

**Renata Jacewicz, Stefan Szram**

## Polimorfizm STR a RFLP w ustalaniu ojcostwa na podstawie badań rodzinnych

### STR and RFLP polymorphism in paternity determination based on family investigation

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
Kierownik: prof. zw. dr hab. med. S. Szram

W pracy przedstawiono genetyczną analizę ojcostwa niezującego pozwanego w oparciu o badania rodzinne. Statystyczna ocena wartości dowodowej badania z zastosowaniem analizy STR i RFLP pozwoliła na potwierdzenie ojcostwa z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością > 99.999% ( $PI > 100\ 000$ ). Analiza restrykcyjna okazała się znacznie bardziej informatywną w porównaniu do analizy amplifikacyjnej, tj. badanie siedmiu markerów typu RFLP dało analogiczną wartość wskaźników ojcostwa, co badanie piętnastu układów typu STR.

This paper shows a paternity examination of a deceased putative father carried out on the basis of his family investigation. Statistical evaluation proved the defendant's paternity using STR and RFLP analyses with the probability of more than 99,999% ( $PI > 100\ 000$ ). The restriction analysis has proven considerably more informative than the amplification analysis, which means seven RFLP markers correspond with the similar paternity indices of the fifteen STR markers.

**Słowa kluczowe:** sprawa niepełna, dochodzenie ojcostwa, analiza RFLP/STR

**Key words:** deficiency case, paternity determination, RFLP/STR analysis

#### WSTĘP

Badania w analizie ojcostwa, kiedy nie dysponujemy profilem DNA pozwanego, należą do spraw o najwyższym stopniu trudności. Wymagają one zastosowania znacznie szerszego zakresu marke-

rów oraz przeprowadzenia bardziej złożonej analizy statystycznej w porównaniu do spraw standardowych [5, 7].

W pracy zaprezentowano ocenę wartości dowodowej badania ojcostwa, gdzie w miejsce pozwanego badano jego rodzeństwo. Porównano skuteczność analizy DNA przeprowadzanej w oparciu o markery typu STR i RFLP.

#### MATERIAŁ I METODY

Badanie ojcostwa w sprawie niepełnej przeprowadzono w oparciu o próby krwi pobrane od dziecka, jego matki oraz od dwóch sióstr domniemanego ojca w Pracowni Genetyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. DNA izolowano stosując metodę solną wg Lahiri'ego [6]. Amplifikację 15 loci typu STR wykonano z wykorzystaniem systemu Identifiler (Applied Biosystem) z detekcją na sekwenatorze ABI Prism 377 w odniesieniu do standardu wielkości LIZ 500. Analizę minisatelitarnego DNA wykonano w oparciu o technikę RFLP stosując restrykcję enzymem Hinf I (Promega), hybrydyzację z próbkami jednolokusowymi (SLP) znakowanymi alkaliczną fosfatazą – MS31 (D7S21), MS43A (D12S11), MS1 (D1S7), TBQ7 (D10S28), YNH24 (D2S44), G3 (D7S22), MS8 (D5S43) (Cellmark Diagnostics). Pomiar fragmentów restrykcyjnych wykonano w oparciu o oprogramowanie BIO1D (Vilber Lourmat) w odniesieniu do markera wielkości NICE™ DNA (Gibco BRL). Częstości alleli VNTR odpowiadały stałym przedziałom wielkości skonstruowanym w oparciu o maksymal-

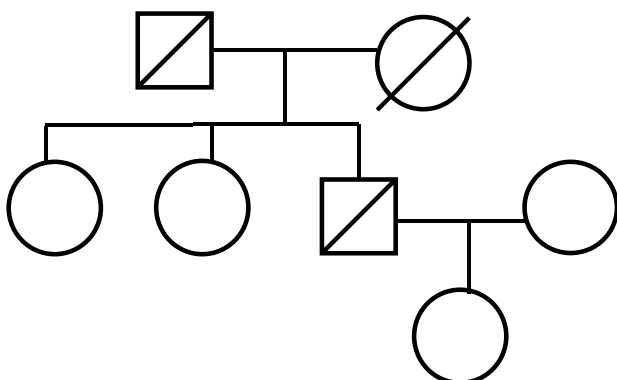
ny błąd pomiaru fragmentów DNA w pracowni (4.6%) [3]. Wartość dowodową badania ustalano obliczając wartość szansy ojcostwa [PI] wg Brennera [1] i wynikającą z niej wartość prawdopodobieństwa ojcostwa  $[W] = PI/PI+1$ .

## WYNIKI I OMÓWIENIE

W badanej sprawie zastosowano zestaw 7 markerów RFLP-SLP oraz 15 markerów STR do ustalenia ojcostwa nieżyjącego mężczyzny w oparciu o badanie genetyczne jego dwóch sióstr. Rodowód badanej rodziny zaprezentowano na rycinie 1.

Ryc.1. Rodowód w sprawie nietypowej, gdzie w miejsce pozwanego badano genotypy jego dwóch sióstr.

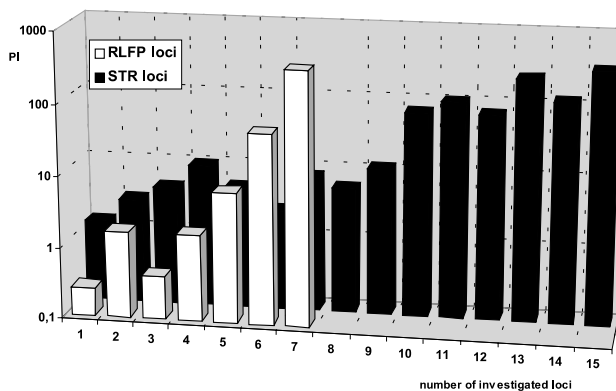
Fig.1. The pedigree in a deficiency case where, instead of the deceased father, the genotypes of his two sisters were investigated.



Statystyczna ocena wyników badań z zastosowaniem analizy RFLP i STR udowodniła ojcostwo pozwanego z prawdopodobieństwem przekraczającym 99.999% ( $PI > 100\ 000$ ). W obrębie 5 badanych markerów RFLP-SLP stwierdzono występowanie u dziecka wysoce informatywnych alleli (o częstości 0.01-0.065) wspólnych z jedną i/lub drugą siostrą pozwanego. Łączna analiza 7 układów RFLP-SLP wykazała wartość prawdopodobieństwa ojcostwa 99.72% ( $PI=360.37$ ). Analogiczne wartości wskaźników ojcostwa ( $W=99.70\%$ ,  $PI=335.42$ ) uzyskano po badaniu 15 markerów typu STR. Porównanie łącznych wartości PI dla analizy markerów RFLP i STR przedstawiono na rycinie 2.

Ryc. 2. Porównanie łącznych wartości szansy ojcostwa (PI) w sprawie niepełnej dla analiz RFLP i STR.

Fig. 2. A comparison of a combined value of paternity (PI) index in the deficiency case for RFLP and STR analysis.



## DYSKUSJA

Badanie ojcostwa w sprawach, kiedy nie dysponujemy profilem genetycznym pozwanego przeprowadzane jest na podstawie badań jego rodziny. Z najbardziej komfortową sytuacją mamy do czynienia wtedy, gdy żyją oboje biologiczni rodzice pozwanego. Znacznie trudniej jest opiniować w sytuacji, kiedy dostępne badaniu jest jedynie rodzeństwo pozwanego i/lub inne jego dzieci [8]. Kluczowa jest tutaj ilość badanych członków rodziny jak i stopień pokrewieństwa badanych względem pozwanego. Z reguły odpowiednio szeroki i dobrze dobrany zestaw markerów genetycznych, jak i właściwie przeprowadzona statystyczna ocena wartości dowodowej badania, pozwala na rozstrzygnięcie kwestii ojcostwa, choć pozostaje niewielki odsetek spraw nie rozstrzygniętych [4]. W tego typu sprawach niezwykle cenne są minisatelitarne markery, charakteryzujące się znacznie wyższym stopniem zmienności w porównaniu do markerów typu STR [2].

W przedstawionej sprawie dochodzenia ojcostwa zastosowano łącznie analizę RFLP i STR do ustalenia kwestii ojcostwa nieżyjącego pozwanego w oparciu o badanie jego dwóch sióstr. Uzyskanie w tej sprawie wartości prawdopodobieństwa ojcostwa powyżej 99.999% ( $PI > 100\ 000$ ), odpowiadającej krajowym standardom (<http://www.forensic.z.pl>), było możliwe po zbadaniu 15 układów STR oraz 7 układów RFLP-SLP, przy czym wartości szansy ojcostwa dla obu pakietów były równoważne tj.  $7SLP = 15STR$ . Wysoka zmienność układów minisatelitarnych została wykorzystana również w innej

analizie przeprowadzonej w oparciu o badanie rodziny pozwanego. Zbliżone wartości wskaźników ojcostwa uzyskano tu po badaniu 20 markerów typu STR oraz 6 markerów RFLP-SLP [dane nie publikowane]. Znaczną przewagę wartości dowodowej parametrów ojcostwa w analizie regionów minisatelitarnych nad analizą regionów mikrosatelitarnych tj. 6 SLP = 16 STR udokumentował wcześniej Thompson [9].

Należy przy tym podkreślić, że binowanie fragmentów restrykcyjnych do oceny statystycznej znacznie obniża faktyczne wartości parametrów polimorfizmu tych markerów, co wykazano w oparciu o analizę teoretycznej i empirycznej siły wyłączenia [3].

Własne badania w aspekcie ustalania ojcostwa z zastosowaniem różnych wysoce zmiennych markerów minisatelitarnych potwierdziły obserwacje Henke'ego i wsp. [2], iż dwie zgodności w analizie tych układów, ujawnione między badanymi osobami, świadczą o genetycznym pokrewieństwie tych osób. Dlatego też obecność 5 wspólnych wysoce polimorficznych fragmentów restrykcyjnych u dziecka i sióstr pozwanego w analizowanej sprawie dała biegłemu dodatkowy komfort opiniowania towarzyszący statystycznej ocenie wartości prawdopodobieństwa ojcostwa.

## WNIOSKI

Fakt uzyskiwania znacznie wyższych wartości parametrów dowodowych ekspertyzy w oparciu o analizę markerów oznaczanych techniką RFLP-SLP w porównaniu do markerów STR oraz komfort opiniowania wynikający z oceny segregacji wysoce polimorficznych fragmentów restrykcyjnych między badanymi osobami, uzasadniają potrzebę utrzymania tych markerów w zakresie badawczym pracowni genetyki sądowej, jako niezwykle przydatnych do rozstrzygania najtrudniejszych spraw w analizie pokrewieństwa.

## PIŚMIENNICTWO

1. Brenner C.H.: Symbolic kinship program. *Genetics*. 1997, 145, 535-542.
2. Henke L., Fimmers R.: Usefulness of conventional blood groups, DNA- minisatellites, and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. *Forensic Sci. Int.*, 103, 1999, 133-142.
3. Jacewicz R.: Polimorfizm DNA trzech systemów VNTR: D7S21, D12S11, D5S110 w populacji Polski centralnej i jego wykorzystanie w dochodzeniu ojcostwa. Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Bydgoszczy, Bydgoszcz 2001.
4. Jobim L. F., Jobim M. R.: Paternity testing analysis – allelic distribution, heterozygosity and power of exclusion of commonly used SLPs and STRs in the Brazilian Caucasoid population. *Prog. Forensic Genet.*, 9, 2003, 213-218.
5. Koziół P., Krajka A.: Analiza statystyczna wyników badań genetycznych przy ustalaniu ojcostwa w przypadku rekonstrukcji genotypu pozwanego. *Arch. Med. Sądowej Krym.*, 50, 2000, 267-276.
6. Lahiri D. K., Nurnberger Jr. J. I.: A rapid non enzymatic method for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 5444.
7. Lee J.W., Lee H-S.: Paternity determination when the alleged father's genotypes are unavailable. *Forensic Sci. Int.*, 123, 2001, 202-210.
8. Słomski R., Dziechciowska K.: Dochodzenie spornego ojcostwa na podstawie analizy DNA po śmierci ojca lub matki. *Arch. Med. Sądowej Krym.*, 47, 1997, 307-314.
9. Thomson J. A., Ayres K. L.: Analysis of disputed single-parent/child and sibling relationships using 16 STR loci. *Int. J. Legal Med.*, 2001, 115, 128-134.

Adres pierwszego autora:  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Sędziowska 18a  
91-304 Łódź  
e-mail: [r.jacewicz@post.pl](mailto:r.jacewicz@post.pl)