

**Dorota Piasecka-Pazik, Zofia Szczerkowska**

## Określanie polimorficznych sekwencji DNA typu STR-PCR w rozłożonych tkankach ludzkich

### Determination of polymorphic DNA sequences STR-PCR in decomposed human tissues

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

Określano profile DNA tkanek miękkich poddanych procesowi rozkładu (serce, nerki i wątroba). Tkanki pobrano podczas sekcji zwłok. Kontrolnie profile DNA oznaczono w krwi denatów. Wyizolowany DNA poddano amplifikacji przy użyciu zestawu GenePrint®STR Multiplex (CSF1PO, TPOX, TH01) f-my Promega, oraz AmpFfSTR® Identifiler™ f-my Applied Biosystems. Produkty PCR poddano rozdzielaniu na żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, równolegle stosowano elektroforezę kapilarną (ABI 310). Dokonano porównania wyników uzyskanych w obu metodach. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR triplexu CTT umożliwił uzyskanie czytelnego obrazu alleli w odniesieniu do DNA ekstrahowanego z tkanek rozłożonych, zwłaszcza z serca i nerek, oraz krwi. Detekcja produktów PCR z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej pozwoliła na prawidłową interpretację alleli 16-tu loci wchodzących w skład zestawu AmpFfSTR® Identifiler w DNA izolowanym z serca, nerek i krwi. Podobnie jak w metodzie manualnej gorsze wyniki uzyskano w przypadku DNA izolowanego z wątroby. Tkanki miękkie, również rozłożone gnilnie mogą stanowić przydatne źródło genomowego DNA w badaniach identyfikacyjnych i w ustalaniu spornego ojcostwa.

This paper reports the possibility of DNA profiling obtained from soft tissues influenced by the decomposition process: heart, kidney, liver collected during autopsy. As a control DNA, profile from blood was determined. DNA was extracted by the phenol-chloroform method. Amplification was performed with the use of the GenePrint®STR Multiplex (CSF1PO, TPOX, TH01) system, Promega and AmpFfSTR® Identifiler™, Applied Biosystems. PCR products of the CTT system were separated by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gels and visualized by silver staining. The 16 loci of AmpFfSTR® Identifiler™ products were analyzed by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 310 sequencer. The results from both methods were compared. Electrophoresis of the CTT products showed clear results for DNA extracted from blood and decomposed tissues, particularly from the heart and kidney. The capillary electrophoresis method gave a positive signal for all 16 loci of AmpFfSTR® Identifiler™ for DNA extracted from heart, kidney and blood. Worse results similar to the manual method were obtained for DNA extracted from the liver. The soft tissues, also decomposed by putrefaction can be a useful source of genomic DNA in personal identification and paternity testing

Słowa kluczowe: tkanki rozłożone, triplex STR, AmpF<sup>®</sup>STR Identifier™

**Key words: decomposed tissues, triplex STR, AmpF<sup>®</sup>STR Identifier™**

Polimorfizm loci STR z sekwencją repetytywną długości 1-6 par zasad (pz) stanowi marker genetyczny najczęściej stosowany w medycynie sądowej. Mikrosateliterne systemy typu STR składają się z niewielkich fragmentów DNA od 100 do ok. 300 pz, można je więc amplifikować także wtedy, gdy DNA jest częściowo zdegradowany. Sekwencje te przydatne są m.in. w identyfikacji osobniczej i dochodzeniu spornego ojcostwa, zwłaszcza w tych przypadkach gdy dysponujemy np. wyłącznie zmienionymi gnilnie tkankami. Jeżeli istnieje możliwość zabezpieczenia takich tkanek i pobrania ich do badań, gdy nie wystąpiło jeszcze ich całkowite rozłożenie, czy gnicie mogą one również służyć do ekstrakcji DNA. Jest to materiał łatwiejszy w przygotowaniu we wstępnych etapach ekstrakcji genomowego DNA, w porównaniu np. z materiałem kostnym, który wymaga wcześniejszego etapu odwapniania i długotrwałego procesu trawienia.

## IZOLACJA ORAZ OCENA JAKOŚCI I ILOŚCI DNA

Materiałem badań były tkanki: serce, nerka, wątroba pobrane podczas sekcji zwłok od 10 osób. Jako materiał porównawczy do badań pobierano również krew sekcyjną. Tkanki pozostawiono w zamkniętym pojemniku w temperaturze pokojowej przez 7 dni w celu ich częściowego rozłożenia. Z krwi sekcyjnej i tkanek izolowano DNA stosując klasyczną metodę fenol-chloroform. Wyizolowany DNA oczyszczono dodatkowo na mikro kolumienkach Microcon f-my Millipore w celu usunięcia zanieczyszczeń i potencjalnych inhibitorów reakcji PCR. Stężenie DNA oznaczono spektrofotometrycznie, a także metodą detekcji fluorymetrycznej (Fluoroskan Ascent FL, ThermoLabsystems) z zastosowaniem odczynnika PicoGreen<sup>®</sup>dsDNA Quantitation Kit f-my Molecular Probes. Jakość genomowego DNA oceniano na 0,8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

## AMPLIFIKACJA DNA

Wyizolowany DNA poddano jednoczesnej amplifikacji trzech loci STR: CSF1PO, TPOX, TH01 przy użyciu komercyjnego zestawu GenePrint<sup>®</sup>STR Multiplex f-my Promega. Równolegle do amplifikacji zastosowano zestaw AmpF<sup>®</sup>STR Identifier™ firmy Applied Biosystems, który zawiera 16 polimorficznych loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA i locus Amelogeniny).

Do reakcji PCR używano termocyklera Mastercycler Gradient f-my Eppendorf.

## ELEKTROFOREZA I DETEKcja ALLELI

Po amplifikacji 3 ul produktu reakcji PCR loci CSF1PO, TPOX i TH01 mieszało z 3 ul buforu obciążającego 2xSTR loading solution. Próbkę poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu na 6% żelu poliakryloamidowym f-my Amresco (Gene Page Plus 6%) w warunkach denaturujących i barwiono metodą srebrową w/g Allena i wsp. (1).

Produkty PCR dla zestawu AmpF<sup>®</sup>STR Identifier™ analizowano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI PRISM 310 f-my Applied Biosystems.

## WYNIKI I DYSKUSJA

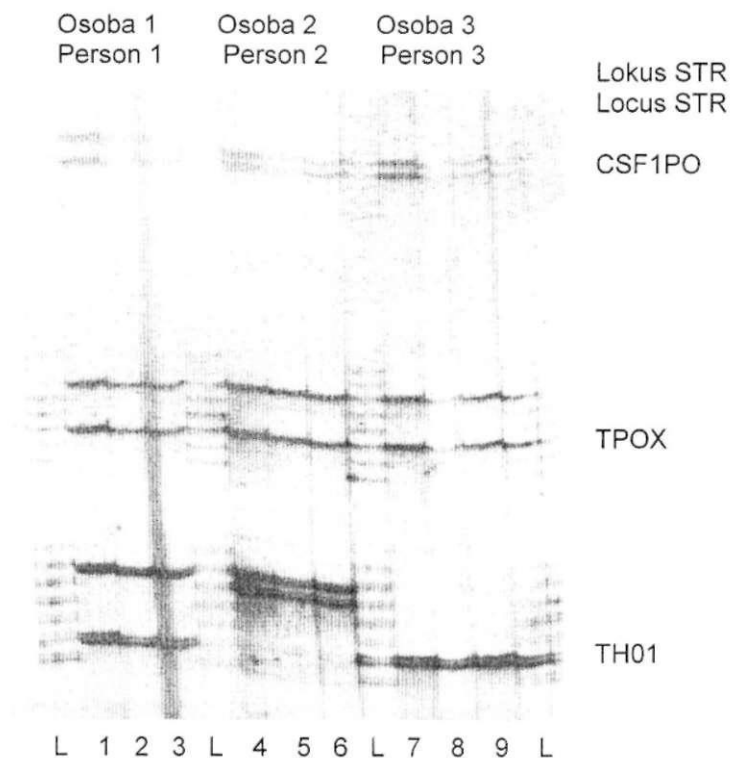
Wykorzystana w pracy klasyczna metoda (fenolowo-chloroformowa) izolacji DNA z tkanek rozłożonych pozwoliła na uzyskanie jego wysokiego stężenia. Elektroforeza na żelu agarozowym z bromkiem etydyny wykazała obecność wysoko-cząsteczkowego DNA, o niewielkim stopniu degradacji uzyskanego z mięśnia sercowego, nerki i krwi sekcyjnej. Gorszej jakości DNA, o większym stopniu zdegradowania otrzymano z wątroby, ze względu na charakter tkanki i zawartość dużej ilości endonukleaz powodujących szybki rozkład cząsteczki DNA.

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR loci CTT w warunkach denaturujących umożliwił uzyskanie czytelnego obrazu analizowanych alleli w odniesieniu do DNA ekstrahowanego z tkanek rozłożonych podobnie jak w DNA krwi obwodowej. Na ryc. 1 przedstawiono rozdział alleli poszczególnych loci genowych trzech osób (profile DNA krwi, serca, wątroby i nerek).

Nieco słabszy sygnał amplifikacji obserwowano przy większych fragmentach DNA w locus CSF1PO. W przypadku DNA z wątroby uzyskano słabsze sygnały amplifikacji w stosunku do innych tkanek.

Detekcja produktów PCR z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej pozwoliła na uzyskanie sygnału amplifikacji dla wszystkich 16-tu loci wchodzących w skład komercyjnego zestawu AmpF<sup>®</sup>STR Identifier dla DNA izolowanego z serca i nerki, podobnie jak z DNA krwi obwodowej. Na ryc. 2 przedstawiono wynik elektroforezy kapilarnej DNA izolowanego z serca pierwszej osoby.

W tym przypadku również w DNA izolowanym z wątroby uzyskano gorsze rezultaty. Nie uzyskano sygnału amplifikacji w loci: D16S539, D2S1338, D18S51, FGA. Składają się one z fragmentów DNA o wielkości od 253 pz do około 355 pz i w przypadku tkanki rozłożonej może nastąpić częściowa degradacja i pocięcie cząsteczki DNA na mniejsze odcinki, które nie zawierają już odpowiedniej sekwencji nukleotydowej dla przyłączenia starterów w kompleksowej reakcji PCR.



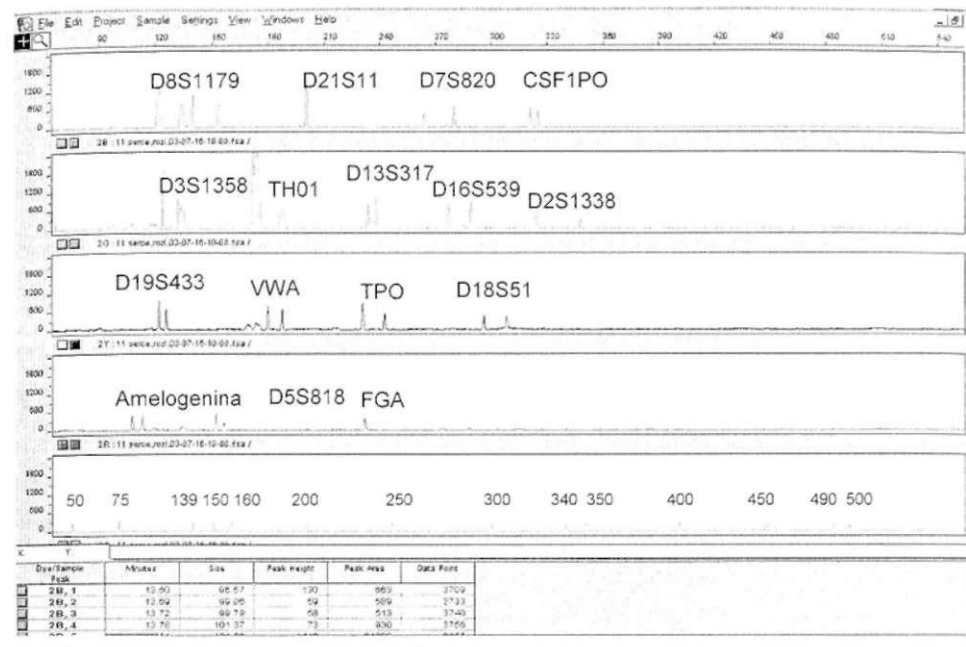
Ryc. 1. Przykładowy rozdział produktów multipleksowej reakcji PCR na 6% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Ścieżka: L-drabina alleli dla trzech loci  
3, 6, 9 - DNA izolowany z krwi sekcyjnej  
1, 4, 7 - DNA izolowany z serca  
2, 8 - DNA izolowany z wątroby  
5 - DNA izolowany z nerki

Fig. 1. Example of separation of the multiplex PCR products on a 6% polyacrylamide gel in denaturing conditions.

Lanes: L-allelic ladder for three loci  
3, 6, 9- DNA extracted from blood  
1, 4, 7- DNA extracted from heart  
2, 8- DNA extracted from liver  
5 - DNA extracted from kidney

Porównanie wyników badań z zastosowaniem metody manualnej na denaturującym 6% żelu poliakrylamidowym z analizą w oparciu o elektroforezę kapilarną na automatycznym sekwenatorze ABI PRISM 310 wykazało, że automatyczna analiza i detekcja produktu PCR z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej jest bardziej czułą i precyzyjną techniką w porównaniu z manualną metodą rozdziału na żelach poliakrylamidowych. Dodatkowo do reakcji PCR



Ryc. 2. Obraz elektroforezy kapilarnej produktu PCR zestawu AmpFESTR® Identifiler w DNA izolowanym z serca (osoba 1).

Fig. 2. Capillary electrophoresis pattern of PCR products of AmpFESTR® Identifiler in DNA extracted from heart tissue (person 1).

wymagane są niewielkie ilości genomowego DNA o stężeniu końcowym od 0,125 do 0,5 ng/ul mieszaniny reakcyjnej, podczas gdy do techniki manualnej konieczna jest większa ilość DNA (0,5 ul DNA o stężeniu około 100 ng/ul). Badania nad stabilnością DNA w tkankach zmienionych gnilnie będą poszerzone o dalsze przypadki, uwzględniony zostanie również wpływ dłuższego czasu ich przechowywania na jakość DNA.

## PIŚMIENNICTWO

1. Allen R., Graves G., Budowle B.: Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 1989, 7, 736. - 2. Hoff-Olsen P., Jacobsen S., Mevag B., Olaisen B.: Microsatellite stability in human post-mortem tissues. *Forensic Sci. Int.* 2001, 119, 273-278. - 3. Hoff-Olsen P., Mevag B., Staalstrom E., Hovde B., Egeland T., Olaisen B.: Extraction of DNA from decomposed human tissue An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci. Int.* 1999, 105, 171-183. - 4. Hsu C. M., Huang N. E., Tsai L. C., Kao L. G., Chao C. H.,

Linacre A., Lee J. C.-I.: Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int. J. Legal Med.* 1999, 113, 43-46. - 5. Jehaes E., Toprak K., Vanderheyden N., Pfeiffer H., Cassiman J.-J., Brinkmann B., Decorte R.: Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *Int. J. Legal Med.* 2001, 115, 135-141. - 6. Leonart R., Riego E., Sainz de la Pena M. V., Bacallao K., Amaro F., Santiesteban M., Blanco M., Currenti H., Puentes A., Rolo F., Herrera L., De la Fuente J.: Forensic Identification of skeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's in Bolivia based on DNA typing. *Int. J. Legal Med.* 2000, 113, 98-101. - 7. Previdere C., Micheletti P., Perossa R., Grignani P., Fattorini P.: Molecular characterisation of the nucleic acids recovered from aged forensic samples. *Int. J. Legal Med.* 2002, 116, 334-339. - 8. Schmerer W. M., Hummel S., Herrmann B.: Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as a target. *Electrophoresis* 1999, 20, 1712-1716. - 9. Takahashi M., Kato Y., Mukoyama H., Kanaya H., Kamiyama S.: Evaluation of five polymorphic microsatellite markers for typing DNA from decomposed human tissues - Correlation between the size of the alleles and that of the template DNA. *Forensic Sci. Int.* 1997, 90, 1-9.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM  
ul. M. Curie-Skłodowskiej 3a  
80-210 Gdańsk

**Ewa Wolska , Natalia Młodzik , Karol Śliwka**

## Teoretyczne podstawy zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych

### The theoretical bases of electrical processes in epithelial tissue

\*Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

\*\*Z Katedry i Zakładu Patobiochemii AM w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. T. Tyrakowski

W niniejszej pracy przedstawiono podstawowe pojęcia z zakresu elektrofizjologii i zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych organizmów żywych, związanych z przelnabłonkowym transportem jonów. Znajomość przebiegu zjawisk elektrycznych zachodzących w nabłonkach po zatrzymaniu krążenia, może w przyszłości przyczynić się do wyjaśnienia kolejnych mechanizmów towarzyszących reakcjom interletalnym.

In this study the basic electrophysiological ideas are presented and the electrical processes in epithelial tissues connected with the mechanisms of transepithelial ion transport. Knowledge of electric phenomena which takes place in epithelium after circulatory arrest, can contribute to the future explanation of the mechanisms which accompany interlethal reactions.

**Słowa kluczowe:** przelnabłonkowy transport jonów

**Key words:** transepithelial ion transport

W latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia Ussing i współpracownicy opracowali nowy model badawczy, zajmujący się badaniami zjawisk elektrycznych zachodzących w tkankach nabłonkowych żywych organizmów (7, 13). Dzięki wykorzystywanej do dnia dzisiejszego komórce Ussinga oraz odpowiedniej aparaturze pomiarowej, udowodniono istnienie oraz opisano szereg mechanizmów działania przelnabłonkowych prądów jonowych. Zjawiska te zostały poznane między innymi w nabłonkach dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz gruczołów wydzielniczych (9, 12, 14, 30).

Metoda Ussinga polega na analizie parametrów elektrofizjologicznych w preparatach izolowanych fragmentów tkanek nabłonkowych umieszczonych