

Zofia Szczerkowska, Inga Antyborzec

System Silver STR™ Multiplex - zastosowanie w medycynie sądowej

Silver STR™ Multiplex System - application in forensic medicine

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

Fenotypy i allele trzech wysoce polimorficznych systemów STR D13S317, D7S820 i D16S539 oznaczono w DNA wyizolowanym z krwi płynnej, plam krwi i mięśni. Amplifikację prowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu Silver STR™ Multiplex (Promega). W analizowanych systemach wykazano 24 różne allele. Nie stwierdzono odchylenia od prawa Hardy-Weinberg. Obliczone parametry statystyczne PD, PIC, MEC, MEP, PE, PI oraz HE wskazują na wysoką przydatność trzech analizowanych systemów w medycynie sądowej.

Phenotypes and alleles of three high polymorphic systems STR: D13S317, D7S820 and D16S539 were determined in DNA isolated from blood samples (194-220 unrelated individuals of both sexes), blood stains and muscles. Amplification was performed using the commercially available Gene Print Silver STR™ III Multiplex System (Promega) kit. A total of 24 alleles for all systems could be observed. Distribution of allele frequencies indicated no deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical parameters: PD, PIC, MEC, MEP, PE, PI and heterozygosity has shown the usefulness of the D13S317, D7S820 and D16S539 in forensic practice.

Słowa kluczowe: PCR, STR, analiza populacyjna, multiplex.

Key words: PCR, STR, multiplex analysis, population study.

Określanie profili genetycznych polimorficznych sekwencji DNA stanowi rutynową metodę badawczą w wielu dyscyplinach medycznych. Badania te mają szczególne znaczenie w praktyce sądowo-lekarskiej zarówno w identyfikacji śladów biologicznych jak i w dochodzeniu ojcostwa. Powszechnie stosowane analizy dotyczą krótkich mikrosatelitarnych sekwencji DNA - STR. Metodą PCR można określić allele pojedynczych loci genowych, a stosując zestawy typu multiplex PCR w czasie jednej reakcji możliwe jest równoczesne zamplifikowanie alleli większej ilości polimorficznych systemów. Warunkiem powodzenia tego

typu reakcji jest zbliżona do siebie temperatura hybrydyzacji primerów, a także wybór takich loci, które mają różny zakres wielkości alleli.

W pracy przedstawiono wyniki badań z zastosowaniem komercyjnego zestawu Silver STR™ Multiplex f-my Promega umożliwiającego równoczesną amplifikację alleli trzech miejsc genowych: D13S317, D7S820 i D16S529 z repetytywną czteronukleotydową sekwencją AGAT. Locus D13S317 mieści się na chromosomie 13q 22 - q31 i obejmuje 165-197 pz, locus D7S820 mieści się na chromosomie 7q 11.21 - q22 i zawiera 215 - 247 pz, a D16S539 z zakresem długości 264-304 pz na chromosomie 16q 24qter. W systemie D13S517 i D7S820 opisano po 11 różnych alleli, 9 różnych alleli w systemie D16S539.

MATERIAŁ I METODY

Polimorfizm trzech STR loci D13S317, D7S820 i D16S539 oznaczono w DNA wyizolowanym z 194-220 próbek krwi płynnej dorosłych niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej, a także w DNA wyizolowanym z plam krwi (na bibule lub płótnie) oraz z tkanek mięśniowych (mięśnie poprzecznie prążkowane).

Do izolacji DNA w zależności od rodzaju materiału biologicznego stosowano różne metody. W przypadku krwi płynnej metodę nieenzymatyczną (6), do izolacji DNA z plam krwi stosowano Chelex (7) a także zestaw f-my Promega lub f-my A & A Biotechnology, DNA z mięśni izolowano klasyczną metodą fenolowo-chloroformową(8). Jakość i ilość DNA oceniano spektrofotometrycznie.

Amplifikacja alleli

Do amplifikacji alleli trzech analizowanych loci użyto zestawu Silver STR™ Multiplex. Reakcję prowadzono w termocyklerze Mastercycler Gradient (Zeiss). W celu zoptymalizowania warunków reakcji PCR oceniono wpływ stężenia matrycowego DNA, Taq polimerazy i primerów, a także temperatury hybrydyzacji primerów, dokonano również ustaleń metodycznych odnośnie warunków elektroforezy i detekcji alleli.

Przyjęto, że najbardziej optymalnym stężeniem matrycowego DNA jest 0,2-0,5 ng/ul. Mając na uwadze swoistość amplifikacji jako najbardziej korzystną temperaturę hybrydyzacji przyjęto 60°C, a oceniając możliwość prawidłowej amplifikacji przy różnych rozcieńczeniach mieszaniny primerów zawartych w zestawie przyjęto, że korzystny rezultat można uzyskać rozcieńczeniu 1:4. Badając wpływ stężenia polimerazy Taq na efektywność amplifikacji stosowano różne stężenia enzymu od 0,06 - 0,5 u/ul mieszaniny. Jako najbardziej optymalne przyjęto stężenie 0,35 u/ul. Amplifikację próbek a całkowitej objętości 12,5 ul prowadzono w 30 cyklach w następujących warunkach.

Inkubacja wstępna 96°C/2 min.

10 cykli:
denaturacja 94°C/1 min.
hybrydyzacja 60°C/1min.
elongacja 70°C/1,5 min.

20 cykli:
denaturacja 90°C/1 min.
hybrydyzacja 60°C/1min.
elongacja 70°C/1,5 min.

Wydłużenie końcowe 60°C/60 min.

Produkty PCR rozdzielano na komercyjnych żelach poliakrylamidowych (f-my Amresco) lub na żelach sporządzanych we własnym zakresie (19.33 ml H₂O, 16,8 g mocznika, 2 ml 10 x TBE, 6 ml bis-akrylamidu). Najlepsze wyniki uzyskano przy stosowaniu żeli 6%, ważna przy tym była wysoka jakość stosowanych odczynników. Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach:

	pre elektroforeza	właściwa elektroforeza
natężenie (mA)	28	28
moc (W)	40	40
napięcie (V)	1300	1370
temperatura fC)	40-50	50
czas	45 min	2,5 godz.

Do detekcji alleli zastosowano zmodyfikowaną metodę Allelna (1). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Zastosowana w pracy metoda badawcza pozwoliła na wykazanie fenotypów analizowanych loci genowych: D13S317, D7S820 i D16S539 we wszystkich próbkach DNA wyizolowanego zarówno z krwi płynnej jak i z plam krwi oraz mięśni. Należało przy tym zwrócić uwagę na to aby zawartość matrycowego DNA nie była wyższa niż 2-2,5 ng, gdyż w przeciwnym przypadku obserwowano artefakty charakterystyczne dla STR loci (sutter bands). Ważnym było również przestrzeganie ustalonego reżimu metodycznego zarówno w odniesieniu do amplifikacji jak i warunków elektroforezy i detekcji alleli. W badanej populacji wykryto 25 fenotypów w locus D13S317, 27 fenotypów w locus D7S820 i 20 w locus D16S539. Rozkład fenotypów analizowanych loci przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Częstości fenotypowe D13S317, D7S820 i D16S539 w populacji Polski północnej.

Table I. Phenotype frequency distribution for systems: D13S317, D7S820 and D16S539 in the Northern Poland population.

Fenotyp Pheno- type	D13S317			D7S820			D16S539		
	n = 220	Częstości obserwowane Observed frequency	Częstości oczekiwane Expected frequency	n = 197	Częstości obserwowane Observed frequency	Częstości oczekiwane Expected frequency	n = 194	Częstości obserwowane Observed frequency	Częstości oczekiwane Expected frequency
7/8	-	-	-	1	0,0051	0,6915	-	-	-
7/9	-	-	-	1	0,0051	0,7683	-	-	-
7/10	-	-	-	1	0,0051	1,03932	-	-	-
7/11	-	-	-	2	0,0101	1,1422	-	-	-
8/8	4	0,0182	4,3738	3	0,0152	3,590	-	-	-
8/9	5	0,0227	4,5289	10	0,0508	7,9785	-	-	-
8/10	6	0,0273	4,5289	16	0,0812	14,4676	-	-	-
8/11	20	0,0909	22,2724	7	0,0355	11,8614	2	0,0103	1,1795
8/12	14	0,0636	14,5173	8	0,0406	8,3508	-	-	-
8/13	6	0,0273	4,653	55	0,0254	2,2870	2	0,0103	0,838
8/14	3	0,0136	2,6677	-	-	-	-	-	-
9/9	-	-	-	5	0,0254	4,4325	-	-	-
9/10	2	0,0091	2,3448	12	0,0609	16,0752	4	0,0206	1,7626
9/11	13	0,0591	11,53	10	0,0508	13,1793	15	0,0773	9,0823
9/12	6	0,0273	7,5161	12	0,0609	9,2787	5	0,0258	8,5445
9/13	3	0,0136	2,4090	3	0,0152	2,8380	-	0,0258	6,4532
9/14	3	0,0136	1,3812	1	0,0051	0,4728	1	0,0051	1,3145
10/10	3	0,0136	1,1724	18	0,0914	14,5748	7	-	-
10/11	9	0,0409	11,5311	23	0,1167	23,8900	5	0,0036	6,9591
10/12	5	0,0227	7,5161	14	0,0711	16,8254	7	0,0258	6,5471
10/13	4	0,0182	2,4090	4	0,0203	5,1463	16	0,0361	4,9446
10/14	-	-	-	1	0,0051	0,8573	-	-	-
11/11	31	0,1409	28,3538	13	0,0660	9,7966	34	0,0825	17,9287
11/12	32	0,1454	36,9626	18	0,0914	13,7943	25	0,1753	33,7342
11/13	12	0,0545	11,847	2	0,0101	3,7781	3	0,1289	25,4776
11/14	9	0,0409	6,7923	-	-	-	18	0,0155	5,1898
11/15	1	0,0045	0,3159	-	-	-	-	-	-
12/12	18	0,0818	12,0463	4	0,0203	4,8558	26	0,0927	15,8684
12/13	7	0,0318	7,7220	2	0,0101	2,6598	5	0,1340	23,9690
12/14	3	0,0136	4,4273	-	-	-	5	0,0257	4,8825
13/13	-	-	-	-	-	-	8	0,0257	9,0512
13/14	1	0,0045	1,4190	4	0,0051	0,1355	-	-	-
13/15	-	-	-	-	-	-	1	0,0051	0,2514

W locus D13S317 najczęstszym był fenotyp 11/11 i 11/12, w D7S820 10/11, a w locus D16S539 11/12 i 11/13.

W oparciu o uzyskane częstości fenotypowe obliczono częstości alleli, przedstawiono je w tabeli II.

Tabela II. Częstość alleli w systemie Silver STR™ III Multiplex w populacji Polski północnej.

Table II. Allele frequency distribution for Silver STR™ Multiplex in the Northern Poland population.

Allele	D13S317	D7S820	D16S539
7	-	1,3%	-
8	14,1%	13,5%	1,0%
9	7,3%	15,0%	7,7%
10	7,3%	27,2%	5,9%
11	35,9%	22,3%	30,4%
12	23,4%	15,7%	28,6%
13	7,5%	4,3%	21,6%
14	4,3%	0,8%	4,4%
15	0,2%	-	0,3%
Łącznie Total	1,000	1,000	1,000

Najczęstszymi allelami w locus D13S317 są 11 i 12, w locus D7S820 10 i 11, a w D16S539 11, 12 i 13. W celu sprawdzenia czy badana populacja pozostaje w równowadze Hardy-Weinberga obliczono częstości oczekiwane, a uzyskane wartości zweryfikowano testem χ^2 . Dla locus D13S317 $\chi^2 = 20,36$, dla D7S820 $\chi^2 = 24,22$, a dla D16S539 $\chi^2 = 28,89$, przy 28 st. swobody $p > 0,001$. Analizowana populacja odpowiada więc warunkom próby losowej. Dla oceny prawidłowości interpretacji wyników obliczono heterozygotyczność. Dla układu D13S317 wynosi ona 0,7455, dla D7S820 - 0,7817, a dla D16S539 - 0,7990, heterozygotyczność oczekiwana wynosi odpowiednio 0,7601, 0,8111 i 0,7693. Uzyskana zgodność dowodzi prawidłowości stosowanych metod.

Rozkład częstości alleli w populacji polskiej porównano z danymi innych autorów (tabela III).

Tabela III. Częstości alleli w systemach: D13S317, D7S820 i D16S539.

Table III. Allele frequency in systems: D13S317, D7S820 and D16S539.

locus D13S317

Allele	Polska n=220	Hiszpania n=212 (4)	Włochy n=446 (5)	Tajlandia n=146 (3)	USA (2)	
					europajska n=285	azjatycka n=195
7	-	-	-	0,003	-	0,003
8	0,141	0,172	0,128	0,319	0,099	0,323
9	0,073	0,066	0,083	0,113	0,076	0,146
10	0,073	0,066	0,054	0,185	0,051	0,110
11	0,359	0,271	0,291	0,223	0,318	0,223
12	0,234	0,259	0,318	0,116	0,308	0,146
13	0,075	-	0,090	0,024	0,112	0,038
14	0,075	0,115	0,031	0,007	0,036	0,010
15	0,002	0,049	0,004	-	-	-

Ciąg dalszy tabeli III

locus D7S820

Allele	Polska n=197	Hiszpania n=212 (4)	Włochy n=446 (5)	Tajlandia n=146 (3)	USA (2)	
					europejska n=285	azjatycka n=195
7	0,013	0,028	0,025	0,007	0,017	0,008
8	0,135	0,151	0,193	0,175	0,016	0,113
9	0,150	0,139	0,087	0,051	0,014	0,074
10	0,272	0,314	0,274	0,182	0,281	0,005
11	0,223	0,188	0,249	0,353	0,202	0,164
12	0,157	0,155	0,141	0,195	0,140	0,377
13	0,043	-	0,025	0,027	0,029	0,221
14	0,008	0,021	0,007	0,010	0,007	0,036
15	-	0,002	-	-	-	0,003

locus D16S539

Allele	D16S539 n=194	Hiszpania n=212 (4)	Włochy n=446 (5)	USA (2)	
				europejska n=285	azjatycka n=195
7	-	0,009	-	-	-
8	0,010	0,120	0,029	0,002	0,008
9	0,077	0,061	0,119	0,105	0,274
10	0,059	0,264	0,054	0,067	0,108
11	0,304	0,299	0,287	0,272	0,274
12	0,286	0,224	0,298	0,339	0,228
13	0,216	-	0,186	0,163	0,095
14	0,044	0,018	0,027	0,033	0,027
15	0,003	0,002	-	0,002	-

Przedstawione w pracy częstości trzech analizowanych loci są zbliżone do częstości obserwowanych w innych populacjach europejskich, znaczące różnice zaobserwowano przy porównaniu własnych wyników z danymi dotyczącymi populacji azjatyckich.

W oparciu o wyniki badań populacyjnych obliczono niektóre z parametrów statystycznych charakteryzujących przydatność systemu Silver STR™ Multiplex w medycynie sądowej. Przedstawiono je w tabeli IV.

Tabela IV. Parametry charakteryzujące przydatność systemu Silver STR™ w medycynie sądowej.

Table IV. Statistical parameters indicate usefulness of the Silver STR™ Systems in forensic medicine.

Locus	Siła dyskryminacji Power of discrimination	Zawartość informacji genetycznej Polymorphism information content	Szansa wykluczenia ojcostwa Mean exclusion chance	Prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa Mean exclusion probability	Siła wykluczenia ojcostwa Power of exclusion	Wskaźnik ojcostwa Paternity index
D13S3317	0,92417	0,74930	0,58363	0,56264	0,502	1,96
D7S820	0,93514	0,78189	0,62144	0,61972	0,566	1,29
D16S539	0,90477	0,73061	0,55227	0,54328	0,597	2,49

Powyższe parametry wskazują na przydatność analizowanych loci w medycynie sądowej. Wysoka siła dyskryminacji oraz korzystny współczynnik zawartości informacji genetycznej znajdują zastosowanie w badaniach identyfikacyjnych, a obliczona w oparciu o przeprowadzone badania szansa wykluczenia ojcostwa stawia ten układ w rzędzie korzystnych markerów genetycznych w sprawach o ustalenie ojcostwa.

WNIOSKI

Zastosowana w pracy metoda pozwala na prawidłowe i jednoznaczne określenie alleli trzech loci genowych: D13S317, D7S820 i D16S539.

Przeprowadzenie jednoczesnej amplifikacji alleli trzech loci w czasie jednej reakcji multiplex pozwala na obniżenie kosztów badania, zmniejszając przy tym ryzyko kontaminacji z obcym DNA.

Metodę charakteryzuje wysoka czułość. Do badań wystarczy niewielka ilość matrycowego DNA wyizolowanego z krwi płynnej, ze śladów krwi, lub innych tkanek (mięśni).

Analizowane loci genowe są wysoce polimorficzne, a obliczona parametry statystyczne wskazują na ich wysoką przydatność w medycynie sądowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen R., Grawes G., Budowle B. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable gels and stained with silver. Biotechniques

1989, 7, 736. -2. Budowle B., Moretti TR., Baumstark AL., Defenbaugh DA., Keys KM.. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *J. Forensic Sci.* 1999 6, 1277-86 -3. Chang-En Pu, Ching-Mei Hsieh, Meng-Yi Chen, Fang-Chin Wu, Chien-Feng Sun. Genetic variation at nine STR loci in populations from the Philippines and Thailand living in Taiwan. *Forensic Science International* 1999, 106, 1-6. -4. Entrala C, Lorente J., Lorente M., Alvarez J., Budowle B., and Villanueva E. Population Studies and Casework Application with the New GenePrint™ Silver STR III Multiplex (D16S539, D7S820, D13S317). *J. Forensic Sci.* 1999 5, 1032-4. -5. Garofano L., Pizzamiglio M., Vecchio C, Lago G., Floris T., D'Errico G., Brembilla G., Romano A., Budowle B. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci: HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D3S1358, *Forensic Sci. Int.* 1998, 97, 53-60. -6. Lahiri D.K., Bye S., Nurnberger J.L Hodes M.E., Crisp M., A non-enzymatic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1992, 25, 193-205. -7. Walsh P.S., Metzger D.A. and Higuchi R. Chelex®100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991, 10, 506-513. -8. Wiegand P., Schurenkamp M., Schuttler U. DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. *Int. J. Leg. Medicine* 1992, 104, 359-360.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
80-210 Gdańsk
ul. Curie Skłodowskiej 3A

**Ryszard Pawłowski, Anita Dettlaff-Kąkol, Grzegorz Jezierski,
Agnieszka Maciejewska, Regina Paszkowska, Monika Reichert**

Genetyka populacyjna dziewięciu loci typu STR z zestawu Profiler Plus w próbce populacyjnej z obszaru Polski

Population genetics of nine STR loci from the Profiler Plus kit in a population sample from Poland

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

Praca przedstawia wyniki badań populacyjnych 9 loci typu STR (D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 i D7S820) zawartych w komercyjnym zestawie Profiler Plus. Próbkę DNA pochodzącą od 706 niespokrewnionych osobników poddano amplifikacji metodą multiplex PCR a następnie produkty zidentyfikowano z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwencjatorze DNA (ABI Prism 310). W badanej próbce populacyjnej wszystkie badane loci znajdowały się w równowadze opisanej równaniem Hardy-Weinberga. Obliczona wartość prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności wynosi 1.25×10^{-11} dając tym samym średnie prawdopodobieństwo - przypadkowej zgodności profili DNA w populacji polskiej wynoszące 1 do 83 miliardów. Zestaw Profiler Plus dzięki bardzo wysokiej sile dyskryminacyjnej jest szczególnie przydatny do badań identyfikacyjnych z zakresu genetyki sądowej.

This paper presents the allele frequency distributions for the nine (D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 and D7S820) loci present in the commercially available Profiler Plus kit. DNA samples of 706 individuals from Northern Poland were amplified in a multiplex reaction with subsequent automatic detection using capillary electrophoresis (ABI Prism 310 DNA sequencer). In the analysed population sample all loci met the Hardy-Weinberg equilibrium conditions. The calculated probability of identity is 1.25×10^{-11} giving on average 1 in 83 billion probability of identity in our population sample. Owing to high discrimination power the Profiler Plus kit is highly useful for forensic identification purposes.

Słowa kluczowe: Multiplex PCR, loci typu STR, genetyka populacyjna, elektroforeza kapilarna, Polska.

Key words: Multiplex PCR, STR loci, population genetics, capillary electrophoresis, Poland.