos nos dezesseis marcadores moleculares analisados (Figura 01). Na extração por coluna de sílica da mesma amostra não foi obtida a amplificação de nenhum *locus* (Figura 02).

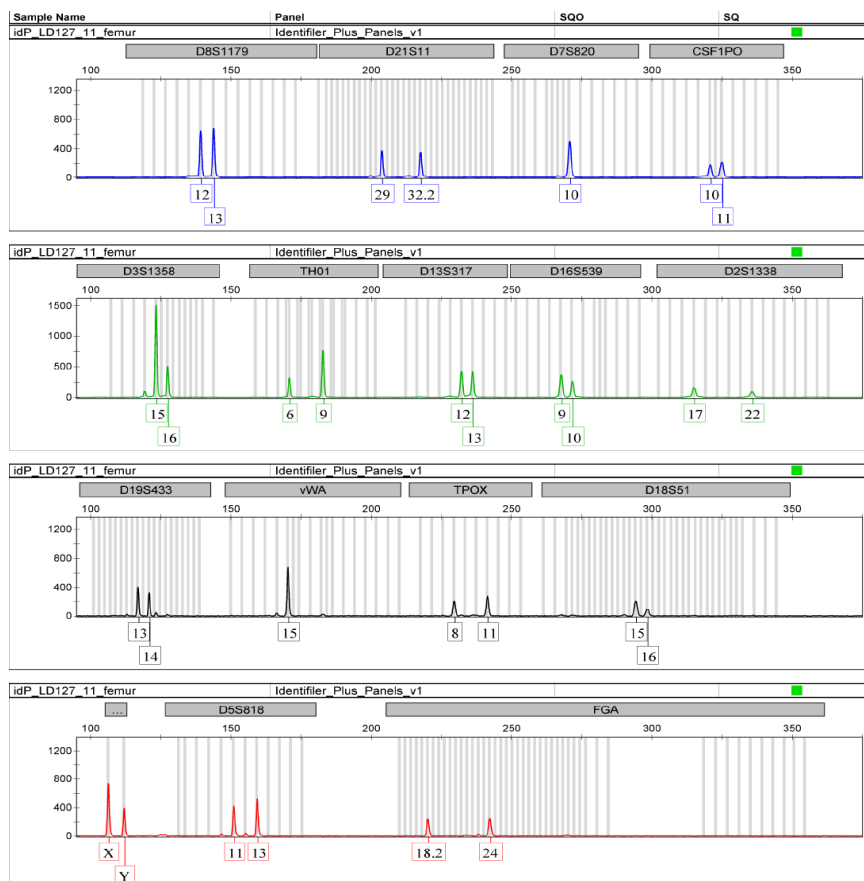


Figura 01. Eletroferograma da amostra de osso identificada como LD 127-11 extraída por partícula magnética

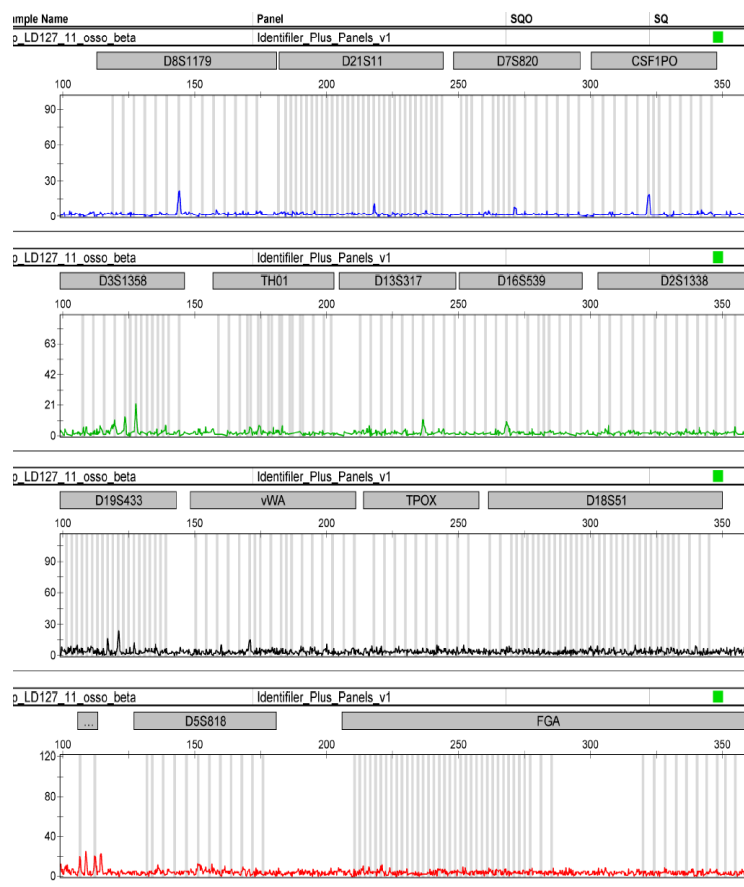


Figura 02. Eletroferograma da amostra de osso identificada como LD 127-11 extraída por coluna de sílica



## 5 DISCUSSÃO

Vários autores recomendam a utilização de kits de extração, por não utilizar reagentes carcinogênicos, eliminar os inibidores da PCR, bem como pela possibilidade de automação da metodologia, dados estes que corroboram nossos achados (Amory *et al.*, 2011; Frégeau *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2012; Barbaro *et al.*, 2009).

Mesmo que o procedimento de extração por coluna de sílica sendo executado sem automação foi possível comparar com o tempo de análise por partículas magnéticas, visto que, a agilidade do método foi explicada pelo menor tempo de incubação do tampão de lise do kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems (duas horas).

A automação dos processos de extração do kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems permitiu a manipulação de cerca de treze amostras simultaneamente, o que é essencial para a agilidade da rotina em laboratórios forenses. Apesar de um tempo de lise maior (24 horas), se o procedimento pós-lise do kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator-Quiagen fosse realizado em sua plataforma de automação (QIAcube<sup>®</sup>) seria possível manipular quatorze amostras de uma só vez. Portanto, a automação dos procedimentos de extração de DNA é essencial nos laboratórios forenses por agilizar e padronizar os processos do exame.

O método por partículas magnéticas utilizado na pesquisa tem em sua formulação tampão BTA<sup>®</sup> (*bone, tape and adhesive*) recomendado para ossos, fitas e adesivos e validado para amostras forenses por Barbaro *et al.* (2011). BTA<sup>®</sup> é um tampão de lise específico para amostras de ossos humanos, o que explica a maior quantidade de DNA extraído com este método. Além disso, a incubação com tampão de lise foi realizada em *thermoshaker*, que aumenta o contato dos reagentes com as células a serem lisadas.

O fato do kit Prepfilier<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup>-Applied Biosystems ter sido utilizado de maneira automatizada não impossibilita a comparação da quantidade

de DNA extraído com o kit QIAamp<sup>®</sup>DNA Investigator-Quiagen, pois os kits comerciais são desenvolvidos para ter o mesmo desempenho de concentração do DNA recuperado tanto pelo método automatizado quanto manual (Brevnov *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012).

Amostras forenses de ossos humanos, como as utilizadas em nosso estudo, na maioria das vezes, tem DNA degradado e contém inibidores de PCR como ácido húmico presente no solo, o próprio colágeno e íons cálcio presentes em uma extração não purificada (Holland *et al.* 2003). Neste estudo, ambos os métodos testados não obtiveram valores alterados de IPC, o que demonstra uma eficiência na eliminação de inibidores de PCR. Putkonen *et al.* (2010) mostraram que a quantidade de DNA nuclear e a sua degradação foram os fatores mais importantes que afetaram o sucesso da PCR a partir de ossos mal conservados. Como as metodologias utilizadas na extração de osso deste trabalho eliminaram os inibidores de PCR, a explicação para os resultados parciais de perfis de PCR (1-9 *loci*) e nenhuma amplificação (0 *locus*) obtidos após extração por partículas magnéticas foi a quantidade de DNA presente em cada amostra e seu nível de degradação.

Em todas as amostras extraídas por partículas magnéticas em que não houveram ampliações o resultado obtido foi muito semelhante quando extraídas por coluna de sílica, o que permite concluir que isto se deu em função da qualidade da amostra e não do método de extração. Já nas amostras extraídas por coluna de sílica é possível perceber que em cinco ossos o número de loci amplificados foi menor que cinco, enquanto que os mesmos materiais extraídos por partículas magnéticas o resultado foi a obtenção de perfil completo (16 *loci*).

O objetivo de nossa pesquisa não foi substituir a metodologia de extração por fenol-clorofórmio e sim comparar dentre as técnicas com possibilidade de automação qual a que apresentava resultados eficientes na extração de DNA produzindo perfis genéticos que pudessem resultar em identificação humana. E analisando nossos resultados percebemos

que a metodologia por partículas magnéticas foi superior em todas as variáveis comparadas.

Para aumentar o número de *loci* amplificados nos ossos com perfil parcial extraídos com partículas magnéticas será necessário novas tentativas de extração de DNA com outro protocolo desmineralização total e fenol-clorofórmio (Loreille et al., 2007), pois como partem de uma quantidade maior de pó de osso (cerca de um grama) pode melhorar os resultados de amplificação das amostras mais degradadas.

Outros estudos recentes com kits de extração de DNA por partículas magnéticas disponíveis comercialmente, especialmente o kit Prepfiler®BTA®-Applied Biosystems, confirmam os resultados obtidos nesta pesquisa, pois demonstraram a capacidade de produzir um DNA livre de inibidores de PCR, com possibilidade de perfil genético completo e tudo isso necessitando menor tempo de análise (Betancor et al. 2011; Sturk-Andreaggi et al., 2011; Bogas et al. 2012; Dukes et al. 2012; Witt et al. 2012; Stangegaard et al., 2013).

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

1. A automação do procedimento de extração de DNA padroniza os processos, diminui a interferência humana e o tempo gasto no procedimento.
2. O protocolo de extração por partículas magnéticas automatizado (Prepfile<sup>®</sup>BTA<sup>®</sup> com Automate Express<sup>®</sup>) foi realizado com um tempo de procedimento de cerca de 3 horas analisando 12 amostras, enquanto que por coluna de sílica de forma manual o tempo foi de 27 horas para analisar 4 amostras.
3. Não foram detectados inibidores de PCR em nenhuma das amostras extraídas pelos dois métodos.
4. O método de extração por partículas magnéticas recuperou uma quantidade superior de DNA em 22 das 25 amostras, chegando a uma superioridade de até 4 vezes mais que o outro método utilizado.
5. Somente em duas amostras analisadas o número de *loci* do tipo STR amplificados por partículas magnéticas não foi maior que por coluna de sílica.
6. O número de perfis moleculares completos obtidos por partículas magnéticas foi o dobro que por coluna de sílica.
7. A metodologia de extração de DNA por partículas magnéticas demonstrou ser eficaz e ágil na extração de DNA de amostras de osso humano, produzindo perfis moleculares completos capazes de proporcionar a identificação das amostras de osso.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.Almeida M, Betancor E, Fregel R, Suarez NM, Pestano J. Efficient DNA extraction from hair shafts. Forensic Sci Int Genet Supplement Series. 2011;3(1):e319-20.

2.Amory S, Huel R, Bilic A, Loreille O, Parsons TJ. Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains, Forensic Sci Int Genet. 2012;6:398-406.

3.Applied Biosystems. AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit user guide, part #: 4440211. Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(a).

4.AmpFISTR® MiniFiler® PCR amplification kit user guide, part #: 4374618. Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(b).

5.Applied Biosystems. AmpFISTR® NGM® PCR amplification kit user guide, part #: 4415020. Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(c).

6.Balsa F, Bogas V, Cunha P, Brito P, Serra A, *et al.* Preliminary validation of Prepfiler Express™ Extraction kit in AutoMate Express DNA Extraction System. Forensic Sci Int Genet Supplementary Series. 2011;3(1):e377-78.

7.Barbaro A, Cormaci P, Agostino A. Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). Forensic Sci Int Genet. 2009;2:176-77.

8. Barbaro A, Cormaci P, Falcone G. Validation of BTA™ lysis buffer for DNA extraction from challenged forensic samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;3:61-62.
9. Barbisin M, Fang R, O'Shea CE, Calandro LM, Furtado MR, *et al.* Developmental Validation of the Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit for Simultaneous Quantification of Total Human and Human Male DNA and Detection of PCR Inhibitors in Biological Samples. *J Forensic Sci.* 2009; 54(2):305-19.
10. Barbisin M, Shewale JG. Assessment of DNA extracted from forensic samples prior to genotyping. *Forensic Sci Review.* 2010;22:199–214.
11. Berketa JW, James H, Lake AW. Forensic odontology involvement in disaster victim identification. *J Forensic Sci Med and Path.* 2012;8(2):148-156.
12. Betancor E, Fregel R, Suárez NM, Cabrera VM, Pestano J. An Efficient Method of Extracting DNA from Bone Remains from the Spanish Civil War – A Comparative Study of Two Methods: PrepFiler BTA™ and DNAzol® Methods. *Forensic News.* January, 2011. [capturado 15 Dez 2012]. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com/ForensicNews-Past>.
13. Bogas V, Balsa F, Carvalho M, Anjos MJ, Pinheiro MF *et al.* Comparison of four DNA extraction methods for forensic application. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;3:e194-95.
14. Bowden A, Fleming R, Harbison S. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(1):64-8.

15. Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, Calandro LM, Furtado MR *et al.* Developmental validation of the Prepfil<sup>®</sup> Forensic DNA Extraction of genomic DNA from biological samples. *J Forensic Sci.* 2009;54(3):599-607.
16. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.* Californy-USA:Elsevier inc. 2012.
17. Courts C, Madea B. Full STR Profile of a 67-Year-Old Bone Found in a Fresh Water Lake. *J Forensic Sci.* 2011;56:S172-75.
18. Davis CP, King JL, Budowle B, Eisenberg AJ, Turnbough MA. Extraction platform evaluations: a comparison of AutoMate Express<sup>™</sup>, EZ1<sup>®</sup> Advanced XL, and Maxwell<sup>®</sup> 16 Bench-top DNA extraction systems. *Int J Legal Med.* 2012;14:36-39.
19. Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Edwin H, Parsons TJ. Highly Effective DNA Extration Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J.* 2007;48:478-85.
20. Del Valle C, Rodríguez A, Espinoza M, Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Rev Biol Trop.* 2004;52:717-25.
21. Dukes MJ, Williams AL, Massey CM, Wojtkiewicz PW. Bone DNA Extraction and Purification Using Silica-Coated Paramagnetic Beads. *Am J Phys Anthropol.* 2012;148:473-82.
22. Fighini ARL, Leitão e Silva JR, Jobim LF, da Silva M. *Identificação Humana.* 2.ed. Campinas: Millenium editora. 2003.

23. Francez PAC, Rodrigues EM, de Velasco AM, dos Santos SE. Insertion-deletion polymorphisms-utilization on forensic analysis. *Int J Legal Med.* 2011;126:491-96.

24. Frégeau CJ, Lett CM, Fourney RM. Validation of a DNA IQ<sup>®</sup>-based extraction method for TECAN<sup>®</sup> robotic liquid handling workstations for processing casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4:292-304.

25. Funes-Huacca ME, Opel K, Thompson R, McCord BR. A comparison of the effects of PCR inhibition in quantitative PCR and forensic STR analysis. *Electrophoresis.* 2011;32:1084–89.

26. Gilbert MTP, Rudbeck L, Willersleva E, Hansen AJ, Smithe C, Penkman KEH *et al.* Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archeological Sci.* 2005;32:785-93

27. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci.* 1998;43:1024-30.

28. Hashiyada M, Nakayashiki N, Funayama M. Utility validation of extraction of genomic DNA from hard tissues, bone and nail, using PrepFiler<sup>™</sup> Forensic DNA Extraction Kit. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series.* 2009;2(1):172-73.

29. Harder M, Rennenberg R, Meyer P, Krause-Kyora B, von Wurmb-Schwark N. STR-typing of ancient skeletal remains: which multiplex-PCR kit is the best? *Croat Med J.* 2012;53(5):416-22.



30.Hedman J, Radström P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Methods Mol Biol.* 2013;943:17-48.

31.Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci.* 1991;36:1649-61.

32.Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW. Development of a Quality, High Throughput DNA Analysis Procedure for Skeletal Samples to Assist with the Identification of Victims from the World Trade Center Attacks. *Croat Med J.* 2003;44:264-72.

33.Interpol, DVI Guide [on line]. Lyon, France; 2012. [capturado 27 out 2012] Disponível em: <http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI>.

34.Irwin JA, Leney MD, Loreille O, Barrit SM, Christensen AF, Holland TD, Smith BC, Parsons TJ. Application of Low Copy Number STR Typing to the Identification of Aged, Degraded Skeletal Remains. *J Forensic Sci.* 2007;52:1322-27.

35.Jaffredo F, Freund F, Godichaud S, Gaboyard M, Moisan JP. Complete automated DNA database collection. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series.* 2011;3(1):e228-29.

36.Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med.* 2012;126:173–78.

37.Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. *Nature.* 1985;314:67-73.

38. Karija Vlahovic M, Kubat M. DNA extraction method from bones using Maxwell<sup>®</sup> 16. *Leg Med (Tokyo)*. 2012;14(5):272-5.
39. Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int*. 2005;154:53–61.
40. Kitayama T, Ogawa Y, Fujii K, Nakahara H, Mizuno N, Sekiguchi K, *et al.* Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. *Int J Legal Med*. 2010;12:84-9.
41. Köhnemann S, Pfeifer H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet*. 2011;5:216-21.
42. Kontanis EJ, Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. *J Forensic Sci*. 2006;51(4):795-804.
43. Krenke BE, Nassif N, Sprecher CJ, Knox C, Schwandt M *et al.* Developmental validation of a real-time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2008;3(1):14-21.
44. Lee HY, Park MJ, Kim NY, Sim JE, Yang WI, Kyoung-Jim S. Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns, *Forensic Sci Int Genet*. 2010;4:275-80 (a).
45. Lee EJ, Luedtke JG, Allison, JL, Arber CE, Merriwether DA, Steadman D W. The Effects of Different Maceration Techniques on Nuclear DNA Amplification Using Human Bone. *J Forensic Sci*. 2010;55:1032-38 (b).

- 46.Liu JY, Zhong C, Holt A, Lagace R, Harrold M, *et al.* AutoMate Express<sup>TM</sup> Forensic DNA Extraction System for the Extraction of Genomic DNA from Biological Samples. *J Forensic Sci.* 2012;57(4):1022-30.
- 47.Loreille OM, Diegoli TM, Irwin JA, Coble MD, Parsons TJ. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1:191-95.
- 48.Marjanovic D, Durmic-Pasic A, Bakal N, Haveric S, Kalamujic B. DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia. *Croat Med J.* 2007;48(4):513-9.
- 49.Milos A, Selmanovic A, Smajlovic L, Huel RLM, Katzmarzyk C, Rizvic A, Parsons TJ. Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements. *Croat Med J.* 2007;48:486-93.
- 50.Mundorff AZ, Bartelink EJ, Mar-Cash E. DNA Preservation in Skeletal Elements from the World Trade Center Disaster: Recommendations for Mass Fatality Management. *J Forensic Sci.* 2009;54:739-45.
- 51.Neumann C, Evett IW, Skerrett J. Quantifying the weight of evidence from a forensic fingerprint comparison: a new paradigm. *J Royal Stat Soc.* 2012;175(2):371-415.
- 52.Nicklas JA, & Buel E. . Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*2003;376: 1160-67.
- 53.Opel KL, Chung D, MacCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 2010;55:25-33.

54. Pagan F, Lim C, Keglovic M, McNevin D. Comparison of DNA extraction for identification of human remains. *Australian J Forensic Sci.* 2012;44(2):117-127.
55. Pajnic IZ, Pogorelc BG, Balazic J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med.* 2010;124:307-17.
56. Parsons TJ, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk, Milos A, Selmajlovic A, *et al.* Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1:175-79.
57. Pasquale F, Cornelius S, König M, Scherer M, Schmid C, *et al.* Investigator<sup>®</sup> Quantiplex Kit: For reliable quantification of human DNA in forensic samples. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series.* 2011;3(1):e413-14.
58. Petersen D, Kaplan M. The Use of Hemastix<sup>®</sup> Severely Reduces DNA Recovery Using the BioRobot<sup>®</sup> EZ1. *J Forensic Sci.* 2011;56:733–35
59. Phillips K, MacCallum N, Welch L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(2):282-5.
60. Promega. Plexor<sup>®</sup> HY System for the Bio-Rad iQ<sup>™</sup>5 Real-Time PCR Detection System. Madison, WI: Promega, 2012.

61. Putkonen MT, Palo JU, Cano JM, Hedman M, Sajantila A. Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples. *Investigative Genetics*. 2010;1:1-7.
62. Romanini C, Catelli ML, Borosky A, Pereira R, Romero M *et al.* Typing short amplicon binary polymorphisms: supplementary SNP and Indel genetic information in the analysis of highly degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6(4):469-76.
63. Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*. 2007;42:343-52.
64. Rucinski C, Malaver AL, Yunis EJ, Yunis JJ. Comparison of two methods for isolating DNA from human skeletal remains for STR analysis. *Forensic Sci*. 2012;57(3):706-12.
65. Seo SB, Zhang A, Kim HY, Yi JA, Lee HY, Shin DH, Lee SD. Efficiency of Total Demineralization and Ion-Exchange Column for DNA Extraction from Bone. *Am J Phys Anthropol*. 2010;141:158-62.
66. Stangegaard M, Hjort BB, Hansen TN, Hoflund A, Mogensen HS, *et al.* Automated extraction of DNA from biological stains on fabric from crime cases. A comparison of a manual and three automated methods. *Forensic Sci Int Genet*. 2013; doi: 10.1016/j.fsigen.2012.12.009. [Epub ahead of print].
67. Stangegaard M, Meijer PJ, Borsting C, Hansen AJ, Morling N. Biomek 3000-The Workhorse in an Automated Accredited Forensic Genetic Laboratory. *J Laboratory Automation*. 2012;17(5):378-86.

68. Stray J, Holt A, Brevnov M, Calandro LM, Furtado MR, *et al.* Extraction of high quality DNA from biological materials and calcified tissues. *Forensic Sci Int: Genet Supplement Series*. 2009;2(1):159-160.

69. Stray JE, Liu JY, Brevnov MG, Shewale JG: Extraction of DNA from forensic biological samples for genotyping. *Forensic Sci Rev*. 2010;22:159-175.

70. Sturk-Andreaggi K, Diegoli TM, Just R, Irwin J. Evaluation of automatable silica-based extraction methods for low quantity samples. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 2011; 3(1):e504-e505.

71. Vollack K, Haak B, Schwenzer R, Pflug W. Implementation of a semi-automated processing system for DNA profiling of forensic casework samples. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 2008;1(1):83-5.

72. Wang J, McCord B. The application of magnetic bead hybridization for the recovery and STR amplification of degraded and inhibited forensic DNA. *Electrophoresis*. 2011;32:1631-38.

73. Westen A, Gerrestsen RRR, Maat GJR. Femur, rib and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DVI). A method to minimize contamination risk, *Forensic Sci Med Pathol*. 2008;4:15-21.

74. Witt S, Neumann J, Zierdt H, Gébel G, Röscheisen C. Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. *Forensic Sci Int Genet*. 2012;6:539-47.

75. Zietkiewicz E, Witt M, Daca P, Zebracka-Gala J, Goniewicz M, *et al.* Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J Appl Genet*. 2012;53(1):41-60.

76.Zimmermann P, Vollack K, Haak B, Bretthauer M, Jelinski A, *et al.* Adaptation and evaluation of the PrepFiler™ DNA extraction technology in an automated forensic DNA analysis process with emphasis on DNA yield, inhibitor removal and contamination security. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series*. 2009;2(1):62-3.

## 8 ANEXOS

### 8.1 Artigo a ser submetido à Revista Científica

#### COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHODS FROM HUMAN BONE USING MAGNETIC BEAD AND SILICA COLUMN

Ian Marques Cândido<sup>1,3</sup>, Laryssa Silva de Andrade Bezerra<sup>1</sup>, Mariana Flavia da Mota<sup>1</sup>, Neide Maria de Oliveira Godinho<sup>1</sup>, Rhonan Ferreira da Silva<sup>2</sup>, Solon Diego Santos Carvalho Mendes<sup>2</sup>, Rejane da Silva Sena Barcelos<sup>1,3</sup>

(1) Laboratório de Biologia e DNA Forense, Polícia Técnico-científica, avenida Atilio Correia Lima, nº 1223, Cidade Jardim, Goiânia, Goiás, Brasil.

(2) Seção de Antropologia e Odontologia Legal, Polícia Técnico-científica, avenida Atilio Correia Lima, nº 1223, Cidade Jardim, Goiânia, Goiás, Brasil.

(3) Mestrado em Genética, Pontifícia Universidade Católica, avenida Universitária, nº 1440, Goiânia, Goiás, Brasil.

#### Abstract

The DNA research (Desoxyribonucleic acid) has proven an effective tool and thus widely used in forensic sciences. The identification of human remains in decomposition, charred, skeletal remains and mass disaster can be performed by the Forensic Genetics and mostly bones and teeth are the only viable source for DNA typing. The quantity and quality of DNA extracted from bone samples are crucial to the success of genetic identification. Thus, considering the large number of bones used in human identification and the need for automation of DNA extraction in this type of sample, the objective of this study is to evaluate two different techniques of DNA extraction from front to twenty-five human bones with DNA quantification and STR profiles obtained from each sample. The



methodology of DNA extraction using magnetic particles recovered a higher amount of DNA and produced a greater number of loci amplified compared to the silica column, and therefore, suitable for automation of extraction procedures.

Keywords: Forensic Genetics, DNA extraction, bone

## 1. INTRODUCTION

In plane crashes, natural disasters, armed conflicts and other mass disasters may not be possible human identification for the dactyloscopy or forensic odontology. This fact can be explained by destruction of soft tissues and lack of clinical documentation for confrontation. In such cases, alternative is the genetics identification of the mortal remains, and often are bones and teeth are excellent sources of DNA for genetic identification (Davoren et al., 2007; Murdoff et al. 2009; Pajnic et al. 2010). This is due to the presence of mineralized matrix (bone or tooth) that provides physical and chemical barrier against environmental damage and attack from microorganisms, which contributes to the preservation of biological materials (Loreille et al. 2007). DNA preservation in human remains may be influenced by complex interactions of taphonomic processes, including exposure to moisture, humidity, soil conditions, fire, ultraviolet radiation, microbes, fauna and flora (Mundorff et al. 2009).

The choice of location and type of bone to be used for DNA extraction is a factor which shows directly influence the success of amplification of the genetic profile. Studies have reported femur and preferred sample for DNA extraction by the fact that the bones are more massive the cortical part, which is used in the examination, the thicker (Milos et al. 2007, Westen et al. 2008).

About 70% of bone consists of the inorganic material. Areas of extensive mineralization within the bone represent physical barriers to the

extraction reagents and therefore prevent the release of DNA molecules (Loreille *et al.* 2007). The main difficulties in the success of the DNA profiling in forensic samples are degraded DNA and inhibitors of Polymerase Chain Reaction (PCR) (Milos *et al.* 2007, Putkonen *et al.* 2010). Therefore, several authors have discussed ways to expand the amount of extracted DNA and remove inhibitors, obtaining a pure DNA with new extraction protocols or combination of existing methods, which implies a lack of global consensus on the best extraction technique to bone (Barbaro *et al.* 2009, Davoren *et al.* 2007, Kitayama *et al.* 2010, Lee *et al.* 2010, Loreille *et al.* 2007, Rholand *et al.* 2007, Seo *et al.* 2010).

Hochmeister *et al.* (1991) first reported the use of DNA extracted from the femur for human identification. The extraction methodology used by these authors was based on the decalcification partial, cell lysis and phenol-chloroform. Subsequently, other studies were published with modifications in the traditional phenol/chloroform extraction to improve their performance (Davoren *et al.* 2007, Dell Valle *et al.* 2004, Irwin *et al.* 2007). However, Rohland & Hofreiter (2007) state that chemical reagents routinely added to traditional technique does not increase the amount of DNA extracted. Phenol/chloroform extraction has several disadvantages besides being unable to remove potential PCR inhibitors efficiently, is toxic and carcinogenic and uses a significant amount of human bone (1-2 grams). Furthermore, this method could impede automation of DNA extraction (Lee *et al.* 2010).

The automation of extraction processes aimed at improving and standardizing procedures such as reduction of human interference, the analysis time, cost of reagents and the amount of sample. Multiple platforms already validated for use Forensic Genetics and their throughput varies according to the routine laboratory (Amory *et al.* 2012, Davis *et al.* 2012, Fregeau *et al.* 2010, Witt *et al.* 2012). These automation platforms

using only two methods of extraction with a silica column and the other magnetic particles.

The objective of this study is to compare the techniques of extraction with possibility automation that have been validated for forensic samples using human bone, assessing the absolute amount of DNA extracted and STR profiling considering 16 markers from each sample.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Sample

We randomly selected at the Laboratory of Biology and Forensic DNA Forensic Science of the State of Goiás, Brazil, twenty-five (25) human identification cases that have the femur as the sample questioned, regardless of age or sex of the missing, conditions of storage of the bone and the time of disappearance. These samples were received by the Laboratory of DNA between the years 2006 and 2011.

### 2.2 Sample preparation

All samples bone went through the same pre-treatment steps. After sanding the inner and outer surface of the bone using microrretífica Dremel® was obtained by cutting a bone fragment with a mass close to three grams. Subsequently he was frozen in a freezer -80°C/24 hour and ground in a mill Ika®.

### 2.3 Extraction methods

Twenty-five aliquots of 100 mg of powdered sample DNA were extracted by two different techniques: the magnetic beads with the kit Prepfil® BTA®-Applied Biosystems using extrataction platform Automate Express® (Applied Biosystems) and the other column of silica by the samples were handled manually with kit QIAamp® DNA-Investigator

Quiagen. The procedures for both methods were performed according to handbook kit.

## 2.4 DNA Quantification

All DNA extracts were quantified by real time PCR, using HY Plexor® kit (Promega) and thermal cycler IQ5® (Biorad). The presence of PCR inhibitors was assessed using the Internal PCR Control (IPC).

## 2.5 DNA Amplification

The samples were amplified by PCR using the commercial kit multiplex Identifiler Plus® (Applied Biosystems) using a total volume of the reaction was 25uL. The specimens that were not complete genetic profiles obtained were concentrated in vacuum centrifuge, resuspended and a retry of amplification was performed for each sample using kits Minifiler® or NGM® (Applied Biosystems). All amplifications were performed in the DNA Thermal Cycler Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). The number of cycles, time of incubation and amount of reagents followed the manufacturer's instructions amplification kit.

## 2.6 Electrophoresis

The amplification products were analyzed by capillary electrophoresis in ABI® 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) using polymer POP4® (Applied Biosystems) and software GeneMapper® (Applied Biosystems).

## 3. RESULTS

The speed of the extraction procedure was compared from the beginning of the incubation of the lysis buffer to the resuspended DNA

extracted. The kit Prepfil® BTA®-Applied Biosystems, which was used in automation, had an analysis time of approximately three hours to twelve samples and the QIAamp® Kit, Quiagen Investigator DNA was performed in manual way this time was approximately 27 hours to 4 samples.

The comparison of the amount of DNA recovered for each sample using both extraction methodologies may be shown in Table 1. Except for three bones, the concentration of extracted DNA was higher magnetic beads concentration by a silica column may be obtained by four times.

In assessing the IPC did not find any changed value.

The successful amplification of DNA extracted was assessed according to the number of loci amplified the sixteen (16) tested by amplification kits (Table 01). The number of loci amplified using the magnetic beads was equal or superior to those extracted by silica column in all samples except the LD 135/09. Ten complete genetic profiles (16 loci amplified) were obtained with Prepfil®BTA®-Applied Biosystems whereas with QIAamp®DNA Investigator-Quiagen were obtained only five full profiles. Were obtained nine or more loci amplified in 68% of cases of extractions that used magnetic particles, while with silica column index was only 36% (Table 2).

Table 1  
Results of quantitative real-time PCR and STR analysis comparing different DNA extraction methods for 25 human bone

Sample	Magnetic bead		Silica column	
	pg/uL	STR profile	pg/uL	STR profile
LD 02-07	8,76	9	5,78	9
LD 07-07	3	8	1,03	2
LD 67-07	50	16	12,7	16
LD 03-08	1,48	11	7,1	4

LD 12-08	7,72	-	1,49	2
LD 102-08	24,8	16	6,81	5
LD 121-08	17,5	16	5,53	1
LD 22-09	122	16	38,8	16
LD 34-09	874	16	263	16
LD 54-09	1,91	-	-	-
LD 61-09	10,8	15	7,51	2
LD 135-09	21,2	5	9,59	11
LD 02-10	68,2	16	18	13
LD 36-10	6,98	13	3,13	4
LD 67-10	11,9	8	4,05	-
LD 68-10	7,83	13	2,4	9
LD 84-10	3,03	-	1,16	-
LD 119-10	17,3	16	13,2	16
LD 122-10	51,9	16	49,9	16
LD 62-11	4,64	-	2,6	-
LD 65-11	2,67	9	1,89	-
LD 77-11	1,16	-	2,47	-
LD 127-11	9,07	16	2,39	-
LD 151-11	8,08	16	3,54	4
LD 307-11	5,04	9	5,35	2

---

Table 2

STR profiles results of DNA extracted from human bone using magnetic bead or silica column

PCR profile	Magnetic bead		Silica column	
	Nº	%	Nº	%
Complete (16 loci)	10	40	5	20
High partial ( $\geq 9$ loci)	7	28	4	16
Low partial ( $< 9$ loci)	3	12	9	36
No results (0 loci)	5	20	7	28
Total	25	100	25	100

#### 4. DISCUSSION

Various authors recommend the use of extraction kit by not using carcinogenic reagents, eliminating PCR inhibitors and also by the possibility of automation of the methodology (Amory et al. 2011, Frégeau et al. 2010, Davis et. al. 2012, Barbaro et. al., 2009).

The difference of analysis time of each extraction techniques is explained by the lower incubation time of digest buffer by magnetic bead (two hours). The kit Prepfil®BTA®-Applied Biosystems have in your buffer BTA® formulation that has been validated for forensic samples by Barbaro *et al.* (2011). BTA® is a lysis buffer specific for human bone samples, which could explain a higher amount of DNA extracted by this method. Furthermore, incubation with lysis buffer is performed in thermoshaker, which increases contact of reagents with the cells to be lysed.

The automation of extraction procedures allowed the manipulation of about 13 samples simultaneously, which is essential for agility routine in forensic laboratories.

Forensic samples of human bone are often degraded and contains PCR inhibitors (Holland et al, 2003). Both methods tested were not altered values of IPC which shows that has a similar resistance to PCR inhibitors recovering a pure DNA. Putkonen *et. al.* (2010) showed that the quantity of nuclear DNA and its degradation (allele size) were the most significant factors affecting PCR success from poorly preserved bones. As the techniques used in extracting bone samples eliminated PCR inhibitors, the explanation for low partial and no results (0 loci) PCR profiles is DNA amount and degradation.

The STR profiles with magnetic bead was higher in nearly all bone samples. In the LD 127-11, magnetic bead recovered a small amount of DNA (9.07 pg/uL) but produced a complete genetic profile (Figure 01). At the same bone extraction with silica column did not amplify any loci (Figure 02). Others researches built upon a commercially available kit with magnetic bead showed the capability of producing a full profile and pure DNA from forensic samples without contamination and requiring less of an analyst's time (Dukes et al. 2012, Wang & McCord, 2011).



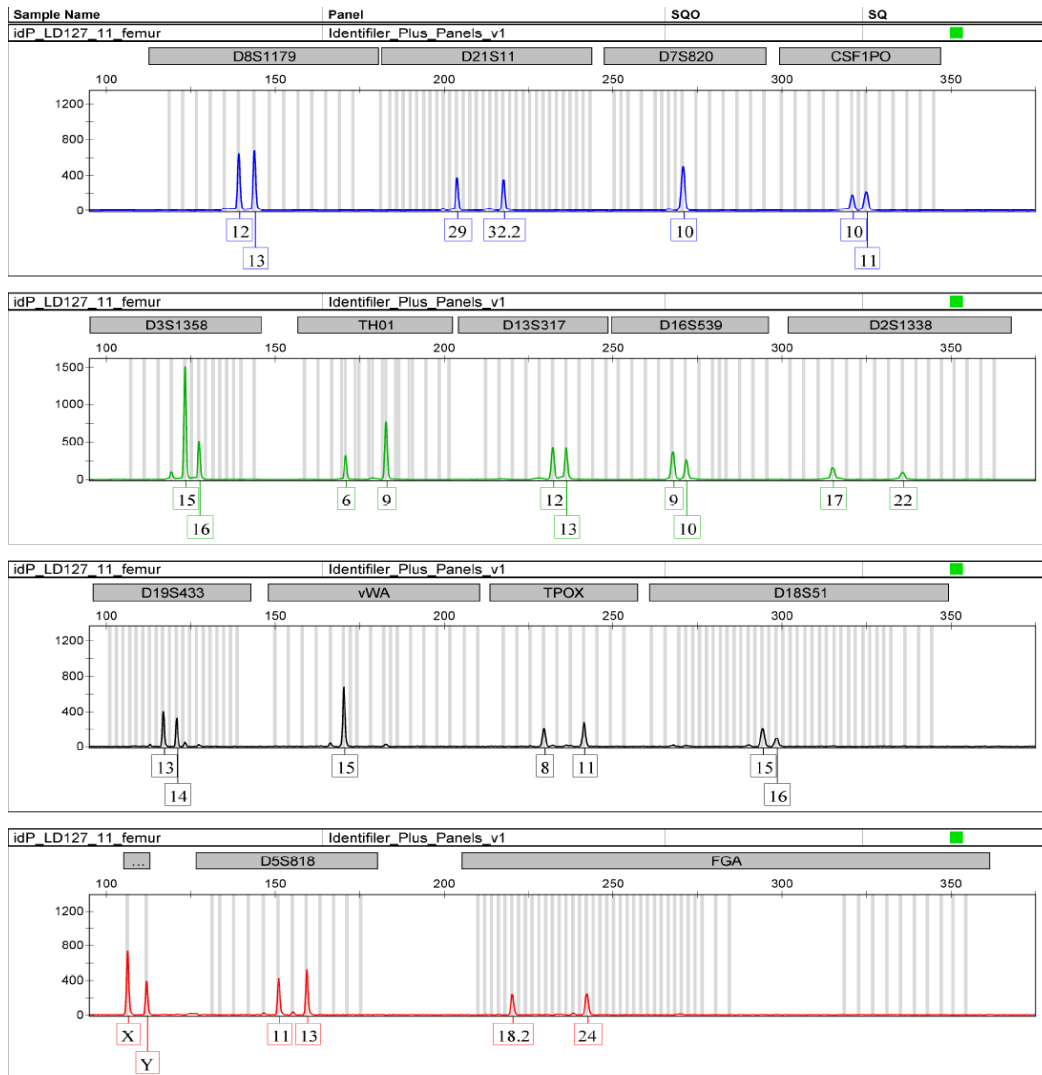


Figure 01. Electropherogram of bone sample LD 127-11 extracted by magnetic bead 9,07 pg/uL

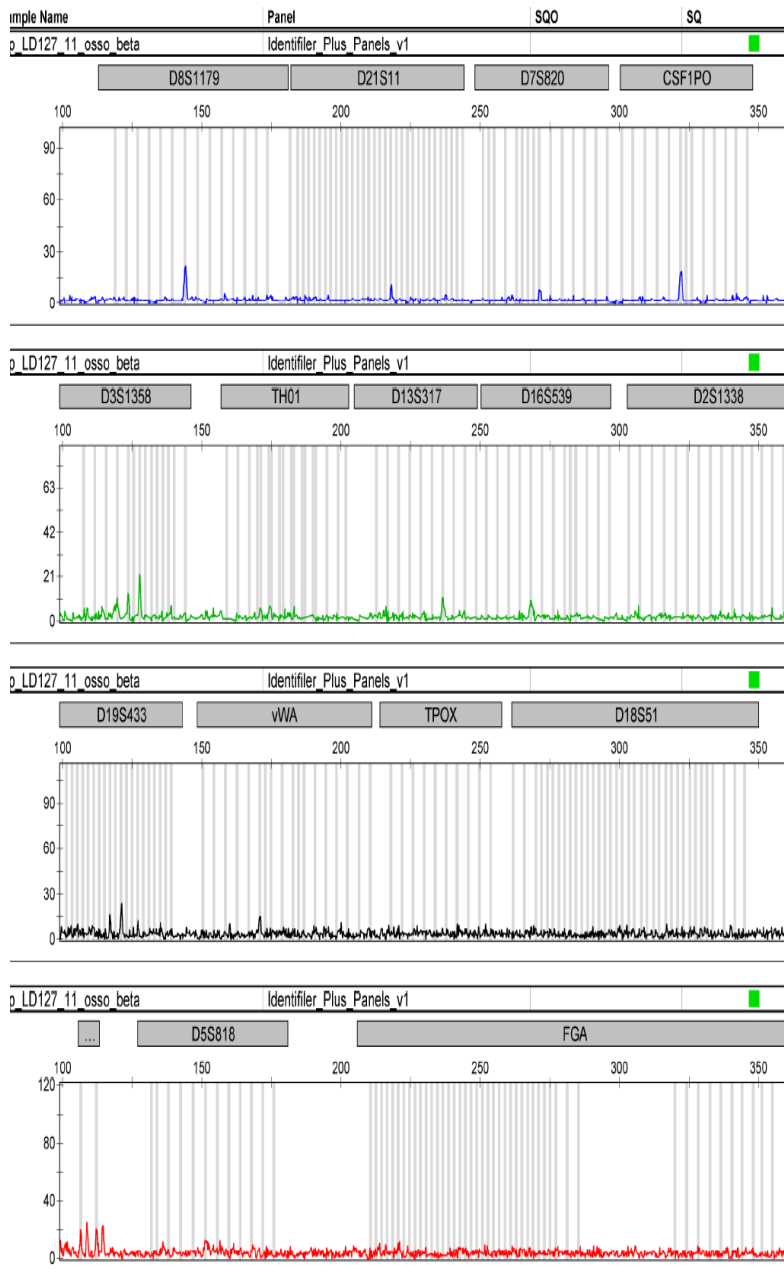


Figure 02. Electropherogram of bone sample LD 127-11 extracted by silica column 2,39 pg/uL

## 5. CONCLUSION

The automation of DNA extraction method optimizes procedures, reduces analysis time and human error. Our experiment showed that by automating the extraction time was approximately 3 hours while the

manual method was approximately 27 hours. Therefore, automation reduced nine times the extraction time analyzing the triple samples at once.

The kit Prefiler®BTA®-Applied Biosystems was efficient in removing PCR inhibitors and secure by not using phenol-chloroform. Moreover, they require a quantity of bone powder (100 mg) was about ten times less than traditional methodologies by phenol-chloroform extraction, allowing working with small bone fragments.

Magnetic beads recovered a higher amount of DNA and produced a greater number of loci amplified compared to column of silica method. Consequently, the automation of magnetic bead extraction was shown an excellent choice for genetic identification of human bone in forensic laboratories with great routine.

## 6. REFERENCES

J. Davoren , D. Vanek , R. Konjhodzic , J. Crews , H. Edwin , T.J. Parsons, Highly Effective DNA Extration Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves, Croat Med J. 48 (2007) 478-85.

A.Z. Mundorff , E.J. Bartelink , E. Mar-Cash, DNA Preservation in Skeletal Elements from the World Trade Center Disaster: Recommendations for Mass Fatality Management, J Forensic Sci. 54 (2009) 739-745.

I.Z. Pajnic, B.G. Pogorelc, J. Balazic, Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second War Konfin I mass grave in Slovenia, Int J Legal Med. 124 (2010) 307-317.

O.M. Loreille, T.M. Diegoli, J.A. Irwin, M.D. Coble, T.J. Parsons, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Sci Int Genet.* 1 (2007) 191-195.

A. Milos, A. Selmanovic, L. Smajlovic, R.L.M. Huel, C. Katzmarzyk, A. Rizvic, T.J. Parsons, Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements, *Croat Med J.* 48 (2007) 486-493.

A. Westen, R.R.R. Gerrestsen, G.J.R. Maat, Femur, rib and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DVI). A method to minimize contamination risk, *Forensic Sci Med Pathol.* 4 (2008) 15-21.

M.T. Putkonen, J.U. Palo, J.M. Cano, M. Hedman, A. Sajantila, Factors affecting the STR amplification success in poorly preserved bone samples, *Investigative Genetics.* 1 (2010) 1-7.

A. Barbaro, P. Cormaci, A. Agostino, Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). *Forensic Sci Int Genetics.* 2 (2009) 176-177.

T. Kitayama, Y. Ogawa, K. Fujii, H. Nakahara, N. Mizuno, K. Sekiguchi, K. Kasai, N. Yurino, T. Yokoi, Y. Fukuma, K. Yamamoto, T. Oki, H. Asamura, H. Fukushima, Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method, *Leg Med.* 12 (2010) 84-89.

H.Y. Lee, M.J. Park, N.Y. Kim, J.E. Sim, W.I. Yang, S. Kyoung-Jim, Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns, *Forensic Sci Int Genet.* 4 (2010) 275-280.

M.N. Hochmeister, B. Budowle, U.V. Borer, U. Eggmann, C.T. Comey, R. Dirnhofer, Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains, *J Forensic Sci.* 36 (1991) 1649-1661.

N. Rohland, M. Hofreiter, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, *BioTechniques.* 42 (2007) 343-352.

S.B. Seo , A. Zhang, H.Y. Kim, J.A. Yi, H.Y. Lee, D.H. Shin, S.D. Lee, Efficiency of Total Demineralization and Ion-Exchange Column for DNA Extraction from Bone. *Am J Phys Anthropol.* 141(2010) 158-62.

C. Del Valle, A. Rodríguez, M. Espinoza, Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos, *Rev. Biol. Trop.* 52 (2004) 717-725.

J.A. Irwin, M.D. Leney, O. Loreille, S.M. Barrit , A.F.Christensen, T.D. Holland, B.C. Smith T.J. Parsons, Application of Low Copy Number STR Typing to the Identification of Aged, Degraded Skeletal Remains. *J Forensic Sci.* 52 (2007) 1322-1327.

S. Amory , R. Huel, A. Bilic, O. Loreille, T.J. Parsons, Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains, *Forensic Sci Int Genetics.* 6 (2012) 398-406

C.P. Davis, J.L. King, B. Budowle, A.J. Eisenberg, M.A. Turnbough, Extraction platform evaluations: a comparison of AutoMate Express™, EZ1® Advanced XL, and Maxwell® 16 Bench-top DNA extraction systems, *Leg Med.* 14 (2012) 36-39.

C.J. Frégeau, C.M. Lett, R.M. Fournay, Validation of a DNA IQ-based extraction method for TECAN robotic liquid handling workstations for processing casework, *Forensic Sci Int Genet.* 4 (2010) 292-304.

S. Witt, J. Neumann, H. Zierdt, G. Gébel, C. Röscheisen, Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples, *Forensic Sci Int Genet.* 6 (2012) 539-547.

A. Barbaro, P. Cormaci, G. Falcone, Validation of BTA™ lysis buffer for DNA extraction from challenged forensic samples, *Forensic Sci Int Genet.* 3 (2011) 61-62.

M.M. Holland, C.A. Cave, C.A. Holland, T.W. Bille. Development of a Quality, High Throughput DNA Analysis Procedure for Skeletal Samples to Assist with the Identification of Victims from the World Trade Center Attacks. *Croat Med J.* 44 (2003) 264-272.

M.J. Dukes, A.L. Williams, C.M. Massey, P. W. Wojtkiewicz. Bone DNA Extraction and Purification Using Silica-Coated Paramagnetic Beads. *Am J Phys Anthropol.* 148 (2012) 473-482.

J. Wang, B. McCord The application of magnetic bead hybridization for the recovery and STR amplification of degraded and inhibited forensic DNA. *Electrophoresis.* 32 (2011) 1631-1638.

## 8.2 Protocolo de extração de DNA do kit QIAamp® DNA-Investigator Quiagen

### Protocol: Isolation of Total DNA from Bones and Teeth

This protocol is for isolation of total (genomic and mitochondrial) DNA from pieces of bones and teeth.

#### Important points before starting

- Lysis time will vary depending on the size and density of the source material. The lysis conditions given here are intended to serve as guidelines.
- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

#### Things to do before starting

- Equilibrate Buffer ATE or distilled water for elution to room temperature (15–25°C).
- Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 2 and (optional) step 15, and a second thermomixer or heated orbital incubator to 70°C for use in step 5. If thermomixers or heated orbital incubators are not available, heating blocks or water baths can be used instead.
- If Buffer AL or Buffer ATL contains precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.
- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on page 12.
- Optional: If processing very small amounts of starting material, add carrier RNA dissolved in Buffer ATE to Buffer AL according to the instructions on page 13.

#### Procedure

1. **Crush the bone into small fragments. Grind to a fine powder using a metal blender half-filled with liquid nitrogen. Alternatively, grind the bone to a fine powder using the TissueLyser and the Grinding Jar Set, S. Steel.**  
When using the TissueLyser, transfer the bone sample and the ball into the grinding jar. Pour liquid nitrogen into the grinding jar over the ball and bone fragments. Allow the temperature to equilibrate (i.e., liquid nitrogen stops boiling). Decant the excess liquid nitrogen, close the grinding jar with the lid, and transfer it to the TissueLyser. Grind the bone at 30 Hz for 1 min or until the bone is pulverized (grinding times depend on type, condition, and size of bone).
2. **Place ≤100 mg of powdered bone into a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add 360 µl Buffer ATL and 20 µl proteinase K. Incubate overnight at 56°C.**  
After incubation, set the temperature to 70°C for the incubation in step 5.
3. **Briefly centrifuge the tube to remove drops from the inside of the lid.**

- 4. Add 300  $\mu$ l Buffer AL, close the lid, and mix by pulse-vortexing for 10 s.**

To ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.

A white precipitate may form when Buffer AL is added to Buffer ATL. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure and will dissolve during incubation in step 5.

**Note:** If carrier RNA is required (see page 11), add 1  $\mu$ g dissolved carrier RNA to 300  $\mu$ l Buffer AL. Note that carrier RNA does not dissolve in Buffer AL. It must first be dissolved in Buffer ATE and then added to Buffer AL.
- 5. Place the tube in the thermomixer or heated orbital incubator, and incubate at 70°C with shaking at 900 rpm for 10 min.**

If using a heating block or water bath, vortex the tube for 10 s every 3 min to improve lysis.
- 6. Centrifuge the tube at full speed (20,000  $\times$  g; 14,000 rpm) for 1 min, and carefully transfer the supernatant to a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).**
- 7. Add 150  $\mu$ l ethanol (96–100%). Close the lid, and mix by pulse-vortexing for 15 s.**

To ensure efficient binding in step 9, it is essential that the sample and ethanol are thoroughly mixed to yield a homogeneous solution.
- 8. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.**
- 9. Carefully transfer the entire lysate from step 8 to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim.**
- 10. Close the lid, and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**

If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.
- 11. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 600  $\mu$ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.**



12. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700  $\mu$ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.

13. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 700  $\mu$ l of ethanol (96–100%) without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000  $\times$  g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.

14. Centrifuge at full speed (20,000  $\times$  g; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.

This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.

15. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column, and incubate at room temperature (15–25°C) for 10 min or at 56°C for 3 min.

16. Apply 20–50  $\mu$ l Buffer ATE or distilled water to the center of the membrane.

**Important:** Ensure that Buffer ATE or distilled water is equilibrated to room temperature (15–25°C). Dispense Buffer ATE or distilled water onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.

QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. Elution with small volumes increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but reduces the overall DNA yield. Remember that the volume of eluate will be up to 5  $\mu$ l less than the volume of elution solution applied to the column.

17. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000  $\times$  g; 14,000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

### 8.3 Protocolo de extração de DNA do kit PrepFiler®BTA® (Applied Biosystems)

#### Step 2: Perform lysis

**IMPORTANT!** To avoid precipitation of lysis buffer components, do not chill the sample lysate.

1. Bring the thermal shaker to 56°C.
2. Place each sample in a tube:

Sample type	Tube
Bone, tooth, or tape	2.0-mL screw-cap tube
All other PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit sample types	1.5-mL microcentrifuge tube

3. Prepare a fresh lysis buffer solution immediately before each experiment
  - a. Calculate the volumes of components that are needed for the number of reactions. Include up to 5% excess volume to compensate for pipetting losses.

Lysis buffer solution component	Volume	
	One reaction	96 reactions <sup>†</sup>
PrepFiler® BTA Lysis Buffer	220 µL	22 mL
1.0 M DTT	3 µL	300 µL
Proteinase K	7 µL	700 µL

<sup>†</sup> Recommended volume; includes approximately 4% excess volume to compensate for pipetting losses.

- b. Combine the required volumes of components, then gently mix.
4. Add 230 µL of the lysis buffer solution to each sample.
5. Cap the tubes, vortex the tubes for 5 seconds, centrifuge briefly, then gently flick tubes to resuspend any powder or substrate.
6. Make sure the tubes are well sealed, then place the tubes in a thermal shaker and incubate as follows:

Sample type	Incubation
Bone or tooth	1100 rpm and 56°C for 2 hours
All other PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit sample types	900 rpm and 56°C for 40 minutes

**Note:** You can use a heat block instead of a thermal shaker. Read “About thermal shakers” on page 63 before using a heat block. If you use a heat block, briefly vortex and centrifuge the tube every 5 minutes.

**Note:** For envelope flap samples, preliminary studies indicate that lysis at room temperature, rather than 56°C, may result in higher quantity and quality of extracted DNA. The validation studies performed by Life Technologies used a lysis temperature of 56°C. Each laboratory using the PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit should perform appropriate internal validation studies.

### 3 Chapter 3 PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit Protocol Standard protocol

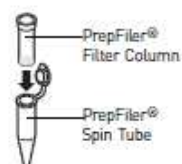
#### Step 3: Remove substrate from sample lysate

##### Bone, tooth, and chewing gum samples

1. Label up to 96 new 1.5-mL microcentrifuge tubes.
2. Allow the sample to equilibrate to room temperature.
3. Centrifuge the sample tubes at  $10,000 \times g$  for 90 seconds, then carefully transfer the clear lysate to a new, labeled 1.5-mL microcentrifuge tube. Do not disturb the sediment.
4. Check the volume of sample lysate that is collected in the spin tube. If the volume is less than 180  $\mu\text{L}$ , add PrepFiler® BTA Lysis Buffer to bring the total volume to 180  $\mu\text{L}$ .

##### All other sample types

1. Label up to 96 new 1.5-mL microcentrifuge tubes.
2. Allow the sample to equilibrate to room temperature.
3. Centrifuge the sample tubes for 2 seconds to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tubes.
4. Insert a PrepFiler® Filter Column into a new 1.5-mL PrepFiler® Spin Tube, then carefully transfer the sample tube contents into the filter column:
  - Use a pipette to transfer the liquid contents.
  - Use the pipette tip or sterile tweezers to transfer the substrate.
  - Centrifuge the sample tube briefly, then transfer any residual lysate.
5. Cap the filter column/spin tube, then centrifuge for 90 seconds at 8000 rpm.
6. Remove the filter column from the spin tube, then properly dispose of the filter column.
7. Check the volume of sample lysate that is collected in the spin tube. If the volume is less than 180  $\mu\text{L}$ , add PrepFiler® BTA Lysis Buffer to bring the total volume to 180  $\mu\text{L}$ .
8. Transfer the lysate to a new, labeled, 1.5 mL microcentrifuge tube.



#### Step 4: Supplement lysate volume with PrepFiler® Lysis Buffer

Add 300  $\mu\text{L}$  of PrepFiler® Lysis Buffer to the sample lysate tube, vortex it briefly to mix, then centrifuge it briefly.

**IMPORTANT!** Make sure to add PrepFiler® Lysis Buffer in this step, not PrepFiler® BTA Lysis Buffer.

**Note:** If you cannot proceed directly to the next step, the unprocessed, supplemented lysate is stable for up to 24 hours at room temperature (20°C) in a sealed tube. Do not chill the sample lysate.

**Step 5: Bind genomic DNA to magnetic particles**

1. Be sure the sample has equilibrated to room temperature before proceeding.
2. Vortex the PrepFiler® Magnetic Particles tube for approximately 5 seconds, invert the tube to confirm that no visible pellet remains in the bottom of the tube, then centrifuge it briefly.  
**Note:** If you are pipetting multiple samples, vortex the magnetic particles tube every 5 minutes until you complete the next step.
3. Pipet 15 µL of thoroughly resuspended magnetic particles into the sample lysate tube.
4. After adding the particles, recap the PrepFiler® Magnetic Particles tube to prevent evaporation.
5. Cap the sample lysate tube, vortex it at *low* speed (approximately 500–1,200 rpm) for 10 seconds, then centrifuge it briefly to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tube.

---

**IMPORTANT!** This step is required before you add isopropanol in order to promote binding.

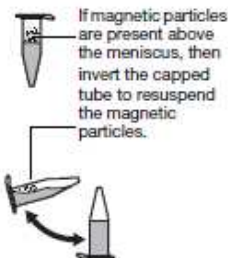
---

6. Add isopropanol and mix one sample at a time to promote binding:
  - a. Add 300 µL isopropanol (99.5% molecular biology grade) to a sample lysate tube.
  - b. Immediately after adding isopropanol, cap the sample lysate tube, vortex it at *low* speed (approximately 500–1,200 rpm) for 5 seconds, then centrifuge it briefly to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tube.
7. Place the sample lysate tube in a shaker or on a vortexer (with adaptor), then mix at 700 rpm at room temperature for 10 minutes.

**Step 6: Wash bound DNA**

1. Vortex the sample DNA tube:
  - a. If magnetic particles are present on the sides of the sample DNA tube above the meniscus, invert the tube to resuspend the particles.
  - b. Vortex the sample DNA tube at maximum speed (approximately 10,000 rpm) for 10 seconds, then centrifuge briefly to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tube.

**Note:** It is acceptable to have magnetic particle aggregates suspended in the solution or on the side of the tube below the meniscus.



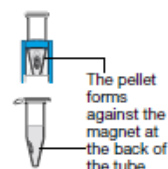


### 3 Chapter 3 PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit Protocol Standard protocol

2. Place the sample DNA tube in the magnetic stand and observe that the magnetic particles form a pellet against the back of the tube. Wait until the size of the pellet stops increasing (approximately 10 minutes).

Note: Samples containing high levels of proteins or other impurities may require more time.

Note: For some sample types, the solution may remain colored after the magnetic particles are separated.



3. With the sample DNA tube remaining in the magnetic stand, carefully aspirate and discard *all* visible liquid phase. Do not aspirate or disturb the magnetic particle pellet.
4. Perform steps a through e *three* times:
- Add prepared wash buffer to the sample DNA tubes:

First wash: Wash Buffer A	Second wash: Wash Buffer A	Third wash: Wash Buffer B
600 µL	300 µL	300 µL

- Cap the sample DNA tubes and remove them from the magnetic stand.
  - Vortex the sample DNA tubes for 15 seconds, then centrifuge briefly to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tube.
  - Place the sample DNA tubes in the magnetic stand for 1 minute.
  - With the sample DNA tubes remaining in the magnetic stand, carefully aspirate and discard *all* visible liquid phase. Do not aspirate or disturb the magnetic particle pellet.
5. Centrifuge the tubes briefly, place the tubes back on the magnetic stand for 30-60 seconds, then collect any residual liquid using a medium- or low-volume pipettor (200-µL or 20-µL tip).
6. If residual liquid is still present, with the sample DNA tubes remaining in the magnetic stand, open the tubes, then allow the magnetic particles-bound DNA to air-dry for up to 5 minutes.

**IMPORTANT!** Air-drying for more than 10 minutes may reduce DNA yield.

#### Step 7: Elute the DNA

- Bring the thermal shaker to 70°C.
- Add 50 µL of PrepFiler® Elution Buffer to the sample DNA tube, then vortex at maximum speed until the pellet is resuspended.
- Place the sample DNA tube in a thermal shaker, then incubate at 70°C and 900 rpm for 10 minutes.

Note: You can use a heat block instead of a thermal shaker. Read "About thermal shakers" on page 83 before using a heat block. If you use a heat block, briefly vortex and centrifuge the tube every 2-3 minutes.

4. Vortex the sample DNA tube at maximum speed (approximately 10,000 rpm) until there is no visible magnetic particle pellet on the side of the tube (approximately 2 seconds), then centrifuge briefly to collect any residual tube contents from the sides and cap of the tube.
5. Place the sample DNA tube in the magnetic stand, then wait until the size of the pellet at the side of the tube stops increasing (approximately 5 minutes).
6. Carefully aspirate *all* visible liquid phase in the sample DNA tube (this is the isolated genomic DNA). Do not aspirate or disturb the magnetic particle pellet. Transfer the eluate to a new, labeled 1.5-mL microcentrifuge tube for storage.

The isolated DNA can be stored at 4°C for up to one week, or at -20°C for longer storage.