

Jacek Drabik¹, Agata Jagiełło², Anna Niemcunowicz-Janica³, Witold Pepiński³

Walidacja i ocena przydatności zestawu pięciu markerów miniSTR w genetyce sądowej

Validation and evaluation of a five miniSTRs kit in forensic genetics

- ¹ Z Wydziału Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP w Warszawie
Naczelnik: mgr M. Kwietniewska
- ² Z Zakładu Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie
Kierownik: dr G. Płucienniczak
- ³ Z Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: dr hab. med. A. Niemcunowicz-Janica

Opracowany i zoptymalizowany nowy zestaw multipleksowy miniSTR zawiera *loci* D3S3053, D6S474, D9S2157, D20S482 oraz marker płci – amelogeninę. Startery użyte do amplifikacji *loci* miniSTR hybrydują do matrycy DNA w bezpośrednim sąsiedztwie regionu repetetywnego i generują amplikony o niskich masach cząsteczkowych (71-135 pz). Analiza wielkości produktów odbywa się w oparciu o system automatycznej detekcji a allele definiowane są na podstawie wewnętrznego standardu wielkości. Minimalna ilość DNA niezbędna do uzyskania pełnego profilu genetycznego wynosi 250 pg. Udowodniono specyficzność gatunkową i stabilność somatyczną badanych *loci*, jak również użyteczność zaprojektowanego systemu *loci* miniSTR w badaniach zdegradowanych śladów biologicznych, takich jak: plamy krwi i spermy na tkaninie, ślina z ustników niedopałków papierosów oraz fragmentów włosów katagenowych. *Loci*, które wchodziły w skład zestawu nie należą do standardu używanego w kryminalistyce opartego na systemie CODIS, dlatego mogą one stanowić rozszerzenie typowego panelu badawczego, gdy konieczne jest zwiększenie siły dyskryminacji użytego zestawu *loci*.

The newly designed and optimized miniplex contains the following markers: D3S3053, D6S474, D9S2157, D20S482 and sex-determining marker – amelogenin. The target amplicon lengths for the developed multiplex are 71–135 bp. Amplification products were detected in a fluorescence based automated genetic analyzer. A minimal DNA sample

required to obtain full genetic profiles was 250 pg. The usefulness of these miniSTRs in genotyping of severely degraded forensic samples, such as stains of blood and semen, saliva on cigarette butts and telogen hair has been confirmed in validation studies. The designed pentaplex offers a new potential screening tool in cases of old crime scenes, mass disasters, mass graves, etc., where DNA degradation, body fragmentation or large numbers of victims occur. The use of additional non-CODIS markers may increase typeability of severely degraded samples and ensure a higher potential for genetic discrimination.

WSTĘP

W praktyce medyczno-sądowej przedmiotem badań jest nierzadko materiał, który poddawany był wpływowi niekorzystnych czynników środowiskowych lub działaniu mikroorganizmów. Procesy te prowadzą do degradacji DNA utrudniając interpretację profilu genetycznego wskutek powstawania artefaktów w postaci nierównomiernej amplifikacji alleli heterozygot, całkowitej utraty jednego z alleli (*allelic drop-out*), bądź całego locus (*locus drop-out*) [1, 2, 3, 4]. Podwyższona temperatura i wilgotność, promieniowanie UV czy ogień powodują fragmentację DNA do krótkich odcinków poprzez zachodzące w komórkach procesy biochemiczne lub oksydacyjne [5, 6, 7]. Jedną z metod genotypowania próbek DNA o dużym stopniu fragmentacji jest

zastosowanie starterów PCR przyłączających się w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji powtarzalnej. Skrócenie regionów flankujących umożliwia uzyskiwanie produktów PCR o niskiej masie cząsteczkowej (50-150 pz) [1, 4]. Markery miniSTR wykorzystano po raz pierwszy na dużą skalę przy identyfikacji ofiar ataku terrorystycznego na World Trade Center w 2001 roku [8].

Opracowano multipleks miniSTR, w którego skład weszły *loci* autosomalne: D3S3053, D6S474, D9S2157 i D20S482 oraz marker płci – amelogenina. Poszczególne markery autosomalne nie były dotychczas rutynowo używane w badaniach medyczo-sądowych, lecz zostały sklasyfikowane jako użyteczne w identyfikacji osobniczej na podstawie różnych danych populacyjnych [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15]. Celem pracy była ocena przydatności zaprojektowanego pentapleksu w genotypowaniu próbek zdegradowanego DNA.

MATERIAŁ I METODY

Charakterystykę *loci* miniSTR wchodzących w skład opracowanego pentapleksu przedstawiono w tabeli I. Przeprowadzono optymalizację warunków PCR oraz dwuetapową walidację procesu genotypowania zgodnie z wytycznymi SWGDAM (ang. *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*), które obejmują zbiór definicji dotyczących wdrażania procedur analizy DNA w laboratoriach kryminalistycznych [16]. Walidacja dostarcza niezbędnych informacji na temat zdolności metody badawczej do generowania wiarygodnych rezultatów, ograniczeń nałożonych na procedurę oraz parametrów, których zastosowanie umożliwi uzyskanie właściwych wyników analizy. Ponadto w trakcie przeprowadzania walidacji definiowane są krytyczne etapy procesu w celu ich dokładnego kontrolowania [17, 18].

Tabela I. Charakterystyka loci zawartych w pentapleksie miniSTR.

Table I. Characteristics of loci included in the miniSTR pentaplex.

Locus	Numer dostępu w Banku Genów Gene Bank accession number	Jednostka powtarzalna Repeat unit	Allel referencyjny Reference allele	Lokalizacja chromosomowa Chromosomal location	Zakres długości alleli (pz) Allele length range (bp)	Zakres alleli Allele range
D3S3053	AC069259	TATC	9	3q26.31	84–108	7–13
D6S474	AL357514	[AGAT] [GATA]	17	6q21-22	107–135	13–20
D9S2157	AL162417	ATA	10	9q34.2	71–107	7–19
D20S482	AL121781	AGAT	14	20p13	86–126	9–19
AMG X	M55418	–	–	Xp22.31-p22.1	80	X
AMG Y	M55419	–	–	Yp11.2	83	Y

Specyficzność gatunkową określano na podstawie badań próbek DNA pochodzących z zasuszonych próbek krwi 17 wybranych gatunków zwierząt: domowych (kot, pies), gospodarskich (koń, krowa, koza, owca, świnia, kura, indyk), dziko żyjących (dzik, jeleń, sarna, mysz, szczur, karp, lew) oraz naczelnych (szympans). Stabilność somatyczną analizowano poprzez porównanie zgodności genotypu w materiale wyodrębnionym z różnych tkanek pochodzących do tej samej osoby. Materiał badawczy stanowiły wycinki 10 różnych tkanek (mózg, przysadka mózgowa, serce, płuco, mięsień poprzecznie prążkowany, trzustka, śledziona, wątroba, nerka oraz jądro bądź jajnik) pobranych podczas badania pośmiertnego trzech niespokrewnionych osób o czasie zgonu nie dłuższym niż 14 godzin. Czułość analizy wyznaczano poprzez określenie progowej wartości stężenia DNA niezbędnej do uzyskania pełnego profilu genetycznego. Do tego celu wykorzystano wzorce DNA izolowane z komercyjnych linii komórkowych: 9947A, 9948 (Promega) i AmpF ϵ STR DNA Control 007 (Applied Biosystems). Powtarzalność otrzymywanych wyników oceniano na podstawie analizy genotypów uzyskiwanych po różnym czasie przechowywania materiału pochodzącego od tej samej osoby. Przydatność w identyfikacji genetycznej śladów biologicznych oceniano badając anonimowy materiał biologiczny: 43 próbki wysuszonej krwi ludzkiej pochodzących z lat 1957–1998, dziewięć próbek krwi ludzkiej w postaci plam zabezpieczonych na tkaninie, sześć próbek nasienia męskiego w postaci plam zabezpieczonych na tkaninie, osiem próbek śliny pobranych z ustników niedopałków papierosów, osiem włosów katagenowych oraz 14 próbek krwi naniesionej na jałowe płótno i poddanych inkubacji w cieplarni w temperaturze 150°C przez 30 min [19]. Probki DNA izolowano metodą organiczną. Pomiar stężeń DNA ludzkiego w izolatach przeprowadzono metodą qPCR przy zastosowaniu zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit oraz aparatu 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems). Amplifikację prowadzono w aparacie GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Wyboru starterów PCR dla *loci* D3S3053, D6S474, D9S2157 i D20S482 dokonano spośród sekwencji zaproponowanych przez Hill i wsp. [12]. Sekwencje starterów PCR dla *locus* amelogeniny zaczerpnięto z publikacji Haas-Rochholza i Weilera [20]. Starte-

ry frontowe (F) wyznakowano na końcach 5' odpowiednimi fluorochromami. Warunki odpowiednie do prowadzenia reakcji PCR z użyciem zestawu pięciu par starterów dobierano poprzez optymalizację dziewięciu różnych zmiennych, mających wpływ na wydajność amplifikacji DNA. Każdorazowo modyfikowano jeden z parametrów, a następnie oceniano, w jaki sposób zmiana ta wpłynęła na jakość uzyskiwanych wyników, w szczególności na wysokość oraz morfologię pików. Rozdział produktów amplifikacji prowadzono w analizatorze genetycznym ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wobec wewnętrznego standardu wielkości GS500 LIZ (Applied Biosystems) stosując kapilary o długości 36 cm i polimer POP-4 (Applied Biosystems) przy napięciu 15 kV i temperaturze 60°C. Czas elektroforezy wynosił 25 minut. Dane rejestrowano przy pomocy oprogramowania Data Collection v3.0 (Applied Biosystems). Aparat wykalibrowano za pomocą zestawu barwników matrycowych DS-33 (6-FAMTM, VIC[®], NEDTM, PET[®], LIZ[®]) dla wirtualnego filtra G5. Analizę fragmentów prowadzono przy użyciu oprogramowania GeneMapper[®] ID-X (Applied Biosystems). Do skonstruowania drabin alleli użyto fragmentów, dla których liczbę powtórzeń w obszarach zmiennych określono na drodze sekwencjonowania uwzględniając wszystkie ujawnione warianty długości. Szczegóły metodyki są przedmiotem planowanego zastrzeżenia patentowego, dlatego nie mogą zostać ujawnione w bieżącej publikacji. Genotypowanie tych samych izolatów, reprezentujących próbki zdegradowane, przeprowadzono z zastosowaniem zestawu AmpF ϵ STR SGM Plus[®] (Applied Biosystems) z użyciem 2 ng matrycy DNA, tj. ilości zalecanej przez producenta. Wyniki uzyskane za pomocą multipleksu badanego i referencyjnego przeanalizowano pod kątem jakości zarejestrowanego sygnału oraz liczby oznaczonych markerów.

WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń określono optymalne warunki prowadzenia reakcji amplifikacji badanego pentapleksu. Wartości parametrów przedstawiono w tabeli II.

W analizowanych próbkach krwi zwierzęcej nie uzyskano profili genetycznych, jedynie w profilu DNA próbki pobranej od szympansa pojawił się po-

Tabela II. Zoptymalizowane warunki PCR.
Table II. Optimized PCR conditions.

Parametr Parameter	Wartość Value
startery D3S3053 D3S3053 primers	0,3 μ M
startery D6S474 D6S474 primers	0,2 μ M
startery D9S2157 D9S2157 primers	0,8 μ M
startery D20S482 D20S482 primers	0,2 μ M
startery AMG AMG primers	0,2 μ M
matryca DNA DNA template	0,1–0,5 ng
MgCl ₂	1,5 mM
polimeraza Taq Taq polymerase	0,5 U
dNTPs	200 μ M
denaturacja wstępna initial denaturation	95°C, 11'
denaturacja denaturation	94°C, 1'
hybrydyzacja starterów primer hybridization	59°C, 1'
wydłużanie elongation	72°C, 1'
wydłużanie końcowe final elongation	60°C, 45'
cykle termiczne thermal cycles	28

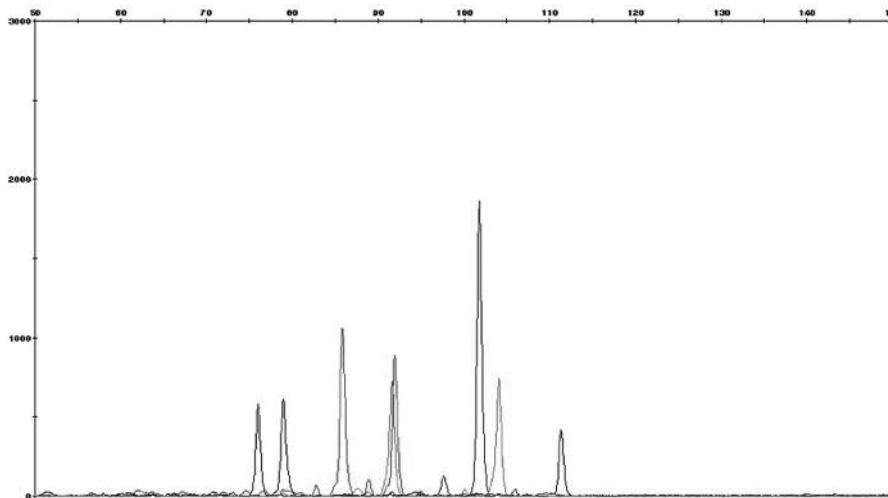
jedynczy, bardzo niski pik w zakresie długości alleli *locus* D20S482. Uzyskane wyniki dowodzą swoistości gatunkowej starterów PCR zaprojektowanych dla wszystkich badanych *loci* miniSTR. Badania przeprowadzone na próbkach DNA pochodzących z 10 różnych rodzajów tkanek pobranych ze zwłok trzech osób wykazały zgodności genotypów we wszystkich analizowanych przypadkach i tym samym dowiodły stabilności somatycznej badanego

zestawu *loci*. Powtarzalność otrzymywanych wyników oceniano na podstawie analizy genotypów oznaczanych po różnym czasie przechowywania materiału pochodzącego od tej samej osoby. We wszystkich badanych przypadkach stwierdzono zgodność uzyskanych profili genetycznych. Świadczy to o spójności wyników uzyskiwanych przy pomocy zaprojektowanego zestawu multipleksowego miniSTR. Określenie czułości analizy polegało na określeniu najmniejszej ilości DNA pozwalającej na uzyskanie pełnego profilu genetycznego projektowanego pentapleksu. Na jedną reakcję dodawano od 62,5 pg do 1 ng matrycy DNA. Próbę wykonano w dwóch powtórzeniach z użyciem trzech różnych wzorców DNA. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli III. W zakresie ilości od 1 ng do 0,5 ng matrycy DNA dla każdej próby uzyskano pełny profil genetyczny. Przy 250 pg DNA w większości przypadków uzyskano pełne profile genetyczne, tylko w dwóch próbkach zanotowano wypadanie alleli *locus* D6S474. Dla ilości DNA niższych niż 125 pg uzyskiwano profile częściowe. Zjawisko wypadania alleli obserwowano najczęściej w obrębie *loci* o najdłuższych amplikonach – D6S474 i D3S3053 oraz rzadziej w D20S482. Dla żadnej z analizowanych próbek nie zanotowano utraty sygnału wszystkich *loci*. Na rycinie 1 przedstawiono elektroforegram produktów amplifikacji 250 pg wzorca DNA uzyskany w trakcie doświadczalnego wyznaczania czułości reakcji. Ze względu na charakter badań, którym dedykowany jest projektowany pentapleks miniSTR, szczególnie nacisk położono na określenie jego czułości w kontekście analizy materiału zdegradowanego. Izolację DNA przeprowadzono metodą organiczną, która ze względu na wysoką wydajność jest jedną z najczęściej stosowanych w laboratoriach genetycznych [19]. Ilościowe oznaczenia DNA przeprowadzono metodą *real-time PCR* z użyciem zestawu odczynników Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit. Długość amplikonu, na podstawie którego odczytywane jest stężenie próbki wynosi 62 pz, stąd uzyskane wyniki pomiaru powinny być miarodajne nawet w przypadku próbek zawierających materiał zdegradowany [21]. Amplifikowano próbki DNA wyizolowane z różnych rodzajów śladów biologicznych najczęściej spotykanych na miejscach przestępstw. Na 31 przebadanych próbek uzyskano 27 pełnych i trzy częściowe profile genetyczne. W każdym

Tabela III. Oznaczalność profili genetycznych w zależności od ilości matrycy DNA.
 Table III. DNA typeability depending on template quantity.

Wzorzec DNA DNA control	9947A				9948				DNA Control 007			
	D3	D6	D9	D20	D3	D6	D9	D20	D3	D6	D9	D20
0,0625	F	N	F	P	N	N	F	F	N	N	F	F
	F	F	F	P	F	N	F	F	P	N	F	F
0,1250	F	N	F	F	F	N	F	F	F	N	F	F
	F	F	F	F	P	F	F	F	F	F	F	F
0,2500	F	F	F	F	F	P	F	F	F	N	F	F
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
0,5000	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
0,7500	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
1,0000	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

F – pełny profil, P – częściowy profil, N – brak profilu
 F – full profile, P – partial profile, N – no profile



Ryc. 1. Elektroforegram produktów amplifikacji 250 pg wzorca DNA.
 Fig. 1. Electrophoregram of PCR amplified products from 250 pg of DNA template.

z trzech przypadków utratę sygnału obserwowano dla locus D6S474. W przypadku jednej próbki nie udało się określić genotypu żadnego z oznaczanych układów. Oznaczalność *loci* zaprojektowanego zestawu miniSTR w badaniach śladów kryminalistycznych (plamy spermy i krwi na tkaninie, włosy, ślina na ustnikach niedopałków papierosów) wyniosła 87%. Dla dwóch próbek śliny z ustników niedopałków papierosów oraz dla jednej próbki stanowiącej włos katagenowy uzyskano częściowe profile genetyczne z utratą sygnału pojedynczych *loci*. W jednym przypadku śladu spermy na tkaninie nie zarejestrowano sygnału amplifikacyjnego. Zbliżony odsetek pozytywnych wyników genotypowania (84%) uzyskano w badaniach archiwalnych śladów krwi zabezpieczonych na tkaninie, pochodzących z lat 1957-1998. Wyniki te korelują z doniesieniem Tsukady i wsp. [22], którzy w podobnym doświadczeniu za pomocą czterech skróconych *loci* analizowali próbki krwi przechowywane w temperaturze pokojowej przez okres 17-26 lat. Wykonane w ramach walidacji zaprojektowanego multipleksu badania czułości potwierdziły również wyniki uzyskane przez Opel i wsp. [7] dla tripleksów miniSTR. Testując próbki zdegradowanej krwi i materiału kostnego otrzymywali oni 90–94% pełnych profili genetycznych. Dowiedli oni również, że amplifikacja trzech *loci* miniSTR zachodzi wydajnie z ilości matrycy większej niż 100 pg.

Problem identyfikacji rozłożonych szczątków ludzkich ukrytych w celu zatarcia śladów przestępstwa czy ofiar katastrof lub działań wojennych, pojawia się często w praktyce sądowo-lekarskiej [23, 24, 25, 26, 27, 28]. W niniejszej pracy modelem zdegradowanych śladów biologicznych były próbki krwi inkubowane przez 30 minut w temperaturze 150°C [19]. Zastosowana metoda degradacji różni się od sposobów opisywanych w piśmiennictwie, polegających na fragmentowaniu DNA poprzez działanie DNAzy I [3, 7, 29, 30]. Genotypowanie 14 zde-

gradowanych próbek krwi komercyjnym zestawem AmpF ϵ STR SGM Plus pozwoliło na uzyskanie 13 częściowych profili genetycznych, w których utratę sygnału stwierdzono w większości *loci*. W jednym przypadku nie uzyskano produktów amplifikacji. W wyniku badania tych samych śladów zaprojektowanym multipleksem miniSTR uzyskano 12 pełnych oraz dwa częściowe profile genetyczne. W jednej z próbek wygaszenie sygnałów zaobserwowano w *loci* D6S474 oraz D9S2157, zaś w innej nie zarejestrowano pików układu D20S482. Degradacja DNA uniemożliwiła amplifikację długich fragmentów DNA. Potwierdzono tezę, że wykorzystanie *loci* miniSTR daje w takich przypadkach większe szanse na uzyskanie profilu genetycznego. Zdecydowanie wyższą oznaczalność skróconych markerów uzyskano również podczas identyfikacji ofiar ataku na WTC w Nowym Jorku [24], gdzie materiałem badawczym były szczątki ludzkie w stanie daleko posuniętego rozkładu. Analiza wyników amplifikacji z użyciem zestawu AmpF ϵ STR Profiler Plus opublikowana przez Maciejewską i Pawłowskiego [31] wykazała, że w przypadku próbki wykazującej zdegradowanie DNA do wielkości 600 pz występuje zanik amplifikacji *locus* D7S820 oraz znaczne osłabienie sygnałów amplifikacyjnych dla fragmentów o największej masie cząsteczkowej (D18S51, FGA, D13S317 i D21S11). W przypadku zdegradowania DNA do wielkości poniżej ok. 300pz autorzy ci uzyskali wyłącznie amplifikację genu amelogeniny, natomiast dla próbki DNA zdegradowanej do wielkości poniżej 100pz niemożliwe było oznaczenie żadnego z badanych *loci*.

Analiza typowych próbek kryminalistycznych i zdegradowanych śladów krwi zabezpieczonych na tkaninie pozwoliła na sformułowanie wniosku, że wybrane markery miniSTR są przydatne w badaniach medyczno-sądowych, a zaprojektowany zestaw może stanowić użyteczne narzędzie w genotypowaniu zdegradowanego DNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Butler J. M., Shen Y., McCord B. R.: The development of reduced size STR amplicons as tool for analysis of degraded DNA. *J. Forensic Sci.* 2003, 48: 1054-1064.
2. Miloš A., Selmanović A., Smajlović L., Huel R. L. M., Katzmarzyk C., Rizvić A., Parsons T.J.: Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. *Croat. Med. J.* 2007, 48: 486-493.
3. Mulero J. J., Chien Wei Chang, Lagacé R. E., Wang D. Y., Bas J. L., McMahon T. P., Hennessy L. K.: Development and validation of the AmpF ϵ STR[®] MiniFiler[™] PCR amplification kit: A miniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J. Forensic Sci.* 2008, 53: 838-852.
4. Wiegand P., Kleiber M.: Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int. J. Leg. Med.* 2001, 114: 285-287.
5. Bär W., Kratzer A., Machler M., Schmid W.: Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci. Int.* 1988, 39: 59–70.
6. Butler J. M.: Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques.* 2007, 43: Sii-Sv.
7. Opel K. L., Chung D. T., Drábek J., Butler J. M., McCord B. R.: Developmental validation of reduced-size STR miniplex primer sets. *J. Forensic Sci.* 2007, 52: 1263-1271.
8. Holland M. M., Cave C. A., Holland C. A., Bille T. W.: 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: 264-272.
9. Chung U., Shin K.-J., Park M. J., Kim N. Y., Yang W. I., Cho S.-H., Lee H. Y.: population data of nine miniSTR loci in Koreans. *Forensic Sci. Int.* 2007, 168: e51-e53.
10. Coble M. D., Hill C. R., Vallone P. M., Butler J. M.: Characterization and performance of new MiniSTR loci for typing degraded samples. *Int. Congr. Ser.* 2006, 1288: 504-506.
11. Hill C. R., Butler J. M., Coble M. D.: Allele frequencies for 26 miniSTR loci with U.S. Caucasian, African American, and Hispanic populations. Dane populacyjne dostępne w internecie pod adresem: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpop.htm>.
12. Hill C. R., Kline M. C., Coble M. D., Butler J. M.: Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples. *J. Forensic Sci.* 2008, 53: 73-80.
13. Malaghini M., Schneider V., Leite F.: Genetic analysis of 9 non-CODIS miniSTR loci in the Brazilian population of Parana. *Forensic Sci. Int.: Genetics Suppl. Ser.* 2009, 2: 359-360.
14. Shujin L., Ning L., Xue B., Jianli G., Zhiping H., Bin C.: Construction and application of four fluorescence labeled multiplex typing system for 3 miniSTR loci. *Forensic Sci. Int.: Genetics Suppl. Ser.* 2009, 2: 31-32.
15. Yong R. Y. Y., Gan L. S. H., Chua E. M., Yap E. P. H.: Polymorphism studies of six miniSTR loci for three ethnic populations in Singapore. *Leg. Med.* 2009, 11: 195-197.
16. Schneider P. M., Bendera K., Mayrb W. R., Parson W., Hoste B., Decorte R., Cordonnier J., Vanek D., Morling N., Karjalainen M., Carlotti C., Sabatier M., Hohoff C., Schmitter H., Pflug W., Wenzel R., Patzelt D., Lessig R., Dobrowolski P., O'Donnell G., Garafano L., Dobosz M., de Knijff P., Mevag B., Pawlowski R., Gusmão L., Vide M. C., Alonso A., Fernández O. G., Nicolás P. S., Kihlgreen A., Walter Bär, Meier V., Teyssier A., Coquoz R., Brandt C., Germann U., Gill P., Hallett J., Greenhalgh M.: STR analysis of artificially degraded DNA – results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci. Int.* 2004, 139: 123-134.
17. Butler J. M.: *Forensic DNA Typing: Biology and technology behind STR markers.* Laboratory validation. Elsevier Academic Press. 2001.
18. Butler J. M.: Validation: What is it, why does it matter, and how should it be done? *Applied Biosystems, Forensic News* 01, 2007.
19. Dębska M., Drabik J.: Porównanie efektywności różnych metod izolacji genomowego DNA ze śladów biologicznych. *Problemy Kryminalistyki* 2009, 264: 11-25.
20. Haas-Rochholz H., Weiler G.: Additional primer sets for an amelogenin gene PCR based DNA – sex test. *Int. J. Leg. Med.* 1997, 110: 312-315.
21. Westring C. G., Kristinsson R., Gilbert D. M., Danielson P. B.: Validation of reduced-scale reactions for the Quantifiler Human DNA kit. *J. Forensic Sci.* 2007, 52: 1035-1043.
22. Tsukada K., Takayanagi K., Asamura H., Ota M., Fukushima H.: Multiplex short tandem repeat

typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Leg. Med.* 2002, 4: 239-245.

23. Alonso A., Martín P., Albarrán C., García P., Fernández de Simón L., Jesús Iturralde M., Fernández-Rodríguez A., Atienza I., Capilla J., García-Hirschfeld J., Martínez P., Vallejo G., García O., García E., Real P., Álvarez D., León A., Sancho M.: Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat. Med. J.* 2005, 46: 540-548.

24. Biesecker L. G., Bailey-Wilson J. E., Ballantyne J., Baum H., Bieber F. R., Brenner C., Budowle B., Butler J. M., Carmody G., Conneally P. M., Duceman B., Eisenberg A., Forman L., Kidd K. K., Leclair B., Niezgoda S., Parsons T., Pugh E., Shaler R., Sherry S. T., Sozer A., Walsh A.: DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science* 2005, 310: 1122-1123.

25. Brenner C. H., Weir B. S.: Issues and strategies in the DNA identification of World Trade Center victims. *Theor. Popul. Biol.* 2003, 63: 173-178.

26. Ladika S.: South Asia tsunami. DNA helps identify missing in the tsunami zone. *Science*. 2005, 307, 504.

27. Parsons T. J., Huel R., Davoren J., Katzmarzyk C., Miloš A., Selmanović A., Smajlović L., Coble M. D., Rizvić A.: Application of novel „mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Sci. Int.: Genetics*. 2007, 1: 175-179.

28. Whitaker J. P., Clayton T. M., Urquhart A. J., Millican E. S., Downes T. J., Kimpton C. P., Gill P.: Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. *Biotechniques*. 1995, 18: 670-677.

29. Asamura H., Fujimori S., Ota M., Fukushima H.: MiniSTR multiplex systems based on non-CODIS loci for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Sci. Int.* 2007, 173: 7-15.

30. Meissner C., Bruse P., Mueller E., Oehmichen M.: A new sensitive short pentaplex (ShoP) PCR for typing of degraded DNA. *Forensic Sci. Int.* 2007, 166: 121-127.

31. Maciejewska A., Pawłowski R.: Wpływ degradacji matrycowego DNA na amplifikację loci zestawu Profiler Plus. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 51: 217-226.

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Witold Pepiński
Zakład Medycyny Sądowej UMB
ul. Waszyngtona 13
15-269 Białystok
e-mail: pepinski@umwb.edu.pl