

Wróbel W., Zoll A.: Kodeks karny. Część szczególna. Komentarz. T. II, Kraków 1999; -6. Daszkiewicz K.: Przepisy przeciwko życiu i zdrowiu. Rozdział XIX Kodeksu karnego. Komentarz, Warszawa 2000; -7. Dzida J., Meissner E.: Raz jeszcze o interpretacji „choroby zazwyczaj zagrażającej życiu”, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 1996, XLVI, s. 37-39; -8. Jakliński A., Tomaszewska Z., Mądro R.: Naruszenie nietykalności cielesnej - problem prawny, czy sądowno-lekarski, *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1997, 27, 145-148; -9. Kunz J.: Błąd w opiniach sądowno-lekarskich w sprawach przestępstw przeciwko życiu i zdrowiu, Kraków 1999; -10. Marek A.: Komentarz do kodeksu karnego. Część szczególna, Warszawa 2000;

11. Michalski B.: Przepisy przeciwko życiu i zdrowiu. Nowa kodyfikacja karna. Ministerstwo Sprawiedliwości. Departament Kadr i szkolenia, Warszawa 2000; -12. Mądro R., Teresiński G., Wróblewski K.: Rozstrój zdrowia jako znamię przestępstwa z art. 157 k.k., „Prokuratura i Prawo” 1998, Nr 10, 33-46; -13. Mozgawa M.: Przepisy naruszenia nietykalności cielesnej w świetle orzecznictwa Sądu Najwyższego, „Nowe Prawo” 1983, nr 5, s. 26<sup>4</sup>; -14. Polakowski M., Berent J. A., Śliwka K.: Opiniowanie o „naruszeniu czynności narządu ciała” lub „rozstroju zdrowia” wobec rezygnacji w nowym kodeksie karnym z pojęcia „uszkodzenia ciała”, *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1999, XLIX, 191—194; -15. Popławski H.: Przepisy uszkodzenia ciała z art. 156 k.k. a naruszenie nietykalności cielesnej, „Palestra” 1977, Nr 3-4, s. 62-72; -16. Świątek B.: Przepisy przeciwko życiu i zdrowiu w świetle nowego kodeksu karnego, *Post. Med. Sąd. Krym.* 1999, 5, 63-70; -17. Teresiński G., Mądro R.: Zakres skutków wymienionych w & 2 art. 157 kodeksu karnego z 1997 r. - ciąg dalszy sporu o granice art. 156 i 182 kodeksu karnego z 1969 r., *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2000, L, 319-330; -18. Waszczyński J.: Naruszenie nietykalności cielesnej [w:] *System Prawa Karnego. T. IV. Część 2*, Wrocław-Warszawa-Kraków-Gdańsk-Lódź 1989; -19. Wojciechowski J.: Przepisy przeciwko czci i nietykalności cielesnej. Rozdział XXVII Kodeksu karnego, Warszawa 2000.

Adres autora:

Katedra Prawa Karnego

Wydział Prawa i Administracji

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

ul. K. Olszewskiego 2

31-007 Kraków

**Agnieszka Maciejewska\*, Ryszard Pawłowski\*\***

## Wpływ degradacji matrycowego DNA na amplifikację *loci* zestawu Profiler Plus

### Influence of the DNA degradation on amplification Profiler Plus loci

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku

Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM

\*\* Z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie

Dyrektor: A. Głazek

Celem pracy było zbadanie wpływu degradacji DNA na amplifikację *loci* systemu Profiler Plus. Analizie poddano eksperymentalnie (enzymatycznie) degradowany DNA oraz suchą krew przechowywaną od miesiąca do 70 lat w warunkach pokojowych. Wykazano silną korelację pomiędzy stopniem degradacji DNA a ilością i wydajnością amplifikacji poszczególnych *loci*. Badanie wpływu metody izolacji DNA dla krwi przechowywanej przez okres czasu od 1 miesiąca do 70-let wykazało, że jedynie metoda fenol-chloroform umożliwia identyfikację wszystkich *loci* badanego systemu przy jednoczesnym zbalansowanym sygnale amplifikacyjnym. Zastosowanie metody Chelex-100 prowadziło do częściowej degradacji DNA i/lub zahamowania reakcji PCR skutkiem czego był brak amplifikacji fragmentów DNA o największej masie cząsteczkowej.

The aim of our paper was the investigation of the influence of DNA degradation on amplification of Profiler Plus loci. Enzymatically degraded DNA and blood crusts stored for 1 month, 10 and 70 years in room temperature were analyzed. A strong influence of DNA level degradation on efficiency of Profiler Plus *loci* amplification was shown. The influence of the DNA extraction method from blood stored between 1 month and 70 years showed that only the phenol/chloroform method gives a possibility of efficient DNA extraction thus obtaining of balanced DNA profile. Application of the Chelex-100 method gave unsatisfactory results manifesting in a lack of high molecular loci.

Słowa kluczowe: zdegradowany DNA, loci Profiler Plus, metoda ekstrakcji DNA, PCR.

**Key words: Degraded DNA, Profiler Plus loci, DNA extraction methods, PCR.**

## WSTĘP

DNA mikrosatelitarny stał się bardzo użytecznym i powszechnie stosowanym narzędziem w genetyce sądowej mimo mniejszego polimorfizmu niż DNA minisatelitarny. Jedną z przyczyn jest mniejsza wielkość alleli w porównaniu do DNA minisatelitarnego co czyni je, mimo mniejszych sił dyskryminacyjnych, bardziej przydatnymi do identyfikacji DNA silnie zdegradowanego (5, 8, 14). Wprowadzenie na rynek czułych, dobrze zoptymalizowanych zestawów do kompleksowego PCR stworzyło możliwość jednoczesnego, szybkiego, tańszego i wiarygodnego amplifikowania wielu silnie dyskryminujących loci człowieka. Przykładem takiego powszechnie stosowanego zestawu jest system Profiler Plus (10, 18). W genetyce sądowej bardzo często identyfikacji poddawany jest materiał biologiczny, który uległ degradacji pod wpływem niekorzystnych czynników środowiskowych bądź w wyniku nieprawidłowego jego zabezpieczenia. Ze względu na małą siłę dyskryminacji oraz koszty analizy badanie sekwencji DNA mitochondrialnego, najbardziej stabilnego z badanych rodzajów DNA, jest stosunkowo rzadko przeprowadzane i tylko w tych sytuacjach kiedy analiza DNA jądrowego nie dała satysfakcjonujących wyników. Zdegradowany materiał genetyczny wymaga bardzo ostrożnej i szczegółowej analizy, gdyż zarówno podczas reakcji mono - jak i kompleksowego PCR, może często dochodzić do powstawania artefaktów w wyniku nierównomiernej amplifikacji alleli heterozygot, jak również do całkowitej utraty jednego z alleli (zjawisko stochastyczne). Artefakty tego typu powstają szczególnie w tych sytuacjach, gdy amplifikacji poddawana jest zbyt mała ilość DNA i/lub gdy badany DNA jest silnie zdegradowany lub ewentualnie gdy dochodzi do hamowania reakcji PCR w wyniku obecności inhibitorów reakcji PCR (6, 9, 18, 19, 20, 22, 24).

Celem niniejszej pracy było badanie wpływu degradacji DNA na amplifikację poszczególnych loci testowanego systemu oraz zbadanie wpływu trzech metod izolacji DNA z krwi o różnym wieku na wydajność ekstrakcji i amplifikację *loci* zawartych w zestawie Profiler Plus.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał biologiczny stanowiła świeża krew oraz sproszkowana krew ludzka przechowywana w temperaturze pokojowej od miesiąca do 70 lat.

### Izolacja i pomiar ilości DNA

DNA ze świeżej krwi izolowano metodą wg Wieganda i wsp. (25). DNA ze sproszkowanej krwi przechowywanej od 1 miesiąca do 70 lat w warunkach pokojowych metodą wyżej wymienioną, metodą z Chelex-100 (23) oraz dostępnym komercyjnie zestawem do izolacji DNA z krwi. Ilość DNA w badanych próbkach oznaczano metodą fluorymetryczną (1, 2) i/lub metodą hybrydyzacji z sondą swoistą dla ludzkiego DNA (Ouantiblot, PE USA) z zastosowaniem chemiluminescencyjnej metody detekcji (ECL, Amersham).

## Degradacja DNA DNA-zą I

Próbki DNA o stężeniu 1,6 ug/uL poddawano trawieniu z 0,5 mU DNA-zy w obecności buforu do DNA-zy przez 30 sek, 1, 2, 4 i 10 min w temperaturze 0 °C (mieszania wodno-lodowa). Trawienie zatrzymywano przez dodanie 450 ul\_ alkoholu absolutnego o temperaturze -20 °C i 15 ul. 3M octanu sodu (pH 5.2). Precypitację DNA kontynuowano przez noc w temperaturze -20 °C, a następnie mieszaninę wirowano przez 10 min przy 13000 rpm. Sprecypitowany DNA po wysuszeniu zawieszano w 50 uL TE. Stopień spolimeryzowania DNA oznaczano elektroforezą w żelu agarozowym względem standardów wielkości DNA.

## Amplifikacja i detekcja produktów systemu Profiler Plus

Amplifikację *loci* wchodzących w skład zestawu Profiler Plus oraz rozdział produktów PCR prowadzono na automatycznym sekwenatorze DNA ABI310 w warunkach opisanych uprzednio (15,16). Do amplifikacji używano optymalnego stężenia DNA (1,25ng DNA/25uL mieszaniny PCR).

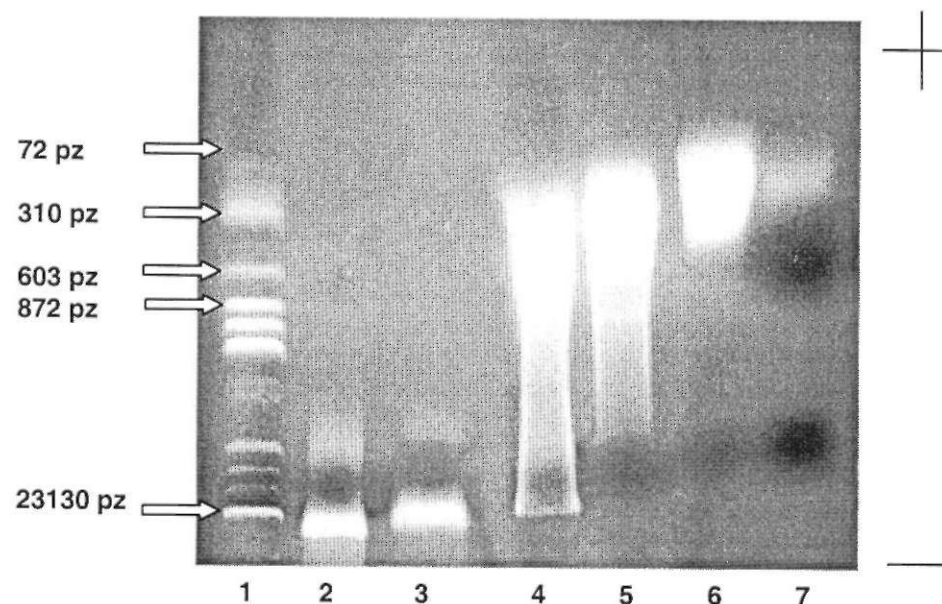
## Analiza stosunku alleli heterozygot w elektroforegramach

Zgodnie z zaleceniami producenta zestawu Profiler Plus jako wartość progową obecności allela w analizowanych elektroforegramach przyjęto sygnał >150 RFU (18). Stosunek alleli wyrażano procentowo przyjmując za 100% wysokość wyższego allel.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Degradacja DNA spowodowana działaniem czynników środowiskowych (takich jak np: temperatura, wilgotność, ziemia), w wyniku złego przechowywania śladów biologicznych czy też wynikająca z nieodpowiedniego doboru metody izolacji często uniemożliwia uzyskanie profilu DNA (7, 11, 12, 17). Generalnie, im mniejszy fragment DNA poddawany jest amplifikacji tym teoretycznie większa szansa na to, aby zachował się w stanie nienaruszonym, a tym samym nadawał się do amplifikacji (13). Jednak nie zawsze silne hamowanie amplifikacji długich fragmentów DNA, powstawanie artefaktów w postaci nierównomiernej amplifikacji alleli heterozygot (spadek alleli heterozygot poniżej 70%) czy też całkowite wypadanie jednego z alleli heterozygot jest efektem degradacji DNA. Wydajność amplifikacji oraz jakość profilu DNA zależy również od inhibitorów obecnych w ekstraktach DNA, nie usuniętych do końca podczas procesu izolacji i oczyszczania DNA (4, 6, 22, 18). Źródłem inhibicji reakcji PCR w przypadku śladów biologicznych mogą być różnego rodzaju barwniki tkanin, metale ciężkie, hem czy też kwas humusowy (3, 17, 23, 24). W niektórych przypadkach kontrola stopnia spolimeryzowania DNA pozwala jednak na ocenę czy obserwowane w profilu DNA artefakty lub zupełny brak amplifikacji jest efektem degradacji DNA czy też np. hamowania reakcji PCR przez inhibitory.

Jednym z założeń niniejszej pracy było zbadanie wpływu kontrolowanej laboratoryjnie degradacji DNA na amplifikację *loci* Profiler Plus. DNA poddano trawieniu DNA-zą przez różny okres czasu w celu uzyskania DNA o różnym stopniu degradacji. Efekt trawienia kontrolowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym (Rycina 1).



Ryc. 1. Kontrola trawienia/degradacji DNA DNA-zą I metodą elektroforezy w żelu agarozowym.

Fig. 1. DNase I digestion/degradation process controlled with agarose gel electrophoresis.

Ścieżka 1: standard wielkości DNA DR1gest III (od 72 pz do 23130 pz); Ścieżka 2: wysokocząsteczkowy DNA nie trawiony DNA-zą I; Ścieżka 3: DNA trawiony DNA-zą I przez 30 s.; Ścieżka 4: DNA trawiony DNA-zą I przez 1 min; Ścieżka 5: DNA trawiony DNA-zą I przez 2 min; Ścieżka 6: DNA trawiony DNA-zą I przez 4 min; Ścieżka 7: DNA trawiony DNA-zą I przez 10 min.

Lane 1. DNA length standard DR1gest III (72bp - 23130bp); Lane 2: high molecular DNA not digested with DNA-se I; Lane 3: DNA digested with DNA-se I for 30 sec; Lane 4: DNA digested with DNA-se I for 1 min; Lane 5: DNA digested with DNA-se I for 2 min; Lane 6: DNA digested with DNA-se I for 4 min; Lane 7: DNA digested with DNA-se I for 10 min.

Dla DNA trawionego DNA-zą przez 30 s. nie obserwowano większych różnic w jego jakości. Efekt degradacji DNA był wyraźniej widoczny dla próbki DNA trawionej przez 1, 2 i 4 min. W przypadku próbki trawionej przez 10 min

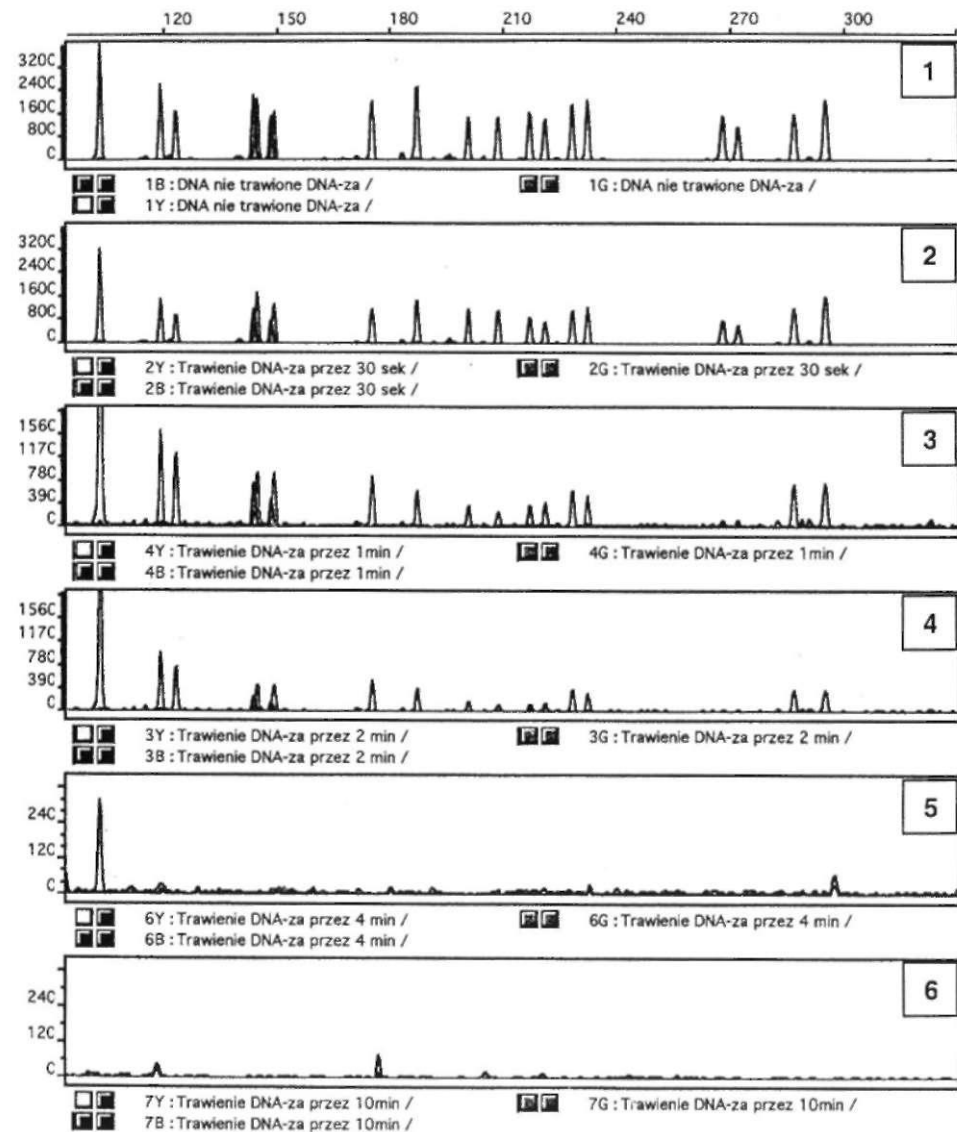
obserwowano bardzo silną degradację DNA. Każda próbka po trawieniu została poddana następnie amplifikacji w identycznych warunkach. Rycina 2 przedstawia efekt amplifikacji *loci* systemu Profiler Plus dla próbek DNA trawionych DNA-zą. Analiza produktów Profiler Plus w badanych próbkach wykazała, iż w przypadku próbki trawionej DNA-zą I przez 30 s. (niezdegradowany DNA; Ryc. 2, ścieżka 3) oraz dla próbki trawionej przez 1 min (wykazującej zdegradowanie DNA do wielkości poniżej ok. 800 pz; Ryc. 2, ścieżka 4) uzyskano amplifikację wszystkich badanych *loci*. Jednak w przypadku tej ostatniej próbki obserwowano osłabienie sygnałów amplifikacyjnych w porównaniu do próbki trawionej przez 30 s. Dla obu badanych próbek stosunek wysokości alleli obserwowanych heterozygot wynosił ponad 70%. W przypadku próbki trawionej przez 2 min, dla której obserwowano spadek stopnia spolimeryzowania DNA do wielkości poniżej ok. 600 pz (Ryc. 2, ścieżka 5) stwierdzono zanik amplifikacji *locus* D7S820 oraz znaczne osłabienie sygnałów amplifikacyjnych szczególnie dla fragmentów o największej masie cząsteczkowej (D18S51, HUMFGA, D13S317 oraz D21S11). W przypadku zdegradowania DNA do wielkości poniżej ok. 300pz (czas trawienia 4 min; Ryc. 2, ścieżka 6) uzyskano już tylko amplifikację genu *amelogeniny*. Natomiast dla próbki trawionej przez 10 min niemożliwe było zidentyfikowanie żadnego z badanych *loci*. Jest to wynikiem zdegradowania DNA do wielkości poniżej 100pz (Ryc. 2, ścieżka 7) a tym samym nie zachowanie się w całości fragmentów DNA zawierających nawet genu *amelogeniny*.

Bardzo podobne wyniki dla tego typu analizy przedstawił producent zestawu (18). Z kolei Wallin i wsp. (22) badając wpływ DNA degradowanego DNA-zą I na amplifikację tripleksu zawierającego D3S1358, HUMVWA, HUMFGA wykazali, że amplifikację wszystkich badanych *loci* można uzyskać dla próbki wykazującej spadek stopnia spolimeryzowania do wielkości ok. 500pz. Natomiast w przypadku zdegradowania DNA do wielkości ok. 200pz możliwe było zidentyfikowanie tylko *locus* D3S1358 i HUMVWA dla których obserwowali jednak znaczne osłabienia sygnałów amplifikacyjnych.

Drugim celem pracy było badanie wpływu rodzaju metody ekstrakcji DNA ze sproszkowanej krwi o różnym wieku na wydajność i jakość amplifikacji *loci* Profiler Plus.

W tym celu z trzech próbek sproszkowanej krwi przechowywanej w warunkach temperatury i wilgotności pokojowej przez 1 miesiąc oraz 10 i 70 lat izolowano DNA trzema różnymi metodami. Zastosowano metodę z F/CH, Chelex-100 oraz jeden z komercyjnych zestawów do izolacji DNA. Tabela I przedstawia porównanie wydajności ekstrakcji DNA ze sproszkowanej krwi przechowywanej przez różny okres czasu.

Zdecydowanie największą wydajność ekstrakcji DNA uzyskano metodą F/CH (Tab. I). Metoda z Chelex-100 pozwoliła na uzyskanie ok. 20-krotnie mniejszej ilości DNA, niż metoda F/CH. Podobną wydajność uzyskano dla komercyjnego zestawu w przypadku krwi przechowywanej przez 1 miesiąc, natomiast dla 10- i 70-letniej krwi nie określono stężenia uzyskanego DNA, gdyż jego ilość była poniżej stężenia możliwego do wykrycia metodą QuantiBlot z zastosowaniem chemiluminescencji (mniej niż 78 pg DNA).



Ryc. 2. Amplifikacja loci Profiler Plus z DNA trawionego DNA-zą I. Panel 1 - DNA nie trawiony; Panel 2 - trawienie przez 30 s.; Panel 3 - trawienie przez 1 min.; Panel 4 - trawienie przez 2 min.; Panel 5 - trawienie przez 4 min.; Panel 6 - trawienie przez 10 min.

Fig. 2. Amplification of Profiler Plus loci of matrix DNA digested with DNA-se I. Panel 1 DNA not digested; Panel 2 - digestion for 30s.; Panel 3 - digestion for 1 min.; Panel 4 - digestion for 2 min.; Panel 5 - digestion for 4 min.; Panel 6 - digestion for 10 min.

Tabela I. Porównanie wydajności ekstrakcji DNA ze sproszkowanej krwi przechowywanej przez różny okres czasu.

Table I. Comparison of DNA yield after extraction using three different extraction methods.

Metoda izolacji Extraction method	Uzyskana ilość DNA w ng / uL * DNA yield in ng/uL		
	1 miesięczna krew Blood stored for 1 month	10-letnia krew Blood stored for 10 years	70-letnia krew Blood stored for 70 years
FENOL-CHLOROFORM PHENOL-CHLOROPHORM	10	6.5	4.6
CHELEX-100	0.7	0.5	0.3
KOMERCYJNY ZESTAW COMMERTIAL KIT	0.6	*	*

\* - średnia z pięciu oznaczeń (average value from 5 assays)

\* - poniżej wykrywalnego stężenia 78 pg DNA metodą QuantiBlot (PŁ);  
concentration below detectable level of 78pg of DNA using QuantiBlot kit (PE).

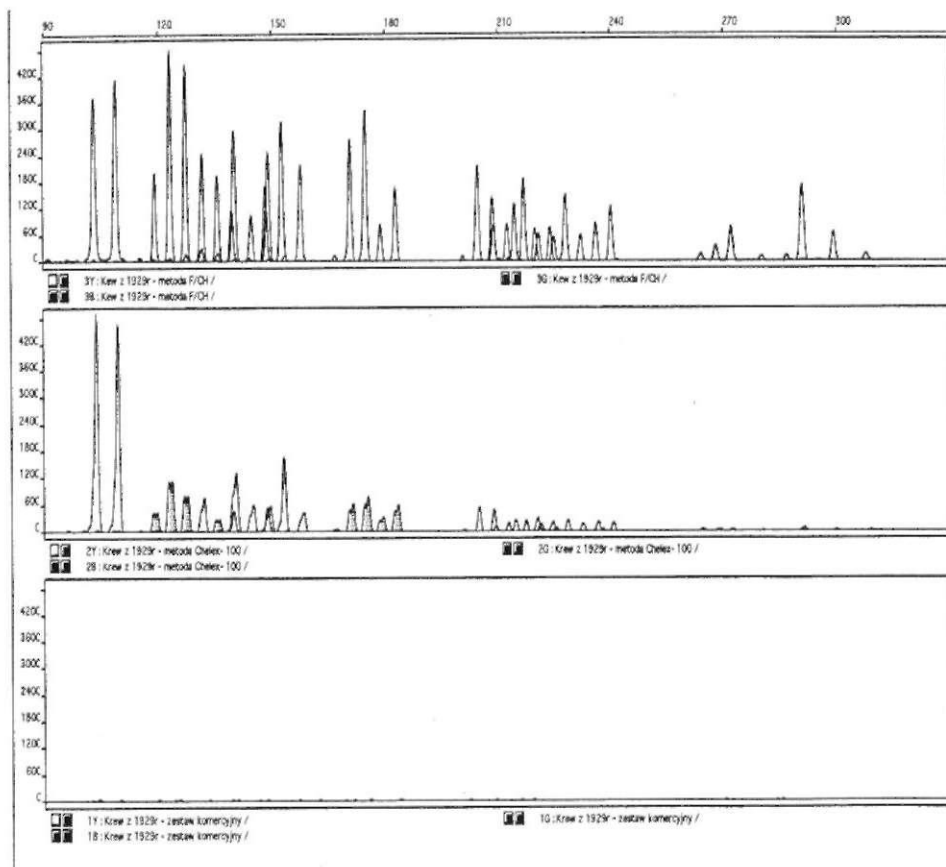
W wyniku poddania amplifikacji DNA wyizolowanego z krwi przechowywanej przez 1 miesiąc dla każdej metody izolacji uzyskano kompletny profil DNA o porównywalnym sygnale amplifikacyjnym (elektroforegramów rozdziału tych produktów PCR nie przedstawiono w niniejszej pracy).

W przypadku DNA wyizolowanego z krwi przechowywanej przez 10 lat zarówno dla metody F/CH, jak i Chelex-100 uzyskano amplifikację wszystkich *loci* o zbalansowanym sygnale amplifikacyjnym. Dla DNA wyizolowanego komercyjnym zestawem w ogóle nie uzyskano amplifikacji (elektroforegramów rozdziału tych produktów PCR nie przedstawiono).

Poddanie amplifikacji DNA wyizolowanego z krwi przechowywanej przez 70 lat wykazało, iż zdecydowanie najlepsze wyniki daje metoda F/CH (Ryc. 3, panel 1), w przypadku której otrzymano zbalansowany sygnał amplifikacyjny wszystkich *loci*. Na podstawie przeprowadzonej ilościowej analizy profili stwierdzono, iż badana krew jest mieszaniną materiału pochodzącego od co najmniej 3 osób.

W przypadku DNA wyizolowanego metodą Chelex-100 (Ryc. 3, panel 2) uzyskano znacznie słabszy sygnał amplifikacyjny badanych *loci* z preferencyjną amplifikacją fragmentów DNA o mniejszej masie cząsteczkowej (genu *amelogeniny* oraz *loci*: D3S1358, D8S1179, D5S818 i HUMVWA), dla których obserwowano frakcje typu N i N+1. Nie uzyskano amplifikacji dłuższych fragmentów DNA (*loci*: D7S820, D18S51). Dla komercyjnego zestawu (Ryc. 3, panel 3) nie uzyskano amplifikacji żadnego z *locus*.

Wydajna ekstrakcja DNA z plam biologicznych jest jednym z krytycznych etapów procesu badania DNA w aspekcie sadowym. Najlepsze wyniki (największy odzysk DNA) dla każdej z badanych krwi uzyskano metodą F/CH (Tab. 1). Jednocześnie stwierdzono, iż wyniki amplifikacji *loci* systemu Profiler Plus w



Ryc. 3. Wynik amplifikacji loci Profiler Plus z trzech próbek DNA izolowanych ze sproszkowanej krwi o wieku 70 lat. Panel górny izolacja DNA metodą F/CH, panel środkowy metodą Chelex 100, piki podświetlone przedstawiają fragmenty typu N+1; panel dolny komercyjnym zestawem do izolacji DNA.

Fig. 3. Results of Profiler Plus loci amplification from DNA isolated from 70 year old blood crusts. Top panel isolation using the F/CH method, Middle panel isolation using the Chelex-100 method; Bottom panel isolation using the commercial kit.

przypadku bardzo starej krwi (70-letniej) były lepsze dla metody F/CH niż dla metody Chelex-100. Podkreślenia wymaga fakt, iż dla metody Chelex-100, podobnie jak i dla F/CH, uzyskano wystarczającą ilość DNA a mimo to obserwowano brak amplifikacji fragmentów DNA o największej masie cząsteczkowej. Dlatego też należy przypuszczać, iż spadek wydajności amplifikacji spowodowany był najprawdopodobniej obecnością w ekstrakcie DNA inhibitorów polimerazy DNA nie usuniętych podczas procesu izolacji DNA i/lub degradacji

izolowanego DNA (24). Podobne obserwacje dla metody Chelex-100 przedstawił Lygo i wsp. (9). Podają oni, iż w przypadku zastosowania metody Chelex-100 do izolacji DNA z bardzo starych próbek krwi obserwowano często spadek wydajności amplifikacji długich fragmentów DNA.

## PIŚMIENNICTWO

I. Bontemps I., Houssier O, Frederig E.: Physico-chemical study of the complex of „33258 Hoechst” with DNA and nucleohistone. *Nucleic Acids Res.*, 1975, 2: 971-984. -2. Brunk C. F., Jones K. D., James T. W. : Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Bioch.* 1979, 92: 497-500. -3. Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W.: DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis.* 1999, 20: 1722-1728. -4. Comey O, Koons B. W., Presley L. A., Smeric J. B., Sobieralski O A., Stanley D. M and Baechtel F. S.: DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.*, 1994, 39: 1254-1269. -5. Decorte R., Cassiman J. J.: Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. *J Med. Genet.* 1993, 30: 625-33. -6. Fregeau Ch. J., Bowen K. L, Fourney R. M.: Validation of Highly Polymorphic Fluorescent Multiplex Short Tandem Repeat Systems Using Two Generations of DNA. *J Forensic Sci.* 1999, 44:133-166.-7. Gili P., Lygo J. F., Fower S. J., Werrett D. J.: An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes. *Electrophoresis.* 1987, 8: 35-38. -8. Kimpton O P, i wsp.: Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Meth. AppL* 1993, 3:13-22. -9. Lygo J. E., Johnson P. E., Holdaway D. J., Woodroffe S., Whitaker J. P., Clayton T. M., Kimpton O P., Gili P.: The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Leg Med.* 1994, 107:77-89. -10. Maciejewska A., Pawłowski R.: Wpływ metody izolacji DNA na stosunek wysokości alleli X i Y genu *amelogeniny* systemu Profiler Plus. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2001, LI, 97-103.

II. McCabe E. R. B., Huang Shu-Zhen., Seltzer W. K., Law M. L: DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential application to newborn screening. *Hum Genet.* 1987, 75: 213-216. -12. Madisen L., Hoar D. I., Holroyd O D., Crisp M., Hodes M. E.: DNA banking: the effect of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med. Genet.* 1987, 27: 379-390. -13. Moerkerk P. T., Kessels H. J., Kate J. T., de Goeij A. F., Bosman F. T.: Southern and dot-blot analysis of DNA from formalin-fixed, paraffin-embeddet tissue samples from colonie carcinomas. *Virchows Archiv b Celi Pathol.* 1990, 58: 351-355. -14. Morgante M., Olivieri A. M.: PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics *Plant J.* 1993, 3: 175-82. -15. Pawłowski R, Maciejewska A.: Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in Northern Poland. *Int J Leg Med.*, 2000, t14, 45-49. -16. Pawłowski R. HUMFIBRA allele distribution in northern Poland using capillary electrophoresis. *Int J Leg Med.* 1999, 112:139-141 -17. Pawłowski R., Welz A., Burkiewicz A. (1994) Porównanie wydajności i jakości DNA izolowanego

z krwi ludzkiej trzema różnymi metodami. *Ann. Acad. Med.* 24: 23-29. -18. Perkin Elmer. Applied Biosystem. User's manual, AmpFISTR Profiler Plus, PCR Amplification Kit. 1997. -19. Schmerer W., Hummel S., Herman B.: Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis.*, 1999, 20: 1712-1716. -20. Sparkes R., Kimpton C, Watson S., Oldroyd N., Clayton T., Barnett L, Arnold J., Thompson C, Hale R., Chapman J., Urquhart A., Gili P. : The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I) Mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int J Leg Med.* 1996, 109:186-194. -21. Technical Working Group on DNA Analysis Methods.: Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime Laboratory Digest.*, 1995, 22: 21-43. -22. Wallin J. M., Walsh P. S., Buonocristiani R., Lazaruk.K. D., Fildes N., Holt C. L: TWGDAM Validation of the AmpFISTR Blue PCR Amplification Kit for Forensic Casework Analysis. *J Forensic Sci.*, 1998, 43: 854-870. -23. Walsh S., Metzger D. A., Higuchi R.: Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991, 10:506-513. -24. Walsh S., Higuchi R.: PCR inhibition and bloodstains. *Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis.* Ouantico. 19-23 Czerwiec 1989. 281-282. -25. Wiegand P., Schurenkamp M., Schutte U.: DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. *Int. J Leg Med.*, 1992, 10: 359-360.

Adres pierwszego autora:  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
ul. Curie-Skłodowskiej 3A  
80-210 Gdańsk

**Zofia Szczerkowska, Joanna Wysocka, Ewa Kapińska, Lidia Cybulska**

## Genetyczna zmienność w obrębie 14-tu loci typu VNTR w populacji Polski Północnej

### Genetic variation at 14 VNTR loci in the North Poland population

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

W pracy przedstawiono wyniki badań populacyjnych nad zróżnicowaniem fenotypowym w obrębie 14-tu loci typu AmpFLP i STR. DNA wyizolowano z krwi pełnej pobranej od dorosłych niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej. Amplifikację analizowanych fragmentów DNA przeprowadzano zarówno w pojedynczych reakcjach PCR (loci: D1S80, D17S5, F13B, FGA, LPL) jak i metodą kompleksowego PCR (triplexy: CTT, FFv i DDD.) Produkty PCR rozdzielano na natywnych i denaturujących żelach poliakrylamidowych i barwiono metodą srebrową. W oparciu o uzyskane częstości alleli obliczono wybrane parametry statystyczne (PD, PIC, PE, PM) wskazujące na wysoką przydatność analizowanych loci w medycynie sądowej.

The main aim of the paper was present the results of population data on genetic variation at 14 VNTR loci AmpFLP and STR types. DNA was isolated from blood samples taken from adult unrelated individuals of North area of Poland by non-enzymatic and non-organic method. Amplification was performed using both single PCR reaction (D1S80, D17S5, F13B, FGA, LPL) and multiplex PCR method (triplex: CTT, FFv, DDD). PCR products were separated using native and denaturate electrophoresis conditions and subsequent silver staining. Alleles were identified by comparing with allelic ladders. No deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium were observed. Statistical parameters (PD, PIC, PE, PM) showed that examined systems are useful for forensic medicine.

**Słowa kluczowe:** PCR, AmpFLP, STR, częstość alleli.

**Key words:** PCR, AmpFLP, STR, allele frequencies.

Allele wysoce polimorficznych loci typu VNTR obejmujące zarówno minisatelitarne układy AmpFLP jak i mikrosatelitarne sekwencje repetytywne DNA typu STR określane metodą PCR znalazły szerokie zastosowanie w medycynie sądowej, zarówno w analizie śladów biologicznych jak i w dochodzeniu ojcostwa (4, 6, 14).