

Tabela II. Statystyczne parametry przydatności 10 badanych loci w medycynie sądowej

Table II. Statistical parameters of the usefulness of 10 loci in forensic medicine

System	PM	ME	PE	DP	He	Ho
D3S1358	0.3521	0.5334	0.6307	0.9245	0.794769	0.838235
vWA	0.3550	0.5653	0.6599	0.9369	0.812405	0.794118
D16S539	0.3478	0.4811	0.5718	0.8969	0.751872	0.727941
D2S1338	0.3616	0.6837	0.7622	0.9703	0.874376	0.838235
D8S1179	0.3551	0.5750	0.6593	0.9380	0.808417	0.852941
D21S11	0.3595	0.6350	0.7187	0.9578	0.847867	0.830882
D18S51	0.3612	0.6851	0.7646	0.9706	0.876438	0.875000
D19S433	0.3527	0.5512	0.6357	0.9288	0.791757	0.801471
TH01	0.3500	0.5140	0.6039	0.9138	0.774148	0.801471
FGA	0.3615	0.6897	0.7683	0.9715	0.878636	0.860294
Razem Total	0.987664641	0.999889940	0.999990354	1.000000000	0.821068	0.822059

PIŚMIENNICTWO

1. Drobnic K., Regent A., Budowle B.: STR data for the AmpFISTR SGM plus from Slovenia. *Forensic Sci. Inter.* 2001, 115, 107-109 -2. Lahiri D.K., Bye S., Numberger J.I., Hodes M.E., Crisp M.: A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1992, 25, 193-205 -3. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Jezierski G., Maciejewska A., Paszkowska R., Reichert M.: Genetyka populacyjna dziewięciu loci typu STR z zestawu Profiler Plus w próbkę populacyjnej z obszaru Polski. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2000, L, 207-213 -4. Turowska B., Sanak M., Opolska-Bogusz B.: Częstość alleli układów STR: LPL, F13B i HPRTB w populacji Polski Południowej. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1999, 49, 149-152

Adres pierwszego autora:
Katedra Medycyny Sądowej CM UJ
ul. Grzegorzewska 16
30-531 Kraków

Agnieszka Maciejewska*, Ryszard Pawłowski****

Wpływ metody izolacji DNA na stosunek wysokości alleli X i Y genu *amelogeniny* systemu Profiler Plus

Influence of DNA isolation methods on amelogenin X and Y allele ratios of the ProfilerPlus kit

* Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM
" Z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie
Dyrektor: Aleksander Głazek

Celem pracy było zbadanie wpływu metody izolacji DNA oraz warunków elektroforezy kapilarnej na stosunek alleli X i Y *amelogeniny*. Analiza stosunku wysokości alleli X i Y genu *amelogeniny* przy użyciu trzech różnych metod izolacji wykazała, iż metoda fenol-chloroform daje najbardziej zróżnicowane relacje wysokości tych alleli. Jedynie dla tej metody stwierdzono skrajny przypadek, gdzie stosunek obu alleli był niższy od 60%. Dla pozostałych dwóch metod izolacji, minimalny stosunek obu alleli nie spadał poniżej 79%. Analizując profile DNA w aspekcie istnienia potencjalnej mieszaniny należy zwrócić uwagę na rodzaj zastosowanej metody izolacji DNA.

The main aim of our study was the analysis of the influence of DNA isolation methods and capillary electrophoresis conditions on the ratio of amelogenin alleles. Three different DNA isolation methods were compared (phenol-chlorophorm (F-CH), Chelex and Blood DNA prep Plus). It was shown that the phenol-chlorophorm method gives the highest differences between X and Y allele ratios. It was observed that using the F-CH method it is possible to obtain a very low Y:X ratio (below 60%). In the case of two other methods the X:Y ratio was not lower than 79%. It was found that allele ratios of heterozygotes depend on the isolation DNA method used.

Słowa kluczowe: ProfilerPlus, mieszaniny DNA, zasady TWGDAM, metody izolacji DNA

Key words: ProfilerPlus, DNA mixtures, TWGDAM rules, DNA isolation methods

WSTĘP

Wśród wielu opracowanych modyfikacji metody PCR szczególnie przydatna do badania śladów biologicznych okazała się reakcja kompleksowego PCR, której głównymi zaletami są: możliwość uzyskania w krótkim czasie dużej liczby informacji o badanym DNA oraz zmniejszenie zużycia matrycowego DNA. Do badań identyfikacyjnych w genetyce sądowej systemu kompleksowego PCR stosowane są od 1993 r. Pierwszym takim systemem wprowadzonym do praktyki medyczno-sądowej był quadplex zawierający loci: TC11, VWA, F13A i FES (4, 5). W 1997 r. opracowano dekaplex AmpFLSTR Profiler Plus (9). Zgodnie z zaleceniami amerykańskiego TWGDAM każdy system wprowadzony do praktyki medyczno-sądowej wymaga szczegółowego zweryfikowania jego przydatności oraz poznania czynników wpływających na jego wiarygodność i niezawodność (10). Ponieważ w praktyce medyczno-sądowej materiał badawczy stanowią często ślady biologiczne będące mieszaninami DNA, dlatego też, do jednych z głównych zasad TWGDAM należy między innymi poznanie zakresu w jakim mieszczą się wysokości „stutterów” w stosunku do wysokości właściwych alleli loci badanego systemu oraz wzajemne stosunki alleli heterozygot, w tym również stosunek allela Y do X genu *amelogeniny* (1, 7, 11). Poznanie zakresu tych wartości pozwoli na prawidłową interpretację mieszanych plam biologicznych. Zakres wysokości frakcji „stutter” w stosunku do wysokości właściwych alleli loci systemu Profiler Plus przedstawiono we wcześniejszej publikacji (8).

MATERIAŁY I METODY

Plamy doświadczalne

Trzydzieści doświadczalnych plam krwi (pobranej od jednego mężczyzny) sporządzono na czystej, wygotowanej bawełnie. Plamy do momentu badania przechowywano przez 1 tydzień w temperaturze i wilgotności pokojowej.

Izolacja i pomiar ilości DNA

Izolację DNA z doświadczalnych plam krwi prowadzono metodą fenol - chloroform (F/CH) (13), Chelex-100 (12) i Blood DNA Prep Plus (A@A Biotechnology, Gdańsk) izolując każdą z nich po 10 plam krwawych. Ilość DNA w badanych próbkach oznaczano metodą hybrydizacji z sondą swoistą dla ludzkiego DNA (O quantiBlot, Applied Biosystems, USA) z zastosowaniem chemiluminescencyjnej metody detekcji (ECL, Amersham).

Amplifikacja i detekcja produktów systemu Profiler Plus

Amplifikację *locus amelogeniny* wchodzącego w skład zestawu Profiler Plus oraz rozdział produktów PCR prowadzono na automatycznym sekwenatorze

DNA ABI310 (Applied Biosystems, USA) w warunkach opisanych uprzednio (8). Do amplifikacji używano optymalnego stężenia DNA (1,25ng DNA /25uL mieszaniny PCR).

Analiza stosunku wielkości alleli X i Y w elektroforegramach

Analizie poddano po 10 elektroforegramów otrzymanych dla każdej metody izolacji badając stosunki alleli X i Y *amelogeniny*. Analizę przeprowadzano zarówno mierząc stosunek wysokości, jak i stosunek pól obu alleli, nie stwierdzając znamienych różnic. Stosunek alleli wyrażano procentowo przyjmując za 100% wysokość wyższego allela.

Badanie precyzji metody

Ten sam produkt PCR (10uL) mieszało się z 120uL dejonizowanego formamidu oraz 10uL standardu wewnętrznego (GS500 ROX), a następnie rozdzielono na 10 próbek, zdenaturowano i każdą z nich poddano rozdziałowi na tej samej kapilarze i w tych samych warunkach (każdą próbkę nastrzykiwano na kapilarę przez 5 sekund). Analizując wyniki obliczono średni stosunek wysokości alleli X i Y oraz rozrzut (SD) stosując arkusz kalkulacyjny Excel 8.

Badanie wpływu czasu nastrzyku próbki na stosunek alleli X i Y *amelogeniny*

7uL tego samego produktu PCR mieszało się z 84uL dejonizowanego formamidu oraz z 7uL standardu wewnętrznego (GS500 ROX). Następnie mieszaninę rozdzielono na 7 próbek i po denaturacji każdą z nich nastrzyknięto na tą samą kapilarę przy różnych czasach elektrokinetycznego pobrania próbki (od 3 do 9 sekund).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wraz z zastosowaniem technik badania DNA, a szczególnie PCR, wielokrotnie wzrosła liczba mieszanin wykrywanych w śladach biologicznych. Prawidłowa analiza mieszanych profili DNA wymaga między innymi poznania zakresu różnic w wysokościach alleli heterozygot. Przyjmuje się, że jeżeli wysokość frakcji typu „stutter” (n-4) przekracza 15 % wysokości głównego allela i/lub stosunek wysokości alleli dla heterozygoty jest mniejszy niż 70%, prawdopodobne jest, że badana próbka jest mieszaniną DNA (1,2,3,11).

Z naszych wstępnych obserwacji laboratoryjnych wynika, iż stosunek wysokości alleli w heterozygotie dla próbek nie będących mieszaninami DNA, może zależeć między innymi od rodzaju użytej metody izolacji DNA. Aby potwierdzić lub obalić przypuszczenie wykonano serię doświadczeń pozwalających na zweryfikowanie czy istotnie rodzaj metody izolacji DNA ma znamieny wpływ na stosunek wysokości alleli heterozygot.

Wpływ metody izolacji DNA na stosunek wysokości alleli X i Y genu *amelogeniny*

W celu zbadania wpływu rodzaju metody na stosunek alleli X i Y *amelogeniny*, po 10 identycznych plam krwi mężczyzny poddano izolacji metodą fenol-chloroform, metodą Chelex-100 i Blood DNA Prep Plus a następnie amplifikacji z zastosowaniem zestawu ProfilerPlus. Produkty PCR po rozdziale na automatycznym sekwenatorze DNA ABI310 poddano ilościowej analizie, badając stosunek alleli X i Y *amelogeniny*. Tabela I przedstawia zestawienie obserwowanych stosunków wysokości alleli *amelogeniny* w zależności od użytej metody izolacji DNA.

Tabela I. Porównanie stosunków alleli X i Y genu *amelogeniny* amplifikowanego z DNA wyizolowanego z plam krwi trzema różnymi metodami.

Table I. Comparison of amelogenine allele ratios amplified from DNA isolated using 3 different methods

Metoda izolacji DNA (DNA isolation method)	Stosunek wysokości X: Y przy silniejszej amplifikacji allela X (X:Y allele ratios for higher amplification of the X allele)		
	Średnia wysokość (average height ratio) Y/X (%)	Minimalna wysokość (minimal height ratio) Y/X (%)	Maksymalna wysokość (maximal height ratio) Y/X (%)
FENOL- CHLOROFORM (PHENOL- CHLOROPHORM)	77, 37	59, 80	96, 20
CHELEX-100	88, 60	79, 20	99, 60
BLOOD DNA PREP PLUS	93, 0	79, 70	99, 30
Stosunek wysokości X: Y przy silniejszej amplifikacji allela Y (X:Y allele ratios for higher amplification of the Y allele)			
	Średnia wysokość (average height ratio) X/Y (%)	Minimalna wysokość (minimal height ratio) X/Y (%)	Maksymalna wysokość (maximal height ratio) X/Y (%)
FENOL- CHLOROFORM (PHENOL- CHLOROPHORM)	89, 72	76,70	99, 60
CHELEX-100	N.O.	N.O.	N.O.
BLOOD DNA PREP PLUS	98, 0	98, 10	98, 30

Legenda: N.O. - nie obserwowano, (not observed)

Przy zastosowaniu metody fenol-chloroform obserwowano zarówno silniejszą amplifikację allela X od Y (6/10), jak i sytuację odwrotną (4/10). Minimalna procentowa wysokość allela Y nie stanowiła mniej niż 59,8% wysokości allela X. W odwrotnej sytuacji (4/10), gdy sygnał amplifikacyjny X był niższy od allela Y minimalna procentowa wysokość allela X nie stanowiła mniej niż 76,7%. Średnia wartość Y/X dla metody fenol-chloroform wynosiła 86,2%.

Dla metody Blood DNA Prep Plus również obserwowano silniejszą amplifikację allela X od Y (7/10), jak i sytuację odwrotną (3/10). Minimalna procentowa wysokość allela Y nie stanowiła mniej niż 79,7% wysokości allela X. W odwrotnej sytuacji (3/10), gdy sygnał amplifikacyjny X był niższy od allela Y minimalna procentowa wysokość allela X nie stanowiła mniej niż 98,10%. Średnia wartość Y/X dla metody Blood DNA Prep Plus wynosiła 96,4%.

W przypadku zastosowania Chelex-100, jako metody ekstrakcji DNA, obserwowano jedynie silniejszą amplifikację allela X od Y. Jego minimalna procentowa wysokość nie stanowiła mniej niż 79,2% wysokości allela X. Średnia wartość stosunku Y/X dla metody Chelex-100 wynosiła 88,6% i była zbliżona do wartości uzyskanej przez Lafautaina i wsp. (6) dla alleli X i Y genu *amelogeniny* wchodzącego w skład zestawu Green I (Applera, USA).

Teoretycznie, ze względu na małą różnicę w wielkości alleli X i Y *amelogeniny* (104pz, 109pz), proporcja ich sygnałów amplifikacyjnych powinna być zbliżona do 1:1. Pomimo niewielkiej różnicy w długości powielanych alleli obserwowano, w zależności od użytej metody, nie tylko przypadki preferencyjnej amplifikacji allela X ale również i sytuację odwrotną (Y>X). Porównanie trzech metod izolacji DNA (F/Ch, Chelex-100, Blood DNA Prep Plus) wykazało, że największe różnice w sygnałach amplifikacyjnych obu alleli *amelogeniny* daje metoda fenol-chloroform a najbardziej zbalansowane sygnały amplifikacyjne uzyskiwano dla metody Blood DNA Prep Plus. W związku z tym powinna być ona stosowana w sytuacjach, gdy szczególnie istotne jest wiarygodne określenie stosunku X:Y.

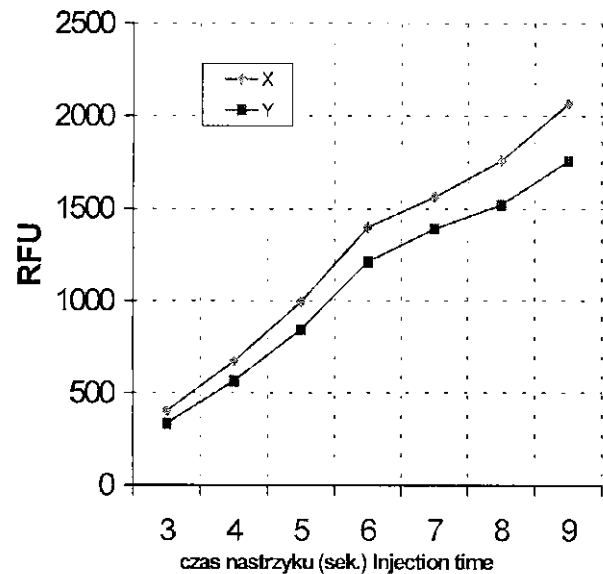
Aby właściwie zinterpretować uzyskane wyniki określono rozrzut metody (precyzję). W tym celu 10-krotnie nastrzyknięto na kapilarę ten sam produkt PCR. W wyniku stosownych obliczeń stwierdzono, że odchylenie standardowe dla stosunku X:Y tej analizy wynosi 0.0499 (4.99%). Tym samym oznacza to, iż można uznać średnie stosunki X:Y dla metody fenol-chloroform i dla metody Blood DNA Prep jako znamienne różne. Z tego też powodu interpretując mieszane profile DNA należy brać pod uwagę rodzaj metody użytej do wyizolowania DNA, gdyż jak pokazano wzajemne relacje alleli wyraźnie zależą od zastosowanej metody ekstrakcji. Wzajemne porównania pozostałych metod nie pozwala na wyciągnięcie znamienych statystycznie wniosków. Najbardziej zrównoważone stosunki alleli X:Y uzyskiwano izolując DNA metodą Blood DNA Prep plus. Jednak, tak jak i inne metody, daje ona w zależności od rodzaju badanych śladów mniej lub bardziej zadawalające wyniki.

Nieznana jest przyczyna tego rodzaju różnic stosunku X:Y. Nie należy jednak oczekiwać, iż powodem tego może być różnica wielkości (6pz) lub sekwencji alleli (homologia ponad 90%).

Inną, istotną rzeczą jest fakt zaobserwowania dla metody F-CH stosunku alleli Y:X poniżej 60%, co dla próbki DNA nie będącej mieszaniną jest zjawiskiem dotychczas nie obserwowanym.

Badanie wpływu czasu nastryku próbki oraz zakresu rozrzutu elektroforezy kapilarnej

W celu zbadania na ile czas nastryku próbki na kapilarę ma wpływ na stosunek wysokości alleli X i Y, ten sam produkt PCR nastrykiwano na kapilarę przez różny czas w zakresie od 3 do 9 sekund. Rycina 1 przedstawia uzyskaną zależność.



Ryc. 1. Wpływ czasu nastryku próbki na stosunek sekwencji Y/X genu *amelogeniny*

RFU - względne jednostki fluorescencji

Fig. 1. Influence of the injection time on *amelogenin* Y:X allele ratio
RFU - relative fluorescence units

Stwierdzono, że wraz ze zwiększeniem czasu nastryku wzrastał sygnał amplifikacyjny zarówno dla allele X i Y nie prowadząc do znamienych zmian stosunku Y/X genu *amelogeniny* (Y/X dla 3 sek.: 83%, dla 9 sek.: 85%). Największą różnicę zaobserwowano dla 3 i 4 sekund nastryku (83%) a najmniejszą dla 7 sekund. Różnice te nie są jednak znamienne statystycznie (SD = ± 4.99%).

Reasumując można stwierdzić, iż na wzajemny stosunek alleli heterozygot ma wpływ rodzaj zastosowanej metody izolacji DNA, co tym samym może

rzutować na prawidłową interpretację profilu DNA. Nie stwierdzono znamienych statystycznie różnic stosunku alleli X i Y *amelogeniny* w zależności od czasu nastryku próbki na kapilarę.

PIŚMIENNICTWO

I. Gili P., Sparkes R., Kimpton C: Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex systems. *Forensic Science International.*, 1997, 89, 185-197. -2. Gili P., Sparkes B., Buckleton J. S.: Interpretation of simple mixtures of when artifacts such as stutters are present- with special reference to multiplex STRs used by the Forensic Science service. *Forensic Science International.*, 1998, 95, 213-224. -3. Gili P., Sparkes R., Pinchin R., Clayton T., Whitaker J., Buckleton J.: Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Science International.*, 1998, 91, 41-53. -4. Kimpton C. P., i wsp.: Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Meth. Appl.*, 1993, 3, 13-22. -5. Kimpton C. P., Fisher D., Watson S., Adams M., Urquhart A., Lygo J. E., Gili P.: Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex of four tetrameric STR loci. *Int J Leg Med.*, 1994, 106, 302-311. -6. LaFoutain M., Schwartz M., Cormier J., Buel E.: Validation of Capillary Electrophoresis for Analysis of the homologous *Amelogenin* Gene. *Journal Forensic Sci.*, 1998, 43, 1188-1194. -7. Lygo J. E., Johnson P. E., Holdaway D. J., Woodroffe S., Whitaker J. P., Clayton T. M., Kimpton C. P., Gili P.: The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Leg Med.*, 1994, 107, 77-89. -8. Pawłowski R., Maciejewska A.: Forensic validation of a multiplex containing nine STRs- population genetics in Northern Poland. *Int J Leg Med.*, 2000, 114, 45-49. -9. Perkin Elmer. Applied Biosystem.: User's manual, AmpFISTR Profiler Plus, PCR Amplification Kit., 1997. -10. Technical Working Group on DNA Analysis Methods.: Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest.*, 1995, 22, 21-43.

11. Wallin J. M., Walsh P. S., Buonocristiani R., Lazaruk K. D., Fildes N., Holt C. L.: TWGDAM Validation of the AmpFISTR Blue PCR Amplification Kit for Forensic Casework Analysis. *J Forensic Sci.*, 1998, 43, 854-870. -12. Walsh S., Metzger D. A., Higuchi R.: Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *Biotechniques.*, 1991, 10, 506-513. -13. Wiegand P., Schurenkamp M., Schutte U.: DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. *Int. J Leg Med.*, 1992, 104, 359-360.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
80-210 Gdańsk
ul. Curie-Skłodowskiej 3A