

STR loci HUMF13A01, HUMFXIIB, HUMLIPOL, HUMTH01, HUMTPOX and HUMVWA31 in Japanese population". 1996, *Int. J. Leg. Med.* 109, 34-36. -14. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Jezierski G., Maciejewska A., Paszkowska R., Reichert M.: „Genetyka populacyjna dziewięciu loci typu STR z zestawu Profiler Plus w próbce populacji z obszaru Polski". *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2000, L, 207-213. -15. Pestoni C, Garcia-Rivero A., Bellas S., Lareu M.V., Rodriguez-Calvo M.S., Barros F., Muhoz I., Carracedo A.: „Allele frequency distribution of 15 PCR-based DNA polymorphisms in the population of Galicia (NW SPAIN)". -16. Turowska B., Sanak M., Opolska-Bogusz B.: „Wstępne badania populacji Polski Południowej w zakresie 10 STR loci z zestawem AmpFISTR SGM Plus". *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 2001, L. 93-96. -17. Santos S., Budowle B., Smerick J., Keys K., Moretti T.: „Portuguese population data on six short tandem repeat loci - CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA and FGA". 1996, *Forens. Sc. Int.* 83-229. -18. Takeshita H., Meyer E., Brinkmann B.: „The STR Loci HUM hTPO and HumLPL: population genetic data in eight populations". -19. Xiao F.X., Gilissen A., Gu X.X., Cassiman J.J., Decorte R.: „Genetic data obtained for two Chinese Han populations with a quadruplex fluorescent STR typing system (HUMVWA, HUMTH01, D21S11 and HPRT)". 1998, *Int. J. Leg. Med.* 111, 343-345. -20. Zupanic J., Balazic J., Kornel R.: „Analysis of nine short tandem repeat (STR) loci in Slovenian Population". 1998, *Int. J. Leg. Med.*, 111, 248.

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

**Jakub Czarny, Danuta Miścicka-Śliwka, Marcin Woźniak,
Tomasz Grzybowski, Jarosław Bednarek**

**Polimorfizm *loci* VNTR: D7S21, D12S11 i D1S7
w populacji kujawsko-pomorskiej**

**Polymorphism of the VNTR loci: D7S21, D12S11 and D1S7 in
the Pomerania-Kujawy region of Poland**

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

W pracy przedstawiono częstości alleliczne w loci VNTR: D7S21, D12S11 i D1S7 w populacji regionu kujawsko-pomorskiego. Obserwowany rozkład częstości genotypów w analizowanych loci jest zgodny z rozkładem częstości genotypów wyznaczonym na podstawie częstości allelicznych według prawa Hardy'ego-Weinberga. Obliczone dla poszczególnych loci: heterozygotyczność, wskaźnik zawartości informacji polimorficznej, siła dyskryminacji, teoretyczna szansa wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny i średnia teoretyczna szansa ojcostwa wskazują na dużą przydatność analizowanych układów dla potrzeb medycyny sądowej.

This paper presents the results of a population study for 3 VNTR loci: D7S21, D12S11 and D1S7. Blood samples were obtained from healthy unrelated individuals from the Pomerania-Kujawy region of Poland. DNA was extracted from blood by organic extraction. 5 ug of genomic DNA was digested with Hinf I and resolved by agarose gel electrophoresis. Loci D7S21, D12S11 and D1S7 was analysed by Southern blot techniques using DNA probes: MS 31, MS 43A and MS 1. Hybridization was performed according to the manufacturers' instructions. DNA fragment size was estimated by measuring their mobility relative to DNA NICE DNA Analysis Ladder using BKA Fingerprint v 2.1 software. DNA fragments were grouped using fixed bin methods to a size class (bins); the boundaries of the bins were determined by using a set of size-standard markers. The allele distributions were in accordance with Hardy-Weinberg expectations. High values of heterozygosity, polymorphic Information contents, power of discrimination, mean exclusion chance and typical paternity index demonstrate that these systems are valuable tools for both paternity testing and routine forensic casework.

Słowa kluczowe: DNA, VNTR, genetyka populacyjna.
Key words: DNA, VNTR, population genetics.

WSTĘP

Wśród 3 miliardów par zasad składających się na genom człowieka znajdują się sekwencje charakteryzujące się dużą zmiennością międzypersonalną czyli polimorfizmem. Wiele z nich to tzw. sekwencje powtarzające się, których zmienność wynika z różnej liczby powtórzeń jednostki repetytywnej. Jednym z rodzajów sekwencji powtarzających się są sekwencje minisatelitarne, zwane także VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) (11). Odkrycie przez Jeffreys'a sond molekularnych umożliwiających analizę, w oparciu o technikę Southern blot, polimorfizmu wielu *loci* VNTR jednocześnie (analiza multilocus) umożliwiło „zdejmowanie” pierwszych genetycznych „odcisków palców” (DNA fingerprints) (6). Technika ta szybko znalazła zastosowanie w badaniach spornego ojcostwa (7) analizie pokrewieństwa wykonywanej dla celów imigracyjnych (5) czy identyfikacji osobniczej (4). Z uwagi na nieswoistość gatunkową i brak możliwości dokładnego określenia analizowanych loci w tworzeniu „fingerprintów DNA” sondy *multilocusowe* zaczęto zastępować specyficznymi gatunkowo sondami *jednocusowymi* (14). Prócz medycyny sądowej znalazły one zastosowanie w mapowaniu sprzężeń genomu człowieka (10, 12).

Przed wprowadzeniem jakiegokolwiek markera do badań wykonywanych dla potrzeb identyfikacji osobniczej i dochodzenia spornego ojcostwa konieczna jest dokładna charakterystyka jego polimorfizmu w danej populacji. W niniejszej pracy przedstawiono polimorfizm loci VNTR D7S21, D12S11 i D1S7 (14) w populacji kujawsko-pomorskiej.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły łokciowej, w zależności od badanego *locus* od 466-551 zdrowych, dorosłych, niespokrewnionych osób, mężczyzn i kobiet z regionu kujawsko-pomorskiego.

DNA izolowano z 5 ml krwi obwodowej tzw. „metodą organiczną” (13). Stężenie i czystość DNA oceniano metodą spektrofotometryczną wykorzystując „GeneQuant DNA/RNA Calculator” (Pharmacia-Biotech). 5 ng DNA poddawano trawieniu endonukleazą Hinf I (Promega Co.) według zaleceń producenta. Produkty trawienia rozdzielano w 0.9% żelu agarozowym (Promega Co.) odrodznię rozdzielano długości 25 cm w buforze 1XTBE przez 42 godziny przy napięciu 1 V / cm z recyrkulacją buforu. Po zakończeniu rozdzielania DNA poddawano fragmentacji w 0.25 M HCl, następnie denaturowano (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) i neutralizowano (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4). DNA przenoszono na nylonową membranę neutralną (Biodyne A, GibcoBRL) metodą kapilarną w buforze 10XSSC przez 16 godzin i wiązano z membraną poprzez naświetlanie promieniami UV przez 3 minuty. Hybrydyzację prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta wykorzystując sondy molekularne: NICE OLIGO DNA PROBE MS31 (Cellmark Diagnostics) dla analizy locus D7S21, NICE OLIGO DNA PROBE MS43A (Cellmark Diagnostics) dla analizy locus D12S11 i NICE

OLIGO DNA PROBE MS1 (Cellmark Diagnostics) dla analizy locus D1S7. Detekcję chemiluminescencyjną wykonano zgodnie z protokołem producenta wykorzystując jako substrat LumiPhos 480 a produkty reakcji uwidaczniano na błonie rentgenowskiej (FOTON Warszawa). Wielkości fragmentów restrykcyjnych określono względem wzorca długości DNA NICE DNA Analysis Ladder (GibcoBRL), uwidocznionego dzięki hybrydyzacji z sondą NICE OLIGO DNA PROBE MW 100 (Cellmark Diagnostics) przy użyciu techniki komputerowej analizy obrazu z zastosowaniem videoscannera wraz z oprogramowaniem BKA Fingerprint v 2.1 firmy Biotec-Fisher GmbH.

Fragmenty pogrupowano, stosując metodę „fixed-bins” (3), pod względem wielkości łącząc je w grupy (biny) odpowiadające przedziałom markera wielkości DNA (NICE DNA Analysis Ladder). Na podstawie uzyskanych wyników, wykorzystując program „Genetic Data Analysis” (9), wyznaczono dla analizowanych *loci*: heterozygotyczność oczekiwaną (He) i heterozygotyczność obserwowaną (Ho). Parametry charakteryzujące przydatność analizowanych loci dla potrzeb medycyny sądowej, tj. zawartość informacji polimorficznej (PIC - Polymorphic Information Content) (1), siłę dyskryminacji (PD - Power of Discrimination) (8), teoretyczną szansę wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny (MEC - Mean Exclusion Chance) i teoretyczną średnią szansę ojcostwa (TPI - Typical Paternity Index) (2) wyznaczono wykorzystując program komputerowy „PowerStats” (program dostępny w sieci „Internet”: www.promega.com). Zgodność obserwowanych rozkładów częstości genotypów w poszczególnych *loci* z prawem Hardy'ego-Weinberga testowano obliczając prawdopodobieństwo zgodności wyliczone na podstawie testu dokładnego Fischera (exact p) w oparciu o program komputerowy „Genetic Data Analysis” (9).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Częstości alleliczne w *loci* D7S21, D12S11 i D1S7, heterozygotyczność oczekiwaną (He), heterozygotyczność obserwowaną (Ho), zawartość informacji polimorficznej (PIC), siłę dyskryminacji (PD), teoretyczną szansę wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny (MEC) i teoretyczną średnią szansę ojcostwa (TPI) oraz prawdopodobieństwo zgodności rozkładu obserwowanych częstości genotypów z rozkładem częstości genotypów wyznaczonych w oparciu o częstości alleliczne według reguły Hardy'ego-Weinberga na podstawie testu dokładnego Fischera (exact p) przedstawiono w tabeli I.

Obserwowane w analizowanych *loci* rozkłady częstości genotypów są zgodne ($p > 0.05$) z rozkładami wyznaczonymi w oparciu o częstości alleliczne według reguły Hardy'ego-Weinberga.

Tabela I. Polimorfizm loci VNTR D7S21, D12S11 i D1S7 w populacji kujawsko-pomorskiej. N - ilość analizowanych genotypów, He - heterozygotyczność oczekiwana, Ho - heterozygotyczność obserwowana, PIC - zawartość informacji polimorficznej, PD - siła dyskryminacji, MEC - teoretyczna szansa wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny, TPI - teoretyczna średnia szansa ojcostwa, exact p - prawdopodobieństwo zgodności obserwowanego rozkładu częstości genotypów z prawem Hardy'ego-Weinberga.

Table I. Allele frequencies for VNTR loci: D7S21, D12S11 and D1S7 I in Caucasians from the Pomerania-Kujawy region of Poland. N - number of individuals analysed - He - expected heterozygosity, Ho - observed heterozygosity, PIC - polymorphic information content, PD - power of discrimination, MEC - mean exclusion chance, TPI - typical paternity index, p - probability values of Exact tests for Hardy-Weinberg disequilibrium.

Długość DNA DNA fragment size range	D7S21 N = 551		D12S11 N = 549		D1S7 N = 466	
	ilość number of alleles	częstość frequency	ilość number of alleles	częstość frequency	ilość number of alleles	częstość frequency
1-910	-	-	-	-	1	0.001
911-993	-	-	-	-	-	-
994-1176	-	-	-	-	1	0.001
1177-1287	-	-	-	-	1	0.001
1288-1431	-	-	-	-	4	0.004
1432-1568	-	-	-	-	4	0.004
1569-1672	-	-	-	-	4	0.004
1673-1861	-	-	-	-	16	0.017
1862-2015	-	-	-	-	14	0.015
2016-2213	-	-	-	-	27	0.029
2214-2433	-	-	-	-	18	0.019
2434-2650	-	-	-	-	21	0.023
2651-2876	-	-	1	0.001	28	0.030
2877-3101	-	-	4	0.004	25	0.027
3102-3397	2	0.002	2	0.002	39	0.042
3398-3812	11	0.010	6	0.005	58	0.062
3813-4333	28	0.025	-	-	84	0.090
4334-4716	27	0.025	59	0.054	54	0.058
4717-5415	99	0.090	103	0.094	86	0.092
5416-5861	112	0.102	39	0.036	51	0.055
5862-6442	146	0.132	3	0.003	38	0.041
6443-7421	320	0.290	142	0.129	84	0.090
7422-8271	138	0.125	180	0.164	49	0.053
8272-9416	181	0.164	355	0.323	72	0.077
9417-11919	36	0.330	197	0.179	90	0.097
11920-15004	1	0.001	1	0.001	26	0.028
15005-22621	1	0.001	1	0.001	34	0.036
>22621			5	0.005	3	0.003
Z	1102	1	1098	1	932	1

Ciąg dalszy tabeli

Długość DNA DNA fragment size range	D7S21 N = 551		D12S11 N = 549		D1S7 N = 466	
	ilość number of alleles	częstość frequency	ilość number of alleles	częstość frequency	ilość number of alleles	częstość frequency
He		0.835		0.807		0.939
Ho		0.840		0.801		0.948
PIC		0.82		0.78		0.93
PD		0.953		0.936		0.991
MEC		0.676		0.602		0.895
TPI		3.13		2.52		9.71
Exact p		0.403438		0.162188		0.311875

Z analizowanych *loci* najwyższym polimorfizmem, przejawiającym się nie tylko ilością alleli, ale przede wszystkim zawartością informacji polimorficznej i heterozygotycznością oraz największą przydatnością dla potrzeb identyfikacji osobniczej (wyrażoną siłą dyskryminacji) i dochodzenia spornego ojcostwa (wyrażoną teoretyczną szansą wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny i teoretyczną średnią szansą ojcostwa) charakteryzuje się *locus* D1S7. Analogiczne parametry dla dwóch pozostałych *loci* są niższe i dość do siebie zbliżone, chociaż *locus* D7S21 charakteryzują nieco wyższe aniżeli dla *locus* D12S11 wartości wszystkich wyznaczonych parametrów.

Łączna przydatność analizowanych *loci* dla potrzeb identyfikacji osobniczej wyraża się siłą dyskryminacji równą 0.999973. Łączna teoretyczna szansa wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny dla analizowanych *loci* wynosi 0.986 a teoretyczna średnia szansa ojcostwa 76.79.

Uzyskane wyniki wskazują, że analiza polimorfizmu *loci* D7S21, D12S11 i D1S7 może być cennym narzędziem w identyfikacji osobniczej i dochodzeniu spornego ojcostwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1998, 32, 314-331.
2. Brenner CJ, Morris: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. 21-53 w *Proceedings for the International Symposium on Human Identification* 1989. Promega Corporation, Madison, WI.
3. Budowle B, Giusti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fournery RM, Dwight E, Adams DE, Presley LA, Deadman HA, Monson KL: Fixed-Bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparison. *Am J Hum Genet* 1991, 48, 841-855.
4. Gili P, Jeffreys AJ, Werrett DJ: Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature* 1985, 318, 577-579.
5. Jeffreys AJ,

Brookfield JFY, Semeonoff R: Positive identification of an immigration test-case using human DNA Fingerprints. *Nature* 1985, 317, 818-819. -6. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985, 314, 67-73. -7. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 1985, 316, 76-79. -8. Jones DA: Blood samples: Probability of discrimination. *J Forensic Sci Soc* 1972, 12, 355-359. -9. Lewis PO, Zaykin D Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0. Free program distributed by the authors over the internet from the GDA Home Page at <http://chee.unm.edu/gda/>. -10. Nakamura Y, Leppert M., O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M., Martin C, Fujimoto E, Hoff M., Kumlin E, White R: Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987, 235,1616-1622.

11. Napierała M: Sekwencje powtarzające się w genomie człowieka w Genom człowieka - największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej - praca zbiorowa pod redakcją W. Krzyżosiaka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, 56-69. -12. Napierała M: Mapa genetyczna genomu człowieka w Genom człowieka - największe wyzwanie współczesnej genetyki i medycyny molekularnej - praca zbiorowa pod redakcją W. Krzyżosiaka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997, 70-88. -13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Analysis and cloning of eucaryotic genome DNA. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 16-22. -14. Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ: Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet* 1987, 51, 269-288.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. M. Curie Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz

Marcin Woźniak, Anna Skowron, Jarosław Bednarek

Ocena polimorfizmu *loci* STR chromosomu Y: DYS19, DYS 389I, DYS389II i DYS 390 w populacji Kujawsko-Pomorskiej

Polymorphism of Y-STR *loci*: DYS19, DYS 389I, DYS389II i DYS 390 in Pomerania - Kujawy Region of Poland

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

W pracy określono częstości alleli *loci* DYS19, DYS389I, DYS389II i DYS390. Obliczono zróżnicowanie genetyczne tych *loci* oraz podjęto próbę oceny wewnątrzpopulacyjnych zależności między haplotypami poprzez określenie podobieństwa alleli składających się na poszczególne haplotypy. Porównano również częstości haplotypów populacji kujawsko-pomorskiej z innymi populacjami europejskimi.

This paper is a study of four Y-STR *loci*: DYS19, DYS389I, DYS389II and DYS390 in the population of Pomerania Kujawy region of Poland. The *loci* were amplified together in a quadruplex reaction, amplification products were separated on ABI 377 sequencer and genotyped. Allelic frequencies as well as gene diversity were assessed together and intra-population haplotype similarities. The population's haplotype frequencies were compared with those of other European populations.

WSTĘP

Loci STR zlokalizowane na chromosomie Y (Y-STR) stanowią jedno z najnowszych narzędzi stosowanych w analizie polimorfizmu DNA człowieka. Dzięki dziedziczeniu wyłącznie w linii męskiej i silnemu sprzężeniu genetycznemu połączonemu z wysokim polimorfizmem stanowią one cenne uzupełnienie metod stosowanych dotychczas w badaniach nad rozprzestrzenieniem się ludzkich populacji i zasiedlaniem Ziemi przez nasz gatunek (1). Coraz większego znaczenia nabierają również zastosowania układów mikrosatelitarnych chromosomu Y w medycynie sądowej, szczególnie w przypadkach gwałtów zbiorowych i w szczególnych sprawach związanych z dochodzeniem spornego ojcostwa. Zastosowanie *loci* Y-STR w medycynie sądowej wymaga dokładnego