

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

**Przydatność systemu „GenePrint PowerPlex 1.2”
w identyfikacji osobniczej oraz badaniach
dowodów rzeczowych. Studium wybranych
przypadków***

**Validation of „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR
System” in forensic analysis in selected cases**

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

W pracy przedstawiono przykłady praktycznego wykorzystania multipleksowej analizy ośmiu loci DNA – STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 i genu amelogeniny (płeć) w badaniu dowodowych plam krwawych oraz plam nasienia. Wprowadzenie analizy statystycznej pozwala na dokładną interpretację uzyskiwanych wyników.

This paper presents a multiplex analysis of the 8 STR loci: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 and amelogenin gene (sex determination) in some blood and semen stains. Statistical analysis – determination of values of LR, MP and MP² helps to accurately interpret the obtained results.

Słowa kluczowe: PCR, STR, analiza multipleksowa, identyfikacja osobnicza,

Key words: PCR, STR, multiplex analysis, personal identification.

WSTĘP

Odkrycie polimorficznych markerów mikrosatelitarnych (Short Tandem Repeats), charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4 PO 5A 09816 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 1999–2000.

sekwencji 2–7 nukleotydowej zrewolucjonizowało wiele dziedzin genetyki: mapowanie sprzężeń, tworzenie map fizycznych genomów oraz genetyczną identyfikację osobniczą. Wprowadzenie analizy loci STR metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) połączonej z analizą długości produktów amplifikacji w denaturującym żelu poliakryloamidowym było „krokiem milowym” w analizie śladów biologicznych i identyfikacji osobniczej (4, 13). Zastosowanie fluorescencyjnego znakowania starterów PCR i laserowych systemów detekcji rozdzielanych fragmentów DNA oraz opracowanie metod jednoczesnej analizy kilku loci STR w tzw. „multiplesowej” reakcji PCR znacznie zwiększyło czułość i współczynnik dyskryminacji tych analiz. Zanim do praktyki laboratoryjnej wprowadzono metody laserowej detekcji znakowanych fluorescencyjnie produktów amplifikacji PCR dużą popularność zdobyły komercyjnie dostępne „multiplexy” wykorzystujące barwienie żeli srebrem. Systemy te pozwalają na jednoczesną analizę dwóch lub trzech loci mikrosatelitarnych. Optymalne stężenie matrycy DNA w przypadku zastosowania do badań tych układów multiplesowych wynosi ok. 25 ng na reakcję. Wprowadzenie detekcji fluorescencyjnej zwiększyło nie tylko czułość analizy ale pozwoliło też na oznaczenie większej liczby loci w toku jednej analizy (8). Czułość reakcji jak i ilość równocześnie oznaczanych układów (3, 5) jest jednak ściśle uzależniona od systemu detekcji fluorescencji. Największą czułością charakteryzują się multiplesy opracowane dla systemów detekcji sekwenatora – dla uzyskania optymalnych wyników wystarcza bowiem ok. 1 ng matrycy DNA na reakcję. Charakteryzują się też najwyższym „współczynnikiem multiplesowania” – dzięki wielokolorowej detekcji jednocześnie można bowiem w chwili obecnej analizować do 8–9, 10 a nawet 16 loci STR (6, 7, 9, 11). Wszystkie zalety fluorescencyjnych multiplesowych systemów analizy loci STR zostały wykorzystane w analizie śladów biologicznych i identyfikacji osobniczej, szczególnie w przypadkach, w których dostępne są tylko niewielkie ilości DNA oraz DNA zdegradowany (1, 2, 12, 14).

Niniejsza praca jest prezentacją praktycznej przydatności multiplesowych układów analizy loci STR w badaniu różnego typu śladów biologicznych.

MATERIAŁY I METODY

W pracy zaprezentowano 5 wybranych przypadków z praktyki Pracowni Serohematologii Sądowo-Lekarskiej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy, w których przeprowadzono badanie DNA.

DNA z plam krwawych izolowano metodą obejmującą 20 godziną ekstrakcję DNA w buforze TRIS/EDTA z dodatkiem DTT, SDS i Proteinazy K w temperaturze 56°C, ekstrakcję mieszaniną fenol / chloroform / alkohol izoamylowy i zagęszczanie DNA na kolumnkach Microcon 100. Z plam nasienia, DNA izolowano metodą lizy preferencyjnej, uzyskując odrębne frakcje DNA – z komórek nabłonkowych i plemników, połączonej z ekstrakcją mieszaniną fenol / chloroform / alkohol izoamylowy i zagęszczanie DNA na kolumnkach Microcon 100. Stężenie DNA określano w oparciu o zestaw „Quanti Blot” firmy Perkin Elmer, pozwalający na wykrywanie minimalnych ilości DNA (rzędu 0,15 ng) dzięki hybrydacji w systemie slot–blot ze specyficzną dla naczelných sondą

alfa satelitarnego DNA D17Z1 połączoną z detekcją kolorymetryczną. Amplifikację i typowanie DNA wykonano z użyciem multipleksowego systemu *GenePrint PowerPlex Fluorescent STR System*, pozwalającego na koamplifikację i dwukolorową detekcję ośmiu loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 i genu amelogeniny (płeć) firmy Promega, zgodnie z zaleceniami producenta, podając do reakcji 0.5 – 2 ng matrycy genomowego DNA. W toku badań wstępnych przeprowadzono miareczkowanie reakcji PCR stężeniem matrycy DNA. Po amplifikacji fragmenty DNA rozdzielano w 5% denaturującym żelu poliakrylamidowym na sekwenatorze ABI Prism 377. Pomiar długości produktów amplifikacji przeprowadzono w odniesieniu do wewnętrznego standardu długości Fluorescent Ladder CXR 60–400 Bases (Promega) przy pomocy programu komputerowego ABI Prism GeneScan Analysis 2.1. Genotypowanie przeprowadzono w oparciu o wyniki pomiarów długości produktów amplifikacji w odniesieniu do drabin allelicznych przy użyciu programu komputerowego ABI Prism Genotyper 2.0. Obliczenia współczynnika LR, określającego raz na ile osób określony genotyp pojawia się w populacji, MP – charakteryzujący prawdopodobieństwo wystąpienia danego genotypu w populacji oraz MP^2 definiującego prawdopodobieństwo znalezienia dwóch identycznych genotypów w populacji obliczono wykorzystując częstości alleliczne dla populacji polskiej regionu pomorsko-kujawskiego (10).

WYNIKI

W toku badań wstępnych z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z krwi świeżej, stwierdzono, że wyniki analiz otrzymywane z zastosowaniem badanego multipleksu są powtarzalne, a sam system jest niezwykle czuły. Wysoka siła dyskryminacji multipleksu, określona w toku wcześniejszych badań populacyjnych na $PD = 0.999999995$ (Power of Discrimination) wskazywała na potencjalną możliwość jego wykorzystania w identyfikacji śladów biologicznych (10). Badania nad optymalizacją zastosowanego multipleksu do analizy plam krwawych wykazały, że krytycznym czynnikiem jest stężenie matrycy DNA. Miareczkowanie reakcji PCR stężeniem matrycy DNA (ryc.1) wykazało, że optymalne stężenie matrycy DNA w reakcji PCR zawiera się między 0.5 – 5 ng. Większa ilość matrycy DNA podana do reakcji PCR nie powoduje drastycznego zwiększenia liczby artefaktów, uniemożliwiających prawidłową interpretację wyników, ale stężenie matrycy DNA w reakcji PCR poniżej 0.5 ng praktycznie nie daje pozytywnych wyników amplifikacji.

Ilość DNA w granicach 0.5 – 5 ng jest zazwyczaj możliwa do uzyskania nawet z małej ilości materiału biologicznego, a oznaczenie genotypów 8 loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 i płci (genu amelogeniny) daje zazwyczaj satysfakcjonujące rezultaty, pozwalające na wyciągnięcie wniosków przez prowadzącego sprawę.

O praktycznej przydatności badanych loci STR analizowanych w systemie PowerPlex świadczą przedstawione przypadki z praktyki naszego Zakładu:

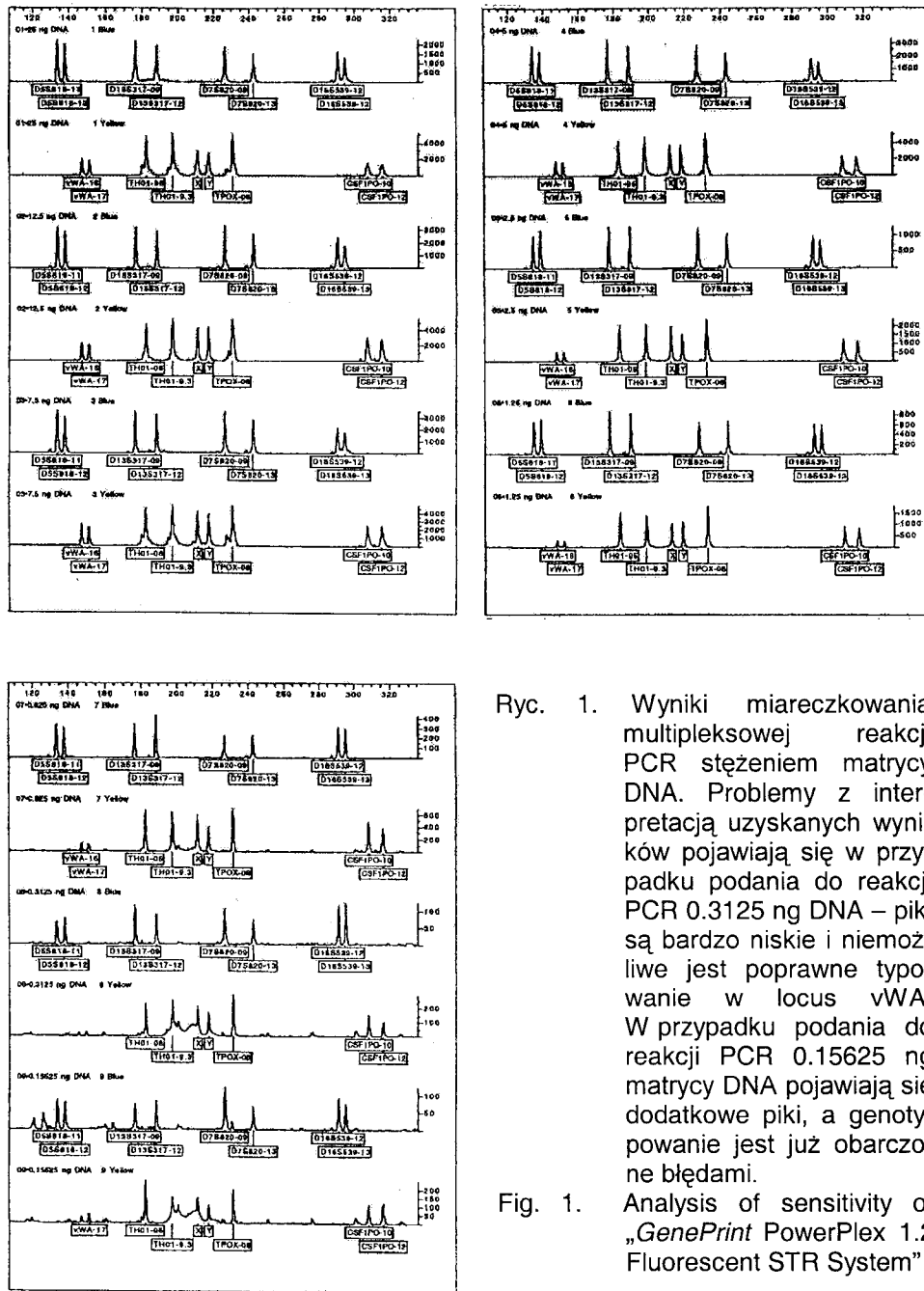
Przypadek 1. Na kole kierownicy oraz lewym przednim słupku samochodu, w którym w wypadku zginęła jedna osoba a druga została ranna, zabezpieczono

zaplamienia w postaci rozmazów w celu ustalenia, kto kierował pojazdem w chwili wypadku. Z plamy krwawej wyizolowano DNA, którego stężenie określono na 0.5 ng / μ l. Do reakcji PCR podano 2 ng DNA, co umożliwiło określenie genotypu w zakresie analizowanych loci. Określony genotyp był identyczny z genotypem określonym dla jednego z uczestników wypadku (ryc. 2). Wartości współczynników LR, MP i MP^2 wyniosły dla tego genotypu: 0.000000031, LR = 32258064.5, $MP^2 = 9.61\ 5972659 \times 10^{-16}$.

Przypadek 2. Na miejscu włamania zabezpieczono fragment rozbitej szyby z niewielkim brunatnym zaplamieniem oraz drobną plamę zakrzepłej substancji, którymi okazała się krew ludzka. Izolacja DNA pozwoliła na uzyskanie roztworu o stężeniu 10 ng / μ l. Do reakcji PCR podawano 1.5 ng matrycy DNA. Oznaczono genotypy w zakresie wszystkich analizowanych loci, które okazały się zgodne z genotypem określonym dla podejrzanego (ryc. 3). Wartości współczynników LR, MP i MP^2 wyniosły dla tego genotypu: MP = 0.000000006, LR = 166729991.3, $MP^2 = 3.5972659 \times 10^{-17}$.

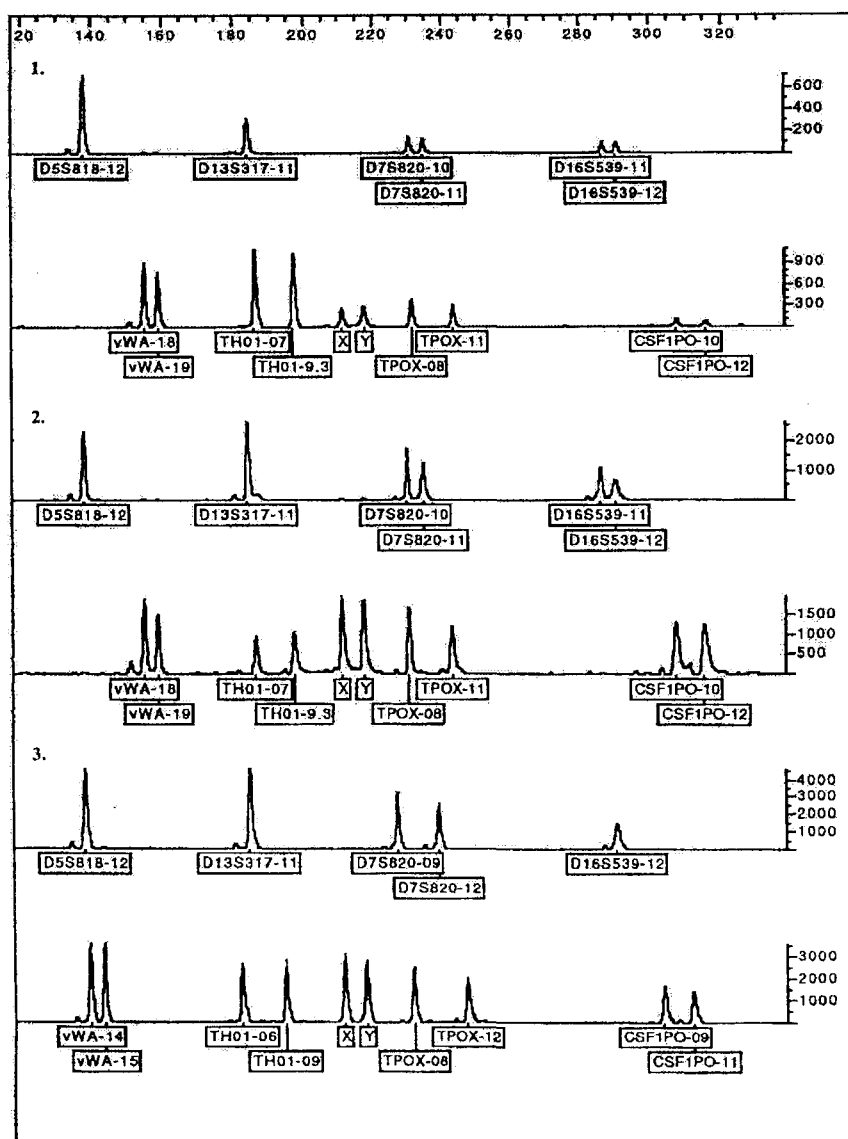
Przypadek 3. Na przypuszczalnym miejscu zdarzenia zabezpieczono drobiny zakrzepłej krwi na źdźbłach trawy i piasku; plamy krwi zabezpieczono także na odzieży i w samochodzie podejrzanego. 2 ng DNA podane do reakcji amplifikacji pozwoliły uzyskać pozytywne wyniki genotypowania w zakresie analizowanych loci (ryc. 4). Genotypy analizowanych skrzepów i plam krwawych były identyczne z genotypem określonym dla ofiary. Wartości współczynników LR, MP i MP^2 wyniosły dla tego genotypu: MP = 8.23×10^{-12} , LR = 1.22×10^{11} , $MP^2 = 6.77 \times 10^{-23}$. Wysokie wartości współczynników wynikają z obecności bardzo rzadkiego w populacji polskiej allelu 6 w locus D13S317. Allel ten nie został jak dotąd opisany w żadnej z badanych populacji.

Przypadek 4. Od ofiary gwałtu zabezpieczono bieliznę; zabezpieczono również bieliznę podejrzanego oraz zaplamienia z fotela samochodu podejrzanego. W zaplamieniach wykryto obecność nasienia ludzkiego. Izolacja DNA pozwoliła uzyskać ilości materiału wystarczające do typowania genetycznego. Do reakcji PCR podawano 1.5 ng DNA. Uzyskano wyraźne piki, przedstawione na ryc. 5. We frakcji nabłonkowej wyizolowanej z zaplameń na bieliźnie pokrzywdzonej oznaczono genotyp odpowiadający w zakresie analizowanych loci jej genotypowi, we frakcji DNA z plemników oznaczono genotyp odpowiadający genotypowi podejrzanego. We frakcji nabłonkowej i plemnikowej zaplameń na bieliźnie podejrzanego określono genotyp odpowiadający jego genotypowi. W zaplamieniach na fotelu samochodowym we frakcji plemnikowej zidentyfikowano genotyp odpowiadający genotypowi podejrzanego, zaś we frakcji nabłonkowej w jednej z plam zidentyfikowano genotyp kobiety, inny od genotypu pokrzywdzonej. Wartości współczynników LR, MP i MP^2 wyniosły dla genotypu oznaczonego dla podejrzanego i frakcji plemnikowej zaplameń: MP = 5.87×10^{-10} , LR = 1703041338, $MP^2 = 3.45 \times 10^{-19}$. Wartości współczynników LR, MP i MP^2 dla genotypu kobiety oznaczonego w zaplamieniach na fotelu samochodowym wyniosły: MP = 1.58×10^{-11} , LR = 6.31×10^{10} , $MP^2 = 2.51 \times 10^{-22}$, zaś wartości współczynników LR, MP i MP^2 dla genotypu pokrzywdzonej wyniosły: MP = 0.000000001, LR = 759613699.5, $MP^2 = 1.73 \times 10^{-18}$. W locus TH01 w przypadku „obcej” kobiety zwraca uwagę genotyp 9.3 / 10.



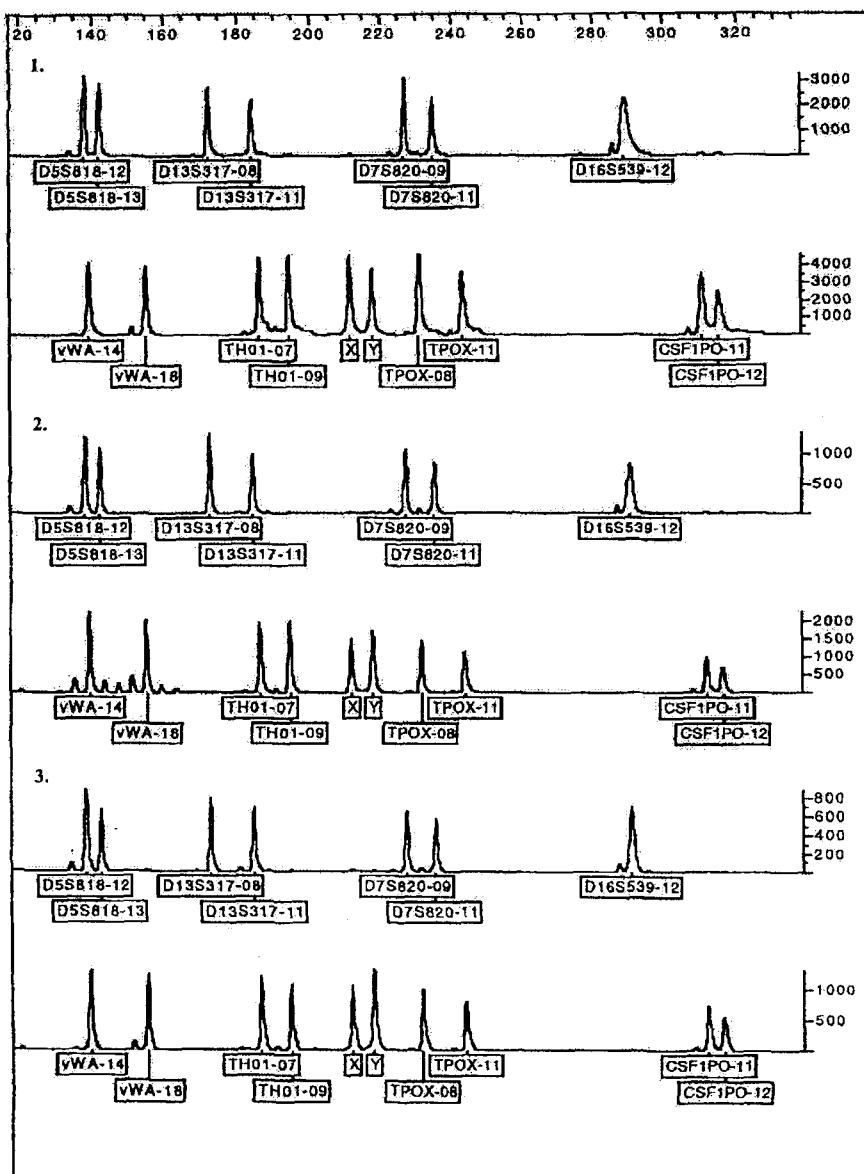
Ryc. 1. Wyniki miareczkowania multiplexowej reakcji PCR stężeniem matrycy DNA. Problemy z interpretacją uzyskanych wyników pojawiają się w przypadku podania do reakcji PCR 0.3125 ng DNA – piki są bardzo niskie i niemożliwe jest poprawne typowanie w locus vWA. W przypadku podania do reakcji PCR 0.15625 ng matrycy DNA pojawiają się dodatkowe piki, a genotypowanie jest już obciążone błędami.

Fig. 1. Analysis of sensitivity of „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”



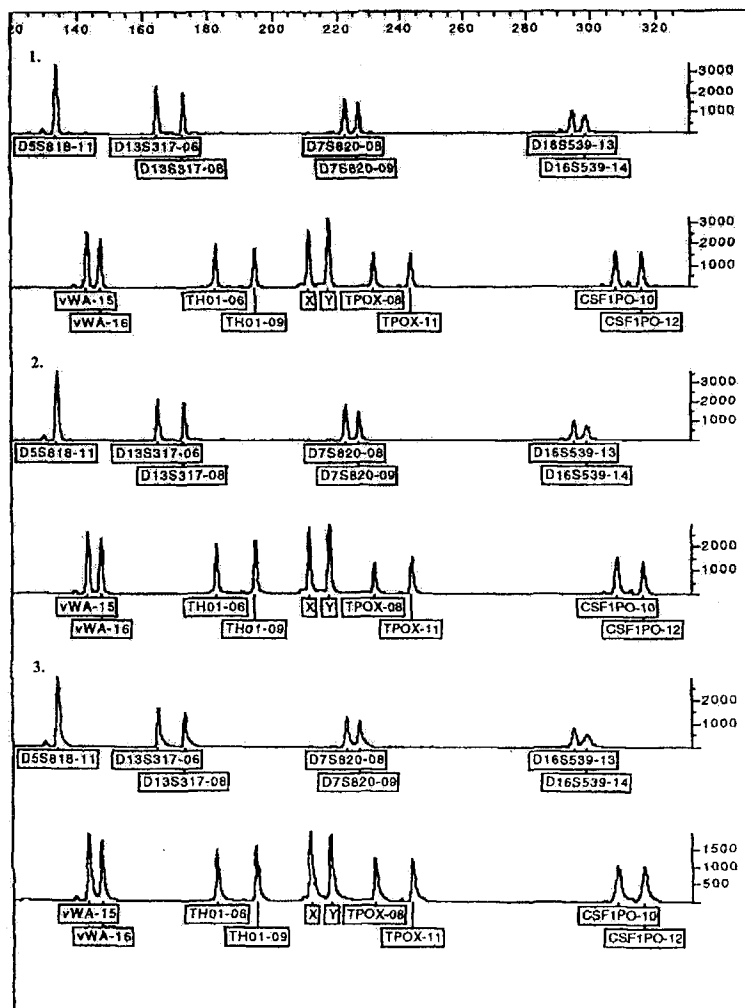
Ryc. 2. Wyniki analizy plamy krwi zabezpieczonej na kole kierownicy rozbitego samochodu (1). Genotyp określony dla krwi zabezpieczonej na kierownicy odpowiada genotypowi jednej z ofiar wypadku (2) i wyklucza możliwość pochodzenia tej plamy krwi od drugiego uczestnika zdarzenia (3).

Fig. 2. Forensic analysis of blood stain from driving wheel (1) and victims of crash (2, 3) using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”. Genotypes of blood stain (1) and victim (2) are identical.



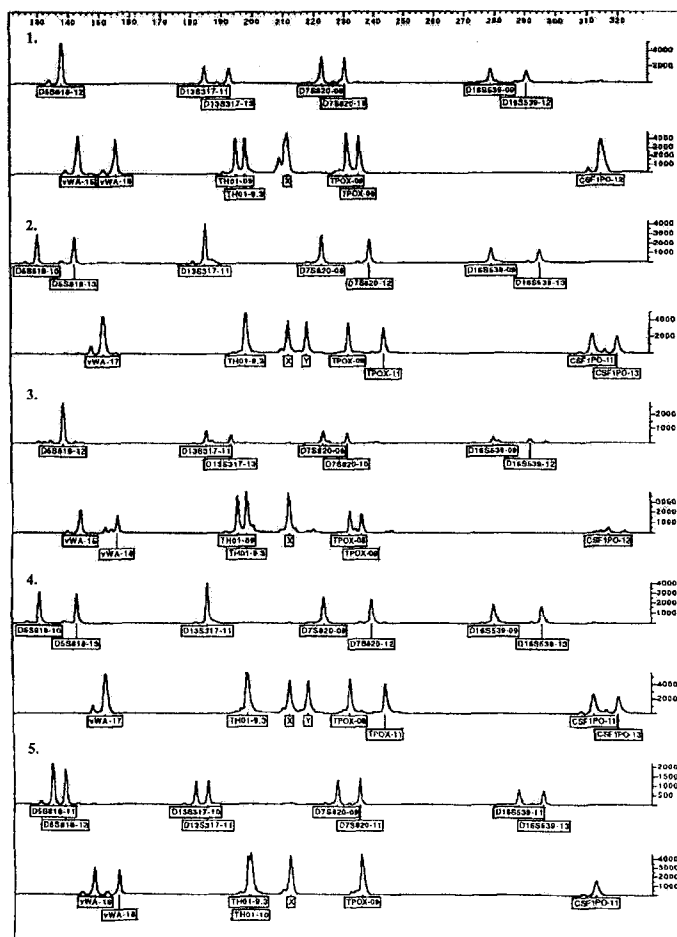
Ryc. 3. Analiza genetyczna drobnych plam krwi zabezpieczonych na miejscu włamania: 1 – na fragmencie szyby, 2 – na podłodze oraz krwi podejrzanego (3).

Fig. 3. Forensic analysis of blood stain from piece of glass (1) and from floor (2) from criminal scene and from suspect using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”.



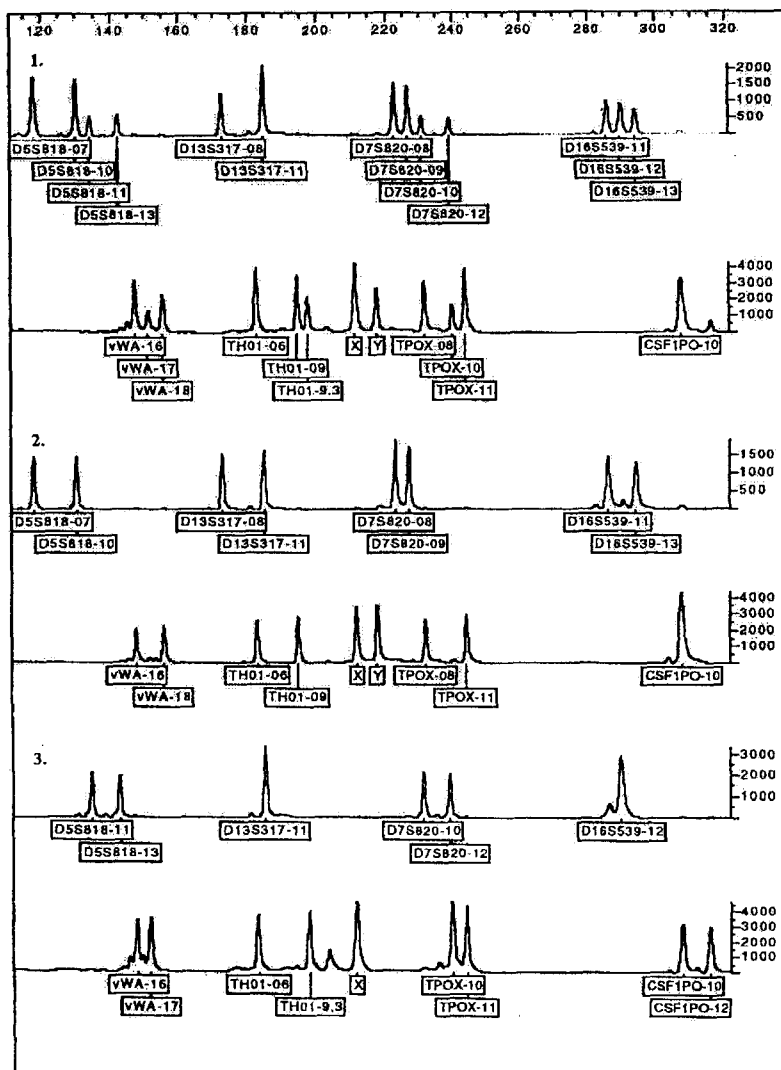
Ryc. 4. Wyniki analizy genetycznej w sprawie zabójstwa: 1 – drobiny krwi zabezpieczonej na żdźble trawy na miejscu morderstwa, 2 – plamy krwi zidentyfikowanej w samochodzie podejrzanego oraz ofiary – 3. Bardzo wysokie wartości współczynników MP, LR i MP^2 wynikają w przypadku określonego w tej sprawie genotypu ofiary z niezwykle rzadkiego allelu 6 w loci D13S317.

Fig. 4. Forensic analysis of blood stains from blade from criminal scene (1), blood stain from suspect's car (2) and victim (3) using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”. Very rare allele 6 in D13S317 locus follow in high values of MP, LR i MP^2 .



Ryc. 5. Analiza genetyczna przeprowadzona w sprawie gwałtu. 1 – genotyp pokrzywdzonej, 2 – genotyp podejrzanego, 3 – genotyp określony dla komórek nabłonkowych płamy na bieliźnie pokrzywdzonej, 4 – genotyp określony dla nasienia zidentyfikowanego na bieliźnie pokrzywdzonej, zgodny z genotypem podejrzanego, 5 – genotyp komórek frakcji nabłonkowej zidentyfikowanych w zapłamieniach na fotelu samochodu podejrzanego (różniący się od genotypu pokrzywdzonej; w locus TH01 widoczny genotyp 9.3 / 10 – gdzie allele różnią się długością 1 pary zasad).

Fig. 5. Forensic analysis of case of violence using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”: 1 – victim, 2 – suspect, 3 – epithelial cells from semen stain from victim’s clothes, 4 – sperm cells from semen stain from victim’s clothes, 5 – epithelial cells from semen stain from suspect’s car (different from victim; in TH01 locus allele 9.3 and 1 nucleotide longer allele 10).



Ryc. 6. Wyniki analizy genetycznej prowadzonej w sprawie gwałtu, w której zabezpieczono plamę nasienia na prześcieradle. 1 – genotyp komórek nabłonkowych, będących mieszaniną komórek nabłonkowych pokrzywdzonej (3) i sprawcy, którego genotyp określono na podstawie analizy plemnikowej (2).

Fig. 6. Forensic analysis of semen stain from sheet: 1 – genotype of mixed epithelial cell of victim and doer, sperm cell of doer (2) and victim (3) using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”.

Przypadek 5. W sprawie gwałtu zabezpieczono prześcieradło, na którym stwierdzono ślady nasienia. Podanie do reakcji PCR 1.5 ng DNA pozwoliło określić genotyp komórek nabłonkowych, będący wynikiem zmieszania DNA ofiary i sprawcy, z wyraźną przewagą ilościową DNA sprawcy, oraz genotyp plemników gwałciiciela, którego nie ujęto (ryc. 6). Wartości współczynników LR, MP i MP^2 wyniosły dla tego genotypu: $MP = 3.53 \times 10^{-11}$, $LR = 2.83 \times 10^{10}$, $MP^2 = 5.58 \times 10^{-17}$ zaś dla genotypu ofiary: $MP = 0.000000007$, $LR = 133866592.3$, $MP^2 = 1.25 \times 10^{-21}$.

OMÓWIENIE

Pozytywne wyniki typowania genetycznego w zakresie 8 loci STR uzyskano w przypadku każdego typu badanych śladów biologicznych. Wysoka czułość wykorzystywanego systemu, określona w eksperymentach miareczkowania reakcji PCR stężeniem matrycy DNA na ok. 0.5 ng DNA pozwoliła na skuteczną i powtarzalną analizę nawet niewielkich śladów biologicznych. Uzyskane wyniki, określające czułość zastosowanego multipleksu są zgodne z opublikowanymi danymi, charakteryzującymi graniczną czułość multipleksowych układów wykorzystujących fluorescencyjną detekcję w systemie ABI (1, 6, 12, 14,). Wyniki te wskazują ponadto, że wykorzystywany system jest czulszy od opisywanych układów multipleksowych dla sekwenatora A.L.F. (3, 9) w których optymalnym stężeniem jest około 5 – 10 ng matrycy DNA. Dane te wskazują na konieczność stosowania pewnej strategii przy układaniu programu badawczego w analizie DNA w plamach krwawych. W sytuacji bardzo małej ilości śladów krwawych metodą z wyboru staje się badanie z użyciem bardzo czułych systemów. Warto zwrócić również uwagę na niezwykle krytyczny element analizy genetycznej, którym staje się precyzyjne oszacowanie stężenia DNA (szczególnie przy jego niskim stężeniu), mimo stosunkowo dużej tolerancji wykorzystanego systemu (0.5 – 25 ng DNA na reakcję). Praktyka laboratoryjna, której przykłady zaprezentowano powyżej pokazuje, że wskazane jest użycie do pomiarów stężenia DNA systemów opartych na hybrydacji ze specyficzną sondą D17Z1.

W analizowanych przypadkach nie zaobserwowano istotnych wahań w dokładności pomiarów długości analizowanych fragmentów DNA.

Typowanie genetyczne w zakresie ośmiu loci STR, wsparte analizą statystyczną, opierającą się na częstościach allelicznych w poszczególnych loci oznaczonych dla populacji polskiej pozwala rozstrzygnąć kwestie identyfikacji osobniczej z bardzo wysokim prawdopodobieństwem.

PIŚMIENICTWO

1. Andersen J.F., Greenhalgh M.J., Butler H.R., Kilpatrick S.R., Piercy R.C., Way K.A., Myhill H.S., Wright J.C., Hallet R., Parkin B.H., „Further validation of a multiplex STR system for use in routine forensic identity testing”, *Forensic Sci. Int.*, 1996, 78, 47 – 64;
2. Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M., Miścicka-Śliwka

D., „Ocena przydatności 14 loci mikrosatelitarnych w identyfikacji dwudziestoletnich śladów krwi ludzkiej”, *Materiały do obrad XIV Szczecińskiego Sympozjum Naukowego*, 24 – 26 września 1997, 33 – 34; 3. Decorete R., Cassiman J.J., „Evaluation of the ALF DNA sequencer for high – speed sizing of short tandem repeat alleles”, *Electrophoresis*, 1996, 17, 1542 – 1549; 4. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T., „DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats”, *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 49, 746 – 756; 5. Fregeau, C.J., Fourney R.M., „DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification”, *BioTechniques*, 1993, 15, 100 – 119; 6. Gill P., Kimpton C.P., Urquhart A., Oldroyd N., Millican E.S., Watson S.K., Downes T.J., „Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future”, *Electrophoresis*, 1995, 16, 1543 – 1552; 7. Kimpton C.P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E.S., Adams M., „Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci”, *PCR Methods Appl.*, 1993, 3, 13 – 22; 8. Lins A.M., Sprecher C.J., Puers C., Schumm J.W., „Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci – silver stain and fluorescence detection”, *BioTechniques*, 1996, 20, 882 – 889; 9. Micka K.A., Sprecher C.J., Lins A.M., Theisen Comey C., Koons B.W., Crouse C., Endean D., Pirelli K., Lee S.B., Duda N., Ma M., Schumm J.W., „Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications”, *J. Forensic Sci.*, 1996, 41, 582 – 590; 10. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M., „Population genetics of 14 STR-s: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, F13A01, FESFPS, F13B, LPL, D3S1358 and FGA in the Pomerania-Kujawy region of Poland”, *Progress in Forensic Genetics* 7, 1998, 261 – 263.

11. Oldroyd N.J., Urquhart A.J., Kimpton C.P., Millican E.S., Watson S.K., Downes T., Gill P.D., „A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification”, *Electrophoresis*, 1995, 16, 334 – 337; 12. Sparkes R., Kimpton C., Watson S., Oldroyd N., Clayton T., Barnett L., Arnold J., Thompson C., Hale R., Chapman J., Urquhart A., Gill P., „The validation of 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies”, *Int. J. Legal Med.*, 1996, 109, 186 – 194; 13. Sprecher C.J., Puers C., Lins A.M., Schumm J.W., „General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci”, *BioTechniques*, 1996, 20, 266 – 276; 14. Whitaker J.P., Clayton T.M., Urquhart A.J., Millican E.S., Downes T.J., Kimpton C.P., Gill P., „Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples”, *BioTechniques*, 1995, 18, 670 – 677.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85-094 Bydgoszcz