

Porównanie homogenności rozkładu genotypów locus YCAII pomiędzy próbką populacyjną z Polski a innymi dotychczas opublikowanymi dla Europy danymi wykazało bardzo znamienne różnice w ich rozkładzie dla wszystkich porównywanych par za wyjątkiem populacji Słowenii (tab. II). Obserwacje te potwierdzają znamienne statystycznie różnice w homogenności rozkładu obserwowane dla innych loci typu Y-STR pomiędzy populacją polską a innymi populacjami Europy Zachodniej (6).

PIŚMIENNICTWO

1. Kayser M, Caglia A, Córach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Roewer L, et al.: Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.* 1997, 110(3), 125-33, 141-9. - 2. Lessig R, Edelmann J.: Population data of Y-chromosomal STRs in Lithuanian, Latvian and Estonian males. *Forensic Sci. Int.* 2001, 20(3), 223-5. - 3. Mathias N, Bayes M, Tyler-Smith C: Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum. Mol. Genet.* 1994, 3(1), 115-23. 4. - Nei M.: Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973, 70, 3321-3323. - 5. Pawłowski R., Branicki W., Kupiec T.: Y-chromosomal polymorphic loci DYS19, DYS390, DYS393 in a population sample from northern Poland. *Electrophoresis* 1999, 20, 1702-1706. - 6. Płoski R. M. Wozniak, R. Pawłowski, D.M. Monies, W. Branicki, T. Kupiec, A. Kloosterman, T. Dobosz, E. Bosch, M. Nowak, R. Lessig, M. A. Jobling, L. Roewer, M. Kayser: Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum. Genet.* 2002, 110, 592-600. - 7. Ricci U, Sani I, Giovannucci Uzielli ML.: Y-chromosomal STR haplotype in Tuscany (central Italy). *Forensic Sci. Int.* 2001, 120(3), 210-212. - 8. Schmidt U, Lutz S, Roewer L.: A nomenclature for YCA II which is compatible with the ISFG guidelines for Y-STR analysis. *Progress in forensic genetics* 2003, 9, 481—485. - 9. Schmidt U, Meier N, Lutz S: Y-chromosomal STR haplotypes in a population sample from southwest Germany (Freiburg area). *Int. J. Legal Med.* 2003, 117(4), 211-217. - 10. Sterlinko H, Pajnic IZ, Balazic J, Kornel R.: Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. *Forensic Sci. Int.* 2001, 120(3), 226-228.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
ul. Dębowa 23
80-210 Gdańsk.

Lidia Cybulska, Zofia Szczerkowska

Polimorfizm locus DXS1062 w populacji polskiej

Polymorphism of the DXS1062 locus in a Polish population

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

W pracy przedstawiono dane populacyjne dla dwunukleotydowego locus typu STR - DXS1062 sprzężonego z chromosomem X. Badaniom poddano 161 dorosłych niespokrewnionych osób (kobiet i mężczyzn), mieszkańców Polski północnej. W analizowanej populacji wykazano 21 różnych fenotypów i 9 różnych alleli. Allele te poddano sekwencjonowaniu, skonstruowano z nich drabinę i zaproponowano ich nazewnictwo zgodnie z wytycznymi komisji ISFG. Najczęściej występowały allele 20 i 21. Obliczono parametry statystyczne. Uzyskana wysoka siła dyskryminacji, szansa wykluczenia ojcostwa, siła wykluczenia, jak również korzystna zawartość informacji genetycznej czynią badany układ przydatnym markerem w genetyce sądowej.

This paper presents the results of a population study of a dinucleotide STR marker DXS1062. Blood samples were obtained from unrelated adult individuals (males and females) living in the northern part of Poland. In the analyzed population, 21 different phenotypes and 9 alleles of the DXS1062 locus were found. The alleles were sequenced and used for the construction of an allelic ladder. The nomenclature in accordance with ISFG guidelines is proposed. The most frequent alleles were 20 and 21. Statistical parameters (PR, PM, PD, PIC) showed that the examined system is useful in forensic medicine.

Słowa kluczowe: STR, chromosom X, locus DXS1062, genetyka populacyjna

Key words: STR, X chromosome, locus DXS1062, population genetics

WSTĘP

W ciągu ostatnich lat STR-y stały się nieodzownym narzędziem badawczym w genetyce sądowej. Szeroko podkreślane jest znaczenie autosomalnych markerów DNA chromosomu Y. Zdecydowanie mniej publikacji poświęcono dotąd

polimorfizmowi chromosomu X, który może być bardzo przydatny w analizie niektórych spraw sądowych. Należą do nich np. przypadki ustalenia pokrewieństwa między babcią a wnuczką, a także sprawy o dochodzenie ojcostwa, gdy spornym dzieckiem jest dziewczynka. Mężczyzna przekazuje chromosom X wszystkim swoim córkom, a ponieważ jest hemizygotą. pod względem tego chromosomu, średnia szansa wykluczenia ojcostwa w oparciu o analizę markerów chromosomu X może być wyższa niż dla autosomalnych loci (4).

Do tej pory w locus DXS1062 zidentyfikowano 9 alleli (18-26) obejmujących wielkość od 97-111pz. Jednostkę repetytywną stanowi sekwencja dwunukleotydomowa (CA)_n.

MATERIAŁ I METODY

Izolacja genomowego DNA

DNA izolowano z krwi obwodowej pobranej na antykoagulant EDTA (1,5 mg/ml) oraz ze śliny 161 niespokrewnionych osób mieszkańców Polski północnej. Do ekstrakcji DNA zastosowano nieenzymatyczną metodę wg Lahiri (5) oraz zestaw „Sherlock AX” f-my A&A Biotechnology. Stężenie DNA oznaczono metodą detekcji fluorymetrycznej (Fluoroskan Ascent FL, ThermoLabsystems) z zastosowaniem odczynnika PicoGreen® ds DNA Quantitation Kit f-my Molecular Probes (9).

Amplifikacja DNA

45-52 ng genomowego DNA amplifikowano przy użyciu termocyclera GeneAmp® PCR System 9700 f-my Applied Biosystems stosując komercyjny zestaw do amplifikacji ABI PRISM Linkage Mapping Sets v2.5 - MD10 Panel 84 f-my Applied Biosystems (6, 7).

Mieszanina reakcyjna dla locus DXS 1062 o całkowitej objętości 15 ul zawierała:

10x GeneAmp® PCR Buffer	-1,5ul
Nukleotydy (200 uM dNTP)	-1,5ul
Primer mix (5uM każdy primer)	-1,0pl
25mMMgCl ₂	-1,5ul
AmpliTag Gold® DNA Polimerase (5U/ul)	-0,12pl
woda destylowana	-8,18pl
DNA (45-52 ng)	-1,2ul

Amplifikację prowadzono w następujących warunkach:

- 12 min. wstępna denaturacja w 95°C
- 10 cykli (15 s w 94°C, 15 s w 55°C, 30 s w 72°C),
- 20 cykli (15 s w 89°C, 15 s w 55°C, 30 s w 72°C)
- 10 min końcowego wydłużania nici DNA w 72°C.

Elektroforeza i detekcja alleli

Po amplifikacji produkt PCR (0,5 ul) zmieszano z 0,15 ul wewnętrznego standardu wielkości GeneScan⁷ -500 LIZ™ (Applied Biosystems) i 12 pl dejonizowanego formamidu, po czym przeprowadzono denaturację w 95°C przez 5 min i szybko umieszczano w lodzie. Po 5 sekundowym nastrzyku produkty rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze ABI Prism 310 (Applied Biosystems) przez 24 min w 60°C przy 15 kV przy zastosowaniu polimeru POP-4 oraz kapilary o długości 47 cm i 50 pm średnicy.

Wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego GeneScan Analysis Software wer. 3.7 (Applied Biosystems), CEPH control DNA 1347-02 (Applied Biosystems), NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oraz CEPH Genotype Database (<http://www.cephb.fr/cephdb>).

Reakcja sekwencjonowania

W celu skonstruowania drabiny alleli dla badanego locus sekwencjonowaniu poddano próbki z wybranymi allelami, pochodzące od mężczyzn, różniące się pomiędzy sobą wielkościami fragmentów. Każdy badany allel oddzielnie poddano ponownej amplifikacji, przy czym objętość mieszaniny reakcyjnej zwiększono do 20 pl. Produkty amplifikacji oczyszczano ze starterów i nukleotydów na kolumnkach Microcon YM-100 (Millipore). Do każdego amplifikatu dodano 480 pl wody HPLC i poddano wirowaniu. Po zwirowaniu przesącz odrzucano, a supernatanty uzupełniano po 450 pl wody HPLC każdy i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie kolumnki umieszczano w nowych jałowych próbkach i wirowano. Stężenie oczyszczonych produktów oznaczono metodą detekcji fluorymetrycznej (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystems) z zastosowaniem odczynnika PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit f-my Molecular Probes.

Do sekwencjonowania wykorzystano stosując zestaw ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits. Stosowano 5 ng każdego badanego produktu, 1,6 pmol nieznakowanego fluorescencyjnie primera P^s o sekwencji 5'-GTT GCC TGT TAA GCA CTT TGA ATC-3 w łącznej objętości 10 pl.

Reakcja sekwencjonowania przeprowadzono w następujących warunkach:

- 12 min wstępna denaturacja w 95°C
- 10 cykli (15 s w 94°C, 15 s w 55°C, 30 s w 72°C),
- 20 cykli (15 s w 89°C, 15 s w 55°C, 30 s w 72°C)
- 10 min końcowego wydłużania nici DNA w 72°C.

Produkty sekwencjonowania oczyszczano przez precypitację 95% etanolem w obecności 3M octanu sodu. Po 20 min precypitacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano przy 14 tys. rpm przez 20 min. Usuwano supernatanty, a produkty przemywano 70% etanolem. Po zworteksowaniu i zwirowaniu etanol usuwano, a produkty suszono w 90°C przez 1 min. i zawieszano w 12 pl dejonizowanego formamidu.

Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania metodą elektroforezy kapilarnej

Po dwuminutowej denaturacji w 95°C próbki szybko schładzano w lodzie. Tak przygotowane produkty rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310, w kapilarze 47 cm x 50 urn wypełnionej denaturującym polimerem POP-6 (Applied Biosystems) przy nastrzyku 2 kV przez 30 s i późniejszym rozdziale przez 28 min przy 15 kV.

Do analizy uzyskanych wyników zastosowano program komputerowy Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems).

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozkład częstości alleli locus DXS1062 w analizowanej populacji z terenu Polski północnej przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Rozkład alleli locus DXS1062 w populacji Polski północnej.

Table I. Distribution of DYS1062 alleles in the northern Polish population.

Allele	Sekwencja Repetytywna Repetitive sequence	Fragment długości (bp) Fragment length (bp)	Ilość zaobserwowana Number observed kobiety (females) (n = 79)	Częstość Frequency	Ilość zaobserwowana Number observed mężczyźni (males) (n = 82)	Częstość Frequency
18(AC) ₁₈ is....	97	2	0,0127	2	0,0244
19(AC) ₁₉ g....	99	12	0,0759	10	0,1220
20(AC) ₂₀	101	55	0,3481	27	0,3293
21(AC) ₂₁ i....	103	40	0,2532	18	0,2195
22(AC) ₂₂	105	9	0,0570	3	0,0366
23(AC) ₂₃	107	14	0,0886	4	0,0488
24(AC) ₂₄	109	24	0,1519	15	0,1829
25(AC) ₂₅	111	1	0,0063	3	0,0366
26(AC) ₂₆	113	1	0,0063	-	-

W DNA 161 badanych osób wykazano 9 różnych alleli locus DXS1062 z 10 do tej pory zidentyfikowanych. Najczęstszymi były allele 20 i 21.

W oparciu o wyniki badań populacyjnych obliczono parametry charakteryzujące przydatność locus DXS1062 w medycynie sądowej: w badaniach identyfikacyjnych oraz w dochodzeniu ojcostwa i zestawiono je w tabeli II.

Tabela II. Parametry wskazujące na przydatność locus DXS1062 w medycynie sądowej.

Table II. Statistical parameters of the usefulness of the DXS1062 locus in forensic medicine.

Locus DXS1062 DXS1062 locus	kobiety females	mężczyźni males
Siła dyskryminacji Discrimination power (PD)	0,903	0,789
Wskaźnik informacji genetycznej Polymorphism information content (PIC)	0,74	-
Heterozygotyczność Heterozygosity (HET)	0,81	-
Szansa wykluczenia ojcostwa Mean paternity exclusion chance (MEC)	0,753	-

Powyższe parametry, a szczególnie wysoka wartość siły dyskryminacji a także wysoki stopień polimorfizmu decydują o dużej przydatności badanego układu w medycynie sądowej. Porównanie homogenności rozkładu alleli locus DXS1062 pomiędzy danymi z populacją Polski północnej oraz populacją kaukaską (1) wykazało brak różnic w ich rozkładzie.

PIŚMIENNICTWO

1. CEPH Genotype Database (<http://www.ceph.fr/cephdb>).
2. Desmarais D., Zhong Y., Chakraborty R., Perreault C., Busque L.: Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J. Forensic Sci.* 1998, 43, 1046-1049.
3. DNA recommendations-further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *Forensic Sci. Int.* 1997, 87, 179-184.
4. Edelmann J., Deichsel D., Hering S., Platę I., Szibor R.: Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS 9895, DXS 8378, DXS 7132, DXS 6800, DXS 7133, GATA 172D05, DXS 7423 and DXS 8377. *Forensic Sci. Int.* 2002, 129, 99-103.
5. Lahiri D., Bye S., Nurnberg J.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 5444.
6. Matsushita H., Nakamura S., Nagai T., Nakamura M., Sugite H., Furukawa M., Komuro T., Kurihara K.: Allele frequencies of dinucleotide repeat loci on the X chromosome in the Japanese population. *Forensic Sci. Int.* 2002, 129, 134-136.
7. PE Applied Biosystems ABI PRISM Linkage Mapping Set (Version 2): Users Manual 2003.
8. Protocol-Applied Biosystems ABI PRISM® BigDye "Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kits. -9. Rębała K., Szczerkowska Z.: Identyfikacja bardzo krótkiego allela YCAII w populacji północnej Polski. Arch. Med. Sąd. Krym., 2004, 54, 1, 17-24.

Adres pierwszego autora,
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
ul. Dębowa 23
80-210 Gdańsk

Ewa Raczek

Rzadkie, pozadrabinowe allele w STRowych loci w populacji Górnego Śląska

Rare, out-ladder alleles at the STR loci in the Upper Silesia population

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: dr hab. Z. Olszowy - profesor Śląskiej AM

W populacji Górnego Śląska, wśród uczestników spraw spornego ojcostwa znaleziono rzadkie, pozadrabinowe allele w czterech STRowych loci, rutynowo fenotypowanych w sądowym ustalaniu więzów pokrewieństwa. Allele VWA*12 i 21, CSF1PO*16, D13S317*6 oraz TPOX*5 wystąpiły odpowiednio z częstością 0.0006 i 0.0006, 0.0005, 0.0006 oraz 0.0005.

Among individuals (participants of paternity testing) from the Upper Silesia region rare, out-ladder alleles in four STRs (routinely used in paternity testing) were found. There are alleles: VWA*12 and 21, CSF1PO*16, D13S317*6 and TPOX*5 with the following frequency: 0.0006 and 0.0006, 0.0005, 0.0006 and 0.0005.

Słowa kluczowe: STRowe loci, pozadrabinowe allele, populacja górnośląska

Key words: STR loci, out-ladder alleles, the Upper Silesia population

WPROWADZENIE

Wysoce polimorficzne sekwencje genomowego DNA typu STR (short tandem repeat) są nieocenione w opiniowaniu spraw spornego ojcostwa. Rutynowo, w sądowym ustalaniu ojcostwa w KMS ŚAM w Katowicach oznacza się je od 1999 roku. Obecnie badane osoby fenotypuje się w 12 STRowych loci w oparciu o drabiny alleliczne, będące zbiorem powszechnie występujących alleli w danym lokus.

Jednak wśród osobników z regionu Górnego Śląska znaleziono rzadkie, pozadrabinowe allele w czterech spośród 12 loci. Częstości występowania powszechnych alleli przedstawiają prace Raczek (12, 14) oraz Raczek i wsp., (13).