

Katarzyna Bąbol-Pokora, Adam Prośniak, Renata Jacewicz, Jarosław Berent

Przydatność markerów SNP do analiz materiału biologicznego o wysokim stopniu degradacji¹

The usefulness of SNP markers for analyses of highly degraded biological materials

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Berent

Najczęstszą przyczyną problemów związanych z analizą śladów biologicznych jest znaczna degradacja materiału. Standardowo stosowane układy STR mają zbyt długie amplikony do skutecznej analizy zdegradowanego DNA. W takich przypadkach dobrym rozwiązaniem jest zastosowanie markerów o znacznie krótszych amplikonach, czyli SNP. W prezentowanej pracy oceniono przydatność markerów SNP do identyfikacyjno-porównawczych analiz zdegradowanego materiału dowodowego w oparciu o specjalnie opracowany zestaw 5 loci SNP (rs2294067, rs2282160, rs2070764, rs2277216, rs1063739).

The most common cause of problems associated with analyzing DNA extracted from forensic samples is their high level of degradation. Such difficulties are caused by the fact that STR markers have too large amplicon sizes to be amplified in degraded DNA samples. Thus, it is necessary to employ more efficient markers for analyzing evidential samples. SNPs are ideal tools for such purposes, for the SNP genotyping method does not require large amplicon size, and thus increases the possibility of amplifying degraded DNA samples. Although single SNP is not polymorphic enough, we can obtain sufficient results by examining several SNPs. The aim of this study was to examine the usefulness of the SNP-pentaplex (rs2294067,

rs2282160, rs2070764, rs2277216, rs1063739) for forensic applications by analysing several forensic cases, which were impossible to solve in a range of STR markers because of highly degraded DNA. DNA fragments were amplified in one multiplex PCR reaction, which contained 5 primer pairs. SNPs were subsequently identified in a minisequencing reaction and gel electrophoresis in an ABI Prism 377 Sequencer. The research confirmed the usefulness of SNP-pentaplex for forensic applications. Despite employing mainly degraded and low copy number DNA, full genetic profiles were obtained in almost every sample. Although the discrimination power of SNP-pentaplex is not sufficient for obtaining adequate evidential value, it seems to be an ideal screening method for forensic applications.

Słowa kluczowe: SNP, minisekwencjonowanie, DNA zdegradowany, LCN DNA
Key words: SNP, minisequencing, degraded DNA, LCN DNA

WSTĘP

Najczęstszą przyczyną problemów związanych z analizą śladów biologicznych jest wysoki poziom degradacji badanego materiału.

¹ Temat opracowany w ramach prac własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502-11-373.

Powszechnie stosowane w genetyce sądowej metody oparte są na analizach wysoce polimorficznych układów typu STR. Markery STR, dostępne w komercyjnych zestawach, umożliwiających jednoczesną analizę kilkunastu loci, są doskonałym narzędziem w ustalaniu pokrewieństwa oraz identyfikacji śladów biologicznych w przypadku mało zdegradowanego materiału [1]. Niestety, materiałami dowodowymi bardzo często są zeskieletowane szczątki, preparaty archiwalne przechowywane w formalinie lub zatopione w parafinie czy ślady kontaktowe, zatem DNA jest zdegradowany lub występuje w śladowych ilościach (LCN-DNA). Ponadto zdarzają się dowody zniszczone lub zanieczyszczone z powodu złego przechowywania. To wszystko powoduje, że standardowe metody nie wystarczają do przeprowadzenia skutecznej analizy i często wymagają powtórek, generując niepotrzebne koszty [2, 3]. Przyjmuje się, że w przypadku DNA zdegradowanego, długości amplikonów markerów służących do jego identyfikacji powinny być mniejsze niż 150 pz. Podstawą tego twierdzenia jest fakt, że długość odcinka DNA owiniętego wokół nukleosomu wynosi ok. 150 pz. Istnieje hipoteza, że odcinek tej długości, dzięki tworzeniu wiązań kowalencyjnych z histonami, jest chroniony przed działaniem nukleaz i przez to mniej narażony na degradację [4].

Ponieważ przyczyną niepowodzeń w zastosowaniu układów STR do analiz zdegradowanego DNA są duże rozmiary ich amplikonów, tj.: 150-450 pz, rozwiązaniem problemu są markery SNP, które mają znacznie krótsze amplikony, dzięki czemu są bardziej skuteczne w analizach zdegradowanego DNA [3]. Markery SNP stanowią najbardziej liczną grupę polimorficznych markerów identyfikacji. Pomimo niskiego stopnia polimorfizmu posiadają one wiele zalet, dzięki którym są wykorzystywane w wielu dziedzinach, m.in. w medycynie, diagnostyce molekularnej czy farmakogenetyce [5-7]. SNP są także doskonałym narzędziem do identyfikacji osobniczej oraz badań pokrewieństwa, dzięki czemu są wykorzystywane w genetyce sądowej. Metody z ich użyciem są odpowiednie do analizy zdegradowanego materiału biologicznego i minimalizują problemy związane z analizą śladów biologicznych pochodzących z miejsc przestępstw [8, 9]. Jedną z takich metod jest minisekwencjonowanie, polegające na wydłużeniu startera o jeden nukleotyd komplementarny do badanego SNP. Przewaga tej metody nad klasycznymi badaniami z użyciem układów STR wynika zatem z faktu, że genotypowanie mar-

kerów SNP nie wymaga tak dużych rozmiarów amplikonów, jak to jest w przypadku markerów STR. Chociaż markery SNP nie są wysoce polimorficzne, analiza statystyczna z użyciem zestawu kilkudziesięciu SNP pozwala na uzyskanie podobnych wyników, co badanie kilkunastu układów typu STR [10, 11].

Celem prezentowanej pracy była ocena przydatności markerów SNP do identyfikacyjno-porównawczych analiz zdegradowanego materiału dowodowego w oparciu o zestaw 5 loci SNP, w zakresie którego opracowano wcześniej bazę populacyjną centralnej Polski obejmującą 500 alleli [12].

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki będące przedmiotem standardowych analiz identyfikacyjno-porównawczych przeprowadzanych w Katedrze Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi:

- materiał dowodowy w sprawie I stanowiły ślady z obuwia podejrzanego przechowywane w warunkach dużej wilgotności, natomiast materiał porównawczy – krew ofiary;
- materiałem dowodowym w sprawie II był wymaz z ostrza umytego noża – prawdopodobnego narzędzia zbrodni, natomiast materiałem porównawczym – krew ofiary.

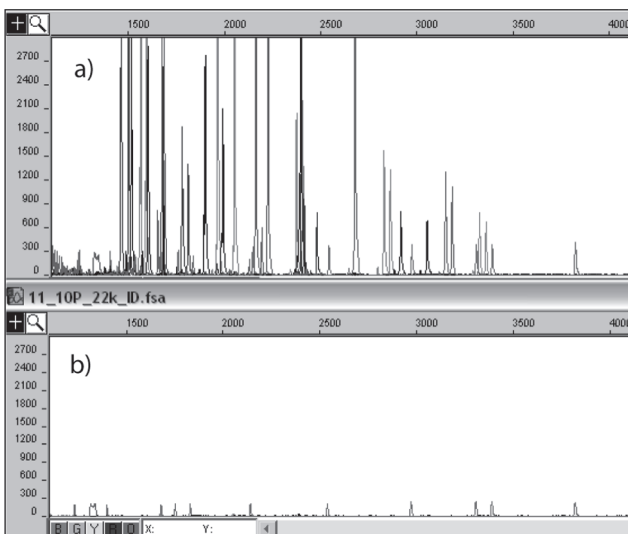
DNA wyizolowano metodą kolumnkową z zastosowaniem zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology). Multipleksowa reakcja amplifikacji została przeprowadzona z użyciem pięciu par starterów obejmujących następujące loci SNP: rs2294067, rs2282160, rs2070764, rs2277216, rs1063739 [13]. Amplikony wszystkich loci wchodzących w skład zestawu miały długości poniżej 150 pz, a mianowicie: 123 pz, 99 pz, 93 pz, 85 pz i 71 pz. Produkty PCR oczyszczono za pomocą zestawu kolumnienek ultrafiltracyjnych MiniElute® (Qiagen), a następnie poddano je reakcji minisekwencjonowania z użyciem zestawu ABI Prism® SNaPshot™ (Applied Biosystems) oraz pojedynczych starterów o różnej długości (27 nt – 56 nt). Produkty minisekwencjonowania oczyszczono z użyciem zestawu DyeEx® (Qiagen), po czym zostały one rozdzielone w poliakrylamidowym żelu denaturującym w sekwenatorze ABI Prism 377 z użyciem LIZ™ 120, jako wewnętrznego standardu wielkości. Analizę końcową przeprowadzono za pomocą programu Gene Scan™. Częstości genotypów obliczono przy użyciu programu DNASTat wersja 1.0 [14].

WYNIKI I DYSKUSJA

Opracowany zestaw został wykorzystany do analizy 2 spraw, niemożliwych do zgenotypowania metodą standardową, czyli z użyciem markerów STR, z powodu znacznej degradacji materiału dowodowego.

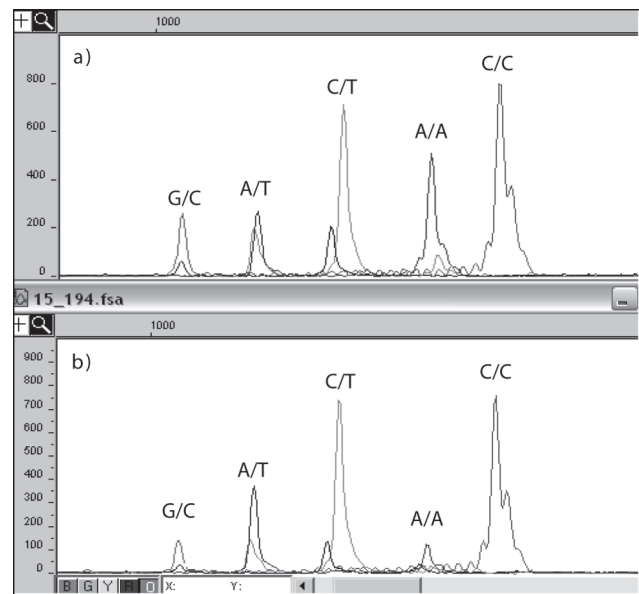
Sprawa I

Zadaniem biegłego było określenie, czy materiał, w postaci plamy na obuwiu podejrzanego, przechowywany w nieodpowiednich warunkach, pochodzi od ofiary przestępstwa. Standardowe badanie w zakresie 15 układów STR (zestaw Identifiler) nie dało odpowiedzi na to pytanie, gdyż wysoka degradacja materiału dowodowego uniemożliwiła identyfikację profilu genetycznego (ryc. 1). Materiał dowodowy oraz porównawczy zostały ponownie zanalizowane w zakresie pięciu loci SNP. Tym razem w obu przypadkach profil genetyczny był pełny i możliwy do identyfikacji. Ponadto profil uzyskany z analizy śladu był zgodny z profilem porównawczym w zakresie wszystkich 5 loci SNP (ryc. 2). Częstość profilu wyniosła $f_{\text{total}} = 0,0186$, co oznacza, że genotyp ten występuje u jednej na 54 osoby.



Ryc. 1. Wyniki genotypowania w sprawie I w zakresie 15 loci STR: a) krew porównawcza ofiary – profil pełny; b) materiał dowodowy – brak profilu.

Fig. 1. The genotyping results of Case I in a range of 15 STR loci: a) the full profile obtained in a reference sample; b) an evidential sample – lack of the genetic profile.



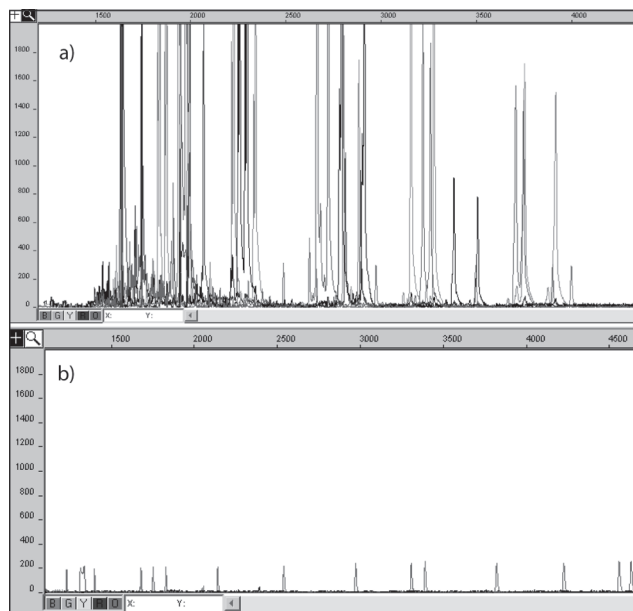
Ryc. 2. Wyniki analizy w sprawie I w zakresie 5 loci SNP: a) profil uzyskany z krwi porównawczej ofiary; b) identyczny profil uzyskany z materiału dowodowego.

Fig. 2. The genotyping results of Case I in a range of 5 SNP loci: a) the genetic profile obtained in the reference sample; b) an identical genetic profile obtained in the evidential sample.

Sprawa II

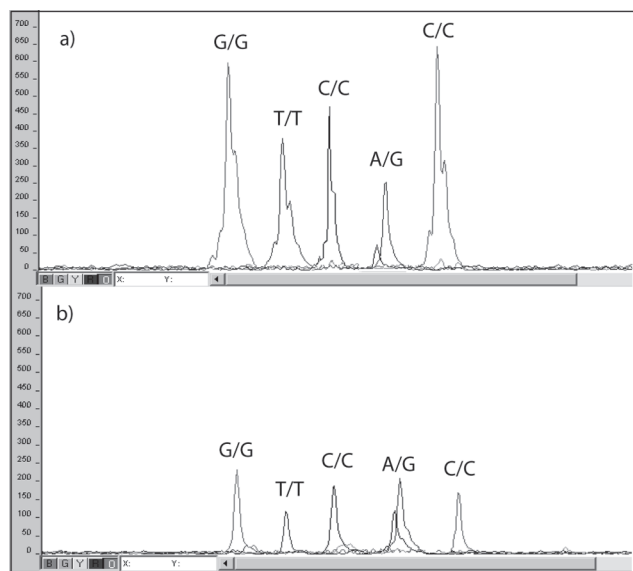
Kolejna sprawa dotyczyła zgonu kobiety z podejrzeniem udziału osób trzecich. Do biegłego należało sprawdzenie, czy na umyтым nożu, zabezpieczonym od męża denatki, są ślady krwi kobiety. Przeprowadzono analizę porównawczą wymazu z ostrza noża oraz krwi denatki w zakresie 15 markerów STR, jednakże w przypadku materiału dowodowego sygnał amplifikacji uzyskano jedynie dla 2 układów STR (ryc. 3), co uniemożliwiło wydanie opinii w tej sprawie. Materiał dowodowy i porównawczy został następnie przeanalizowany w oparciu o markery SNP. Profil uzyskany z wymazu był zgodny z profilem kobiety w zakresie wszystkich 5 loci SNP (ryc. 4). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono częstość profilu kobiety, która wyniosła: $f_{\text{total}} = 0,0074$. Znaczy to, że profil taki występuje średnio u jednej na 134 osoby.

Wyniki badań, przeprowadzone z użyciem zestawu 5 markerów SNP, świadczą jednoznacznie o jego przydatności do analizy zdegradowanego DNA. Choć zestaw 5 markerów SNP wydaje się być mało informatywnym narzędziem do analiz identyfikacyjno-porównawczych, to jednak nie aspekt siły dyskryminacji tego zestawu jest najważniejszy. Pentapleks SNP jest dosko-



Ryc. 3. Wyniki genotypowania w sprawie II w zakresie 15 loci STR: a) krew porównawcza ofiary – profil pełny; b) materiał dowodowy – profil częściowy.

Fig. 3. The genotyping results of Case II in a range of 15 STR loci: a) the full genetic profile obtained in the reference sample; b) a partial genetic profile obtained in the evidential sample.



Ryc. 4. Wyniki minisekwencjonowania w sprawie II w zakresie 5 loci SNP: a) profil uzyskany z krwi porównawczej ofiary; b) identyczny profil uzyskany z materiału dowodowego.

Fig. 4. The minisequencing results of Case II in a range of 5 SNP loci: a) the genetic profile obtained in the reference sample; b) an identical genetic profile obtained in the evidential sample.

nałym zestawem do badań przesiewowych, jedynym, jaki można zastosować do wysoce zdegradowanego DNA. Zestawy STR służące do badań przesiewowych, czyli o podobnej sile dyskryminacji, składające się z kilku markerów, np. CTT czy FFFL [15,16] nie nadają się do analizy DNA zdegradowanego. Tymczasem badania przeprowadzone z użyciem pentaplexu SNP dowodzą, że nawet, gdy DNA jest tak zdegradowany, że analiza za pomocą markerów STR nie daje żadnych wyników, w zakresie 5 SNP można uzyskać pełny profil genetyczny.

Oprócz SNP do badania zdegradowanego materiału biologicznego mogą także służyć tzw. miniSTR, czyli markery STR o skróconych amplikonach [17]. Są one bardziej przydatne do badań zdegradowanego DNA niż STR. MiniSTR mają jednak pewne ograniczenia, gdyż rozmiar amplikonu nie może być mniejszy niż długość sekwencji polimorficznej. Sekwencja ta, jak wiadomo, jest dłuższa w markerach bardziej polimorficznych, a więc krótsze markery będą miały niższą siłę dyskryminacji, podczas gdy te bardziej polimorficzne mogą być za długie, by amplifikacja powiodła się. W kilku ośrodkach badawczych na świecie przeprowadzono badania porównawcze markerów STR, miniSTR i SNP, aby zweryfikować, które z nich są bardziej przydatne do analiz zdegradowanego materiału dowodowego [3]. Z badań wynikało, że zarówno miniSTR, jak i SNP są o wiele bardziej przydatnymi markerami do analiz zdegradowanego materiału dowodowego niż STR. Nie wyjaśniono natomiast kwestii, które z tych dwóch typów są bardziej odpowiednie do analiz DNA zdegradowanego, ograniczając się do konkluzji, że nie zależy to od typu markera, a od długości amplikonu. Jednakże pewne różnice między nimi świadczą o tym, że należy je stosować w zależności od ilości i jakości badanego materiału. MiniSTR są odpowiednie do analizy mieszanin, co jest niestety niemożliwe w przypadku markerów SNP, ze względu na ich bialleliczny charakter. Natomiast do badań bardzo zdegradowanego materiału, np. pochodzącego od ofiar katastrof masowych, bardziej odpowiednie są markery SNP, dzięki temu, że są bardziej czułe i mają krótsze amplikony [18]. MiniSTR wymagają większych ilości DNA niż SNP, dlatego mogą być niewystarczające podczas analizy śladowych ilości DNA, co ma miejsce w przypadku śladów kontaktowych.

Markery SNP zyskują coraz większe znaczenie w dziedzinie genetyki sądowej. Pojawia się coraz więcej publikacji na temat nowych

możliwości, jakie daje analiza SNP, zarówno w przypadku zdegradowanego materiału dowodowego, jak i trudnych, mutacyjnych spraw o ustalenie ojcostwa. Wiele ośrodków w Europie i na świecie stosuje układy SNP do identyfikacji osobniczej. Powstaje coraz więcej zestawów służących do przeprowadzania takich analiz. Niektóre z nich składają się z niewielkiej liczby markerów, podobnie jak opisywany zestaw 5 układów SNP, a mianowicie: z 6 SNP [11], 8 SNP [19], czy 16 SNP [20]. Są jednak zestawy większe, składające się z 21 SNP [4], 24 markerów SNP [8], 35 SNP [21], 39 SNP [10], czy 52 markerów SNP [22], które z powodzeniem mogą służyć do kompleksowej analizy materiału dowodowego, a niektóre nawet do badań ojcostwa.

WNIOSKI

Opracowany zestaw 5 markerów SNP jest odpowiedni do badań przesiewowych dowodów rzeczowych, zwłaszcza w sprawach, gdzie materiał dowodowy jest zdegradowany i badanie w zakresie układów STR jest nieskuteczne.

PIŚMIENNICTWO

- Schneider P. M., Bender K., Mayr W. R. et al.: STR analysis of artificially degraded DNA - results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci. Int.* 2004, 139, 123-134.
- Gill P.: Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK – past, present and future perspectives. *Biotechniques* 2002, 32, 366-368.
- Dixon L. A., Dobbins A. E., Pulker H. K. et al.: Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs – results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci. Int.* 2006, 164(1), 33-44.
- Dixon L. A., Murray C. M., Archer E. J., Dobbins A. E., Koumi P., Gill P.: Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Sci. Int.* 2005, 154, 62-77.
- Lai E.: Application to SNP technologies in medicine: Lessons learned and future challenges. *Genome Res.* 2001, 11, 927-929.
- Gwee P. C., Tang K., Chua J. M. Z., Lee E. J. D., Chong S. S., Lee C. G. L.: Simultaneous genotyping of seven single nucleotide polymorphisms in the MDR1 gene by single-tube multiplex minisequencing. *Clin. Chem.* 2003, 49, 672-676.
- McCarthy J. J., Hilfiker R.: The use of SNP maps in pharmacogenomics. *Nat. Biotech.* 2000, 18, 505-508.
- Lee H. Y., Park M. J., Yoo J. E., Chung U., Han G. R., Shin K. J.: Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans. *Forensic Sci. Int.* 2005, 148, 107-112.
- Alonso A., Martin P., Albarran C. et al.: Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat. Med. J.* 2003, 44, 273-280.
- Inagaki S., Yamamoto Y., Doi Y. et al.: A new 39-plex analysis method for SNPs including 15 blood group loci. *Forensic Sci. Int.* 2004, 144, 45-57.
- Doi Y., Yamamoto Y., Inagaki S., Shigeta Y., Miyaishi S., Ishizu H.: A new method for ABO genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. *Legal Med.* 2004, 6, 213-223.
- Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J.: Baza 500 alleli SNP w populacji centralnej Polski. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2008 58(1), 27-31.
- Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J.: Pentapleks SNP – rozkład częstości alleli w populacji centralnej Polski. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2006, 56 (4), 228-231.
- Berent J.: DNASTat wersja 1.0 – program do obsługi bazy danych profili genetycznych oraz do obliczeń biostatystycznych. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2006 56 (1), 15-18 .
- Budowle B., Moretti T. R., Keys K. M., Koons B. W., Smerick J. B.: Validation studies of the CTT STR multiplex system. *J. Forensic Sci.* 1997, 42(4), 701-707.
- Micka K. A., Amriott E. A., Hockenberry T. L. et al.: TWGDAM validation of a nine-locus and a four-locus fluorescent STR multiplex system. *J. Forensic Sci.* 1999, 44(6), 1243-1257.
- Coble M. D., Butler J. M.: Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 2005, 50, 43-53.
- Gill P., Werrett D. J., Budowle B., Guerrieri R.: An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases – joint considerations of the DNA working group of the ENFSI and the SWGDAM. *Sci. Justice.* 2004, 44, 51-53.

19. Turchi C., Pesaresi M., Presciuttini S., Alessandrini F., Sassaroli C., Tagliabracci A.: Development and forensic applications of multiplex PCR of autosomal biallele polymorphism. *Prog. Forensic Genet.* 10, ICS 2004, 1261, 213-215.

20. Hiratsuka M., Tsukamoto N., Konno Y. et al.: Forensic assessment of 16 SNP analyzed by Hybridization Probe Assay. *Tohoku J. Exp. Med.* 2005, 207, 255-261.

21. Sanchez J., Børsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernandez A., Morling N.: Multiplex PCR and minisequencing of SNPs – a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci. Int.* 2003, 137, 74-84.

22. Sanchez J., Phillips C., Børsting C. et al.: A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006, 27, 1713-1724.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

ul. Sędziowska 18 a

91-304 Łódź

katarzyna.babol-pokora@umed.lodz.pl