

Kornelia Drożdżiak, Jadwiga Kabiesz

Obserwacje nad możliwością identyfikacji polimorfizmu DNA w plamach biologicznych mieszanych

Research on DNA polymorphism in mixed biological traces

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: dr hab. Zofia Olszowy

W pracy przedstawiono wyniki badań polimorfizmu DNA typu VNTR-PCR w zakresie trzech loci systemów STR. Oznaczano profile genetyczne w plamach doświadczalnych sporządzonych z krwi pochodzącej od dwóch lub trzech osób, wymieszanych w proporcjach od 1:1 do 1:100. Obecność poszczególnych genotypów w plamach mieszanych wykazano w rozcieńczeniach od 1:1 do 1:60. Mniejsza domieszka DNA w plamie mieszanej manifestuje się słabszym wybarwieniem na elektroforegramie. W przypadku rozcieńczenia – 1:70 prawidłowe genotypowanie plam mieszanych było niemożliwe z uwagi na zanikanie prążków. W pracy przedstawiono także wyniki uzyskane z identyfikacji śladów pochodzących z przestępstw na tle seksualnym, w których DNA było wymieszane.

The authors present the results of VNTR-PCR DNA polymorphism of three STR loci. Gene profiles were determined in experimental spots of blood from 2 or 3 unrelated individuals mixed in the ratios 1:1-1:100. Genotypes were successfully determined in mixed blood spot samples of ratios 1:1-1:60. A small amount of DNA in all those samples manifested a light electrophoretic staining. The electrophoretic band disappearance in the mixed blood spot samples of high dilution (<1:70) did not allow for determination of their genotypes. In the paper the results obtained while identifying biological traces from sexual offences in which mixed DNA occurred have been also presented.

Słowa kluczowe: próbki biologiczne, krwawe plamy mieszane, układy STR-owe, Silver STR Multiplex
Key words: biological samples, the mixture of bloodstains, STR systems, Silver STR Multiplex

WSTĘP

W Katedrze Medycyny Sądowej ŚAM rocznie wykonywanych jest około 1500 badań śladów biologicznych. Uzyskiwane w części ekspertyz wyniki wskazują, że w badanej próbce znajduje się DNA pochodzące od więcej niż jednej osoby. Dotyczy to zwłaszcza przestępstw na tle seksualnym, budzących wiele wątpliwości w opiniowaniu i orzekaniu. Wątpliwości te wynikają z pojawiania się więcej niż dwóch prążków o różnej intensywności. W praktyce przedmiotem naszych badań są ślady powstałe po wymieszaniu materiału biologicznego od różnych osób. W literaturze światowej tylko nieliczne prace informują o możliwościach wykrywania w zabezpieczonych plamach genotypów od więcej niż jednego osobnika pomimo występowania dysproporcji ilościowych w obrębie poszczególnych materiałów [3, 5]. Trudności interpretacyjne na jakie napotykamy w takich przypadkach skłoniły nas do przeprowadzenia badań doświadczalnych.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał do badań doświadczalnych stanowiły plamy sporządzone z mieszaniny krwi pobranej od dwóch lub trzech osób. Krew była mieszana w różnych proporcjach.

Z suchych plam izolowano DNA zestawem do izolacji DNA – Blood DNA Prep Plus firmy A&A Biotechnology. Amplifikację wykonywano metodą PCR [1, 2] zgodnie z rekomendacją firmy Promega Cor-

poration, Madison, WI, USA odpowiednio dla różnych systemów STR [3]. Produkty amplifikacji PCR rozdzielano techniką elektroforezy wertykalnej w systemie buforowym, na żelu poliakrylamidowym GDG firmy Perkin Elmer. Barwienie elektroforegramów wykonywano metodą srebrową [2]. Allele określano porównując z „drabinami alleli” firmy Perkin Elmer [3].

WYNIKI BADAŃ

W tabelach I-III przedstawiono wyniki badań w trzech ekspertyzach sprawiających trudności orzecznicze w związku z pojawieniem się dodatkowych alleli lub zdecydowanie nierównomiernego ich wybarwienia, pomimo wykonanej lizy preferencyjnej.

Tabela I. Ekspertyza 1 – przestępstwo na tle seksualnym.

Table I. Investigation 1 – sexual offence.

Układ System	Podejrzany R. W. Suspect	Pokrzywdzona M. W. Victim	Pokrzywdzona A. D. Victim	Wymaz M. W. Swab	Wymaz A. D. Swab
PŁEĆ/SEX	XY	XX	XX	XX	XY
CSF1PO	11-12	9-11	10-13	9-11	10-13 <u>11-12</u>
TPOX	8-8	8-10	8-8	8-10	8-8
TH01	7-9	6-9	7-8	6-9	7-8 <u>9</u>
D16S539	9-9	9-14	9-13	9-14	9 <u>13</u>
D7S820	10-11	10-10	10-10	10-10	10 <u>11</u>
D13S317	9-11	9-12	8-12	9-12	8-12 <u>9-11</u>
F13B	8-12	8-10	6-9	8-10	6-9 <u>8-12</u>
VWA	15-16	17-17	15-18	17-17	15-18 <u>16</u>

Siła wybarwienia alleli:
standardowo
słabiej
bardzo słabo

Power of allele staining:
standard
weak
very weak

W tabeli I pokazano wyniki badań polimorfizmu DNA wymazów z dróg rodnych od pokrzywdzonych M. W. i A. D. oraz materiału porównawczego pobranego od pokrzywdzonych i podejrzanego R. W. Wyniki badań wykazały w wymazie od pokrzywdzonej A. D. obecność fragmentu genu amelogeniny charakterystycznego dla płci męskiej. Stwierdzenie w obrębie pięciu loci STR obecności trzech lub czterech alleli pozwoliło na wysunięcie wniosku, że materiał pochodzi od co najmniej dwóch osób i w tym przypadku mógł pochodzić od pokrzywdzonej A. D. i podejrzanego R. W. W wymazie od pokrzywdzonej M. W. stwierdzono tylko jej genotyp i fragment amelogeniny charakterystyczny dla płci żeńskiej.

W tabeli II przedstawiono wyniki badań polimorfizmu DNA z dowodu rzeczowego zabezpieczonego od pokrzywdzonej A. O. oraz materiału porów-

nawczego pobranego od pokrzywdzonej i dwóch podejrzanych L. P. i B. K. o dokonanie gwałtu zbiorowego. Badania dowodu rzeczowego od A. O. wykazały obecność fragmentu genu amelogeniny charakterystycznego dla płci męskiej. Stwierdzenie w obrębie pięciu loci STR obecności trzech lub czterech alleli pozwoliło na wysunięcie wniosku, że materiał pochodzi od co najmniej dwóch osób i w tym przypadku mógł pochodzić od pokrzywdzonej A. O. i podejrzanego B. K. W materiale biologicznym nie stwierdzono obecności alleli od podejrzanego L. P.

W tabeli III zaprezentowano wyniki badań polimorfizmu DNA wymazu z dróg rodnych od pokrzywdzonej M. K. i brudu z paznokci od podejrzanego H. G. oraz materiału porównawczego pobranego od pokrzywdzonej i podejrzanego. W wymazie od pokrzywdzonej M. K. i w materiale pobranym

Tabela II. Ekspertyza 2 – przestępstwo na tle seksualnym – gwałt zbiorowy.
Table II. Investigation 2 – sexual offence – group rape.

Układ System	Podejrzany L. P. Suspect	Podejrzany B. K. Suspect	Pokrzywdzona A. O. Victim	Dowód rzeczowy od A. O. Evidence from
PŁEĆ	XY	XY	XX	XY
CSF1PO	12-12	11-12	11-12	11-12
TPOX	8-11	8-9	8-8	8 9
TH01	6-9	9-9.3	6-8	6-8 9-9.3
D16S539	10-14	12-13	11-13	13 <u>11</u> 12
D7S820	10-10	10-11	8-14	8-14 <u>10-11</u>
D13S317	9-11	9-14	8-12	8-12 <u>9-14</u>
F13A01	3.2-7	4-5	4-5	4-5
VWA	15-16	17-20	15-17	15-17 20

Siła wybarwienia alleli:
standardowo
ślabiej
bardzo słabo

Power of allele staining:
standard
weak
very weak

Tabela III. Ekspertyza 3 – przestępstwo na tle seksualnym.
Table III. Investigation 3 – sexual offence.

Układ System	Podejrzany H. G. Suspect	Pokrzywdzona M. K. Victim	Wymaz M. K. Swab	Brud z za paznokci H. G. Nail mud
PŁEĆ SEX	XY	XX	<u>XY</u>	<u>XY</u>
CSF1PO	10-13	10-14	10 <u>13</u> 14	10 <u>13</u> 14
TPOX	9-11	8-9	9-11 8	9-11 8
TH01	7-9	6-9	9 <u>7</u> 6	9 <u>7</u> 6
D16S539	9-14	8-12	9-14 <u>8-12</u>	9-14 <u>8-12</u>
D7S820	10-12	10-10	10 12	10 12
D13S317	12-12	11-12	12 11	12 11
F13A01	3.2-5	5-7	3.2-5 7	3.2-5 7
FESFPS	10-11	11-12	11 10 <u>12</u>	11 10 <u>12</u>
VWA	15-16	14-18	15-16 14-18	15-16 14-18
F13B	8-10	6-9	8-10 <u>6-9</u>	8-10 <u>6-9</u>

Siła wybarwienia alleli:
standardowo
ślabiej
bardzo słabo

Power of allele staining:
standard
weak
very weak

zza paznokci od H. G. stwierdzono obecność fragmentu genu amelogeniny charakterystycznego dla płci męskiej. W obu materiałach biologicznych wykazano taki sam genotyp, w obrębie ośmiu loci STR – ujawniono obecność trzech lub czterech alleli. Ta-

kie wyniki badań pozwoliły na wysunięcie wniosków, że materiał pochodzi od co najmniej dwóch osób i w tym przypadku mógł pochodzić od pokrzywdzonej M. K. i podejrzanego H. G.

Tabela IV. Wyniki genotypowania mieszanin dwóch lub trzech krwi w 16 rozcieńczeniach w układzie Silver STR Multiplex.
Table IV. Gene typing results of 2 or 3 blood samples mixed in 16 different dilutions in the Silver STR Multiplex System.

Rozcieńczenie/ Układ Dilution/System	D16S539	D7S820	D13S317
Krew A Blood A	9-13	10-11	9-14
Krew B Blood B	9-9	10-10	9-11
Krew C Blood C	11-12	10-10	8-12
Mix A/B 1:1	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/C 1:1	9-11-12	10-11	8-9-12-14
Mix B/C 1:1	9-11-12-13	10-10	8-9-11-12
Mix A/B 1:2	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:3	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:4	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:5	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:10	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:15	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:20	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:25	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:30	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:40	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:50	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:60	9-13	10-11	9-11-14
Mix A/B 1:70	9-9	10-10	9-11
Mix A/B 1:80	9-9	10-10	9-11
Mix A/B 1:90	9-9	10-10	9-11
Mix A/B 1:100	9-9	10-10	9-11
Mix A/B/C 1:1:1	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:2:1	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:10:1	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:50:1	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:60:1	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:70:1	9-9	10-10	9-11
Mix A/B/C 1:1:2	9-11-12-13	10-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:1:10	9-11-12-13	11-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:1:50	9-11-12-13	11-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:1:60	9-11-12-13	11-11	8-9-11-12-14
Mix A/B/C 1:1:70	11-12	10-10	8-12

Siła wybarwienia alleli:
standardowo
stabilnie
bardzo słabo

Power of allele staining:
standard
weak
very weak

W tabeli IV zebrane zostały wyniki genotypowania mieszanin dwóch krwi w 17 rozcieńczeniach oraz przykładowe wyniki dla sporządzonych mieszanin trzech różnych krwi w pięciu wybranych rozcieńczeniach. W badaniach polimorfizmu DNA ujawniano genotypy od dwóch i trzech osób, a zwiększenie domieszki jednej z krwi spowodowało ujawnienie się zdecydowanie mocniej tegoż genotypu na niekorzyść genotypu krwi dodanej w znacznie mniejszej ilości. W rozcieńczeniu 1:70 nie ujawniano już obecności genotypu krwi, której w mieszaninie było mniej.

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania polimorfizmu DNA w plamach mieszanych sporządzonych celowo w stosunkach od 1:1 do 1:60 pozwoliły na ujawnienie wszystkich spodziewanych alleli.
2. Zmieszanie krwi w rozcieńczeniu 1:70 umożliwiło prawidłowe genotypowanie.
3. Trudności interpretacyjne występują w przypadkach gdy osobnicy posiadają przynajmniej jeden allel identyczny lub jedna z osób jest homozygotą.
4. Sekwencje mikrosatelitarne są przydatne w identyfikacji materiału wymieszanego.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen R. C., Graves G., Budowle B.: Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Bio Techniques* 1989, 7, 736.
2. Bassam B. J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M.: Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1991, 196, 80-83.
3. Mądro R., Monies D., Koziół P.: Identification of genetic markers in stains of blood mixtures. *Problems of Forensic Science* 1995, XXXII, 23-31.
4. Promega Corp. Gene Print™ STR Systems (Silver Stain Detection), Revised ed., June 1998.
5. Schmitt C., Schmutzler A., Prinz M., Staak M.: High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and short tandem repeats (STR) polymorphism. *Forensic Science International* 1994, 66, 129-141.