

(1816-1831). Część trzecia. Wydział Lekarski. Warszawa, 1911, t. II, 481-756. - 6. Girsztowt P.: Andrzej Janikowski. Kłosa. 1867, IV, 104, 309-311. - 7. Girsztowt P.: Rys historyczno-Statystyczny Cesarsko-Królewskiej Warszawskiej Medycy Chirurgicalnej Akademii od jej zawiązku w dniu 4 czerwca 1857 r. aż do wcielenia do Szkoły Głównej dnia 1 października 1862 r. Warszawa. 1865. - 8. Jakliński. A., Staśkiewicz J.: Z historii medycyny sądowej w Polsce. Traumatologia sądowa w Królestwie Polskim. Arch. Med. Sad. Krym. 1970, XX, 2, 275-278. - 9. Konopka S.: Polska Bibliografia Lekarska Dziewiętnastego Wieku (1801-1900), PZWL, Warszawa, 1974. - 10. Kusiak M.: Dzieje Katedry Medycyny Sądowej [w:] Sześćsetlecie medycyny krakowskiej [t. II] Historia Katedr. Kraków 1963, 315-319.

11. Polski Słownik Biograficzny. Wyd. PAN. Warszawa-Wrocław-Kraków, 1962, X, 44, 515-516. - 12. Wachholz L.: 100 lat istnienia Katedry Medycyny Sądowej w Uniwersytecie Jagiellońskim. Zarys dziejowy. Przeg. lek. 1905, 1-6, stron 38, (odbitka). - 13. Zembrzusi L.: Prof. Dr med. Andrzej Janikowski (1799—1864). Arch. Med. Sąd. Psych. Krym. 1953, t. V, 68-71,

Adres autora:

Katedra Medycyny Sądowej  
ul. Grzegórzecka 16  
31-531 Kraków

**Piotr Koziół, Marzena Ciesielka, Sylwia Chocholska, Roman Mądro**

## Badania populacyjne tripleksu STR (D3S1744, D12S1090 i D18S849) w południowo-wschodnim regionie Polski

### Triplex STR system of loci: D18S849, D3S1744 and D12S1090 in a population from south-east Poland

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. R. Mądro

Badania trzech markerów STR (D3S1744, D12S1090 i D18S849), wykonano w oparciu o 301 próbek DNA. Do amplifikacji użyto zestawów MultiPlex I firmy Lifecodes. Produkty PCR rozdzielano na denaturujących żelach PAA i barwiono techniką srebrną. W lokus D3S1744 zidentyfikowano 10 alleli (największą częstość - 0.307 miał allel 18), 24 allele w D12S1090 (z których najczęściej występował allel 26 - 0.108) i 7 alleli w lokus D18S849 (najczęstszy był allel 16 - 0.322). Heterozygotyczność tych loci wynosiła odpowiednio: 0.827, 0.933 i 0.781 a rozkład częstości genotypowych był zgodny z regułą Hardy'ego-Wainberga. Przydatność zastosowanego tripleksu w sprawach spornego ojcostwa potwierdzają współczynniki PD= 0.9991, PE= 0.966 oraz MPN37.25 jak również rezultaty statystycznej analizy wyników genotypowania w 31 sprawach alimentacyjnych.

Allele frequencies for three STR markers (D3S1744, D12S1090 and D18S849) were determined in a population sample (n=301) from south-east Poland. For DNA amplification the Multiplex-I Kit from the Lifecodes Corporation was used. PCR products were separated by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gels and visualised by silver staining. A total number of 10 alleles for D3S1744, 24 for D12S1090 and 7 for D18S849 were determined. Heterozygosity of these loci had a value of 0.827, 0.933 and 0.781, respectively. No deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were observed. Additionally, we present the values of some statistical parameters (obtained for 31 alimony cases) that indicate the usefulness of these systems in paternity testing (i.e., PD= 0.9991, PE = 0.966, MPI= 37.25).

Słowa kluczowe: triplex STR, badania populacyjne, genetyka sądowa

**Key words: STRs, population database; linkage equilibrium; forensic genetics; paternity testing**

## WSTĘP

Polimorficzne loci STR z czteronukleotydomową sekwencją repetytywną należą do markerów najczęściej stosowanych w genetyce sądowej. Szczególnie interesujące są te układy które wykazują wysoką heterozygotyczność i jednocześnie istnieje możliwość ich genotypowania w oparciu o produkty amplifikacji (uzyskane w multipleksowych reakcjach PCR) technikami elektroforetycznymi w żelach poliakryloamidowych (4, 5). Multipleks STR (D3S1744, D12S1090 i D18S849) opisany przez Neuweiler i wsp.(11) spełnia przedstawione kryteria i jednocześnie umożliwia genotypowanie przy zastosowaniu taniej technologii tj. elektroforezy w denaturujących żelach PAA barwionych metodą srebrną. Komercyjny zestaw MultiPlex I firmy Lifecodes pozwala ponadto na jednoczesne genotypowanie alleli trzech loci z zachowaniem jednolitej nomenklatury (13).

Celem pracy było ustalenie częstości alleli dla trzech w/w lokus, w populacji Polski południowo-wschodniej, wykonanie analizy statystycznej w zakresie segregacji tych alleli oraz ocena przydatności tripleksu w badaniach genetycznych zmierzających do oceny pokrewieństwa.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 301 próbek DNA, które wyizolowano z krwi pobranej w Zakładzie Medycyny Sądowej AM w Lublinie od niespokrewnionych mieszkańców Polski południowo-wschodniej obojga płci w związku z wykonywaniem ekspertyzy genetycznej w sprawach spornego ojcostwa. Badania wykonano również z użyciem próbek DNA wyizolowanych od dzieci w 31 sprawach alimentacyjnych, w których rutynowe oznaczenia 4 układów VNTR (D4S139, D5S110, D7S21, D11S12) oraz 9 układów STR przy użyciu zestawu PowerPlex 2.1 (18) potwierdziły ojcostwo pozwanego z „prawdopodobieństwem granicznym z pewnością” w 19 sprawach, a w 12 przypadkach wykluczyły ojcostwo pozwanego.

DNA izolowano metodą organiczną z użyciem mieszaniny fenol-chloroform, a następnie oznaczano jego stężenie metodą slot-biot i hybrydyzacją sondą D17Z1 (Gibco-BRL, Gathersburg, MD, USA).

Do jednoczesnej amplifikacji trzech układów STR (D3S1744, D12S1090 i D18S849) użyto zestawu QuickType Multiplex-I Kit (Lifecodes Corp., Stamford, CT, USA). Reakcję PCR wykonywano w cyklerze temperatury Trio-block (Biometra) używając 5 ng genomowego DNA i 1 U polimerazy DNA z *Thermus aquaticus* (TERPOL) - zgodnie z instrukcją producenta zestawu (13). Produkty PCR były rozdzielane w denaturujących 4 % żelach poliakryloamidowych (4% T, 6% C, 8 M mocznik) w buforze 0.5 x TBE przez 1 godzinę przy mocy prądu 60 W.

Fragmenty DNA wybarwiono metodą srebrną (1), a genotypy odczytywano przez porównanie z alleliczną drabiną wzorcową.

W celu sprawdzenia równowagi segregacji alleli zgodnie z regułą Hardy'ego-Weinberga wykonano analizę statystyczną testami:  $\chi^2$  (6), „exact” (6) i „LR”(16). Obliczono również parametry określające przydatność tych markerów do ekspertyz sądowych tj.: współczynnik dyskryminacji (7), współczynnik informacji o polimorfizmie (2), indeks dyskryminacji (18) i średni współczynnik ojcostwa (3) oraz szansę wykluczenia (17). Ponadto porównano przebadaną populację z populacją amerykańską rasy białej (12) i populacją niemiecką (14) przy użyciu programu 2-way RxC wg. G. Carmody (Carleton University, Ottawa, Canada).

## REZULTATY I DYSKUSJA

Zestaw MultiPlex I firmy Lifecodes, zastosowana technika rozdziału fragmentów allelicznych i srebrna detekcja pozwoliły na ustalenie genotypów trzech loci we wszystkich badanych próbkach. Wizualnie identyfikowane allele wykazywały szybkość migracji identyczną jak allele drabiny wzorcowej co potwierdza rycina 1, która przedstawia fragment elektroferogramu z rozdzielonymi produktami amplifikacji. Okazało się jednak, że amplifikacja wymaga użycia dość znacznej, ale ściśle określonej ilości matrycowego DNA (5 ng). Nawet niewielkie zwiększenie jego stężenia prowadziło bowiem do preferencyjnego powielania alleli lokus D3S1744. czego przykładem jest próbka 2 na rycinie 1. W tabeli I zestawiono ilości oznaczonych genotypów oraz częstości alleli.

W lokus D18 S849 zidentyfikowano 21 genotypów tworzonych przez 7 alleli, z których najczęściej występowały allele 16 (0.322) i 17 (0.281), podczas gdy częstość poniżej 0.01 miał tylko allel 13. W lokus D3S1744 wykazano 10 alleli (32 genotypów), z których najczęstszymi były 18 (0.307) i 19 (0.213) natomiast allele 14 i 23 wystąpiły z częstością odpowiednio 0.005 i 0.002. Największy polimorfizm stwierdzono w układzie D12S1090. Zidentyfikowano w nim bowiem 107 genotypów i 24 allele, z których najczęściej występowały 20 (0.103) i 26 (0.108), przy czym aż 11 alleli (tj.: 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 29, 30, 31 i 32) wystąpiło z częstością poniżej 0.01.

Z tabeli II wynika, że rozkład alleli badanych loci STR w populacji Polski południowo-wschodniej jest zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga. W przypadku lokus D12S1090 bezpośrednie porównanie oczekiwanych i obserwowanych ilości genotypów sugeruje w prawdzie brak zgodności w rozkładzie alleli (test exact  $P < 0.01$ , test LR  $P < 0.01$ ) ale zastosowanie testu losowania z ilością prób 10 000, co jest uzasadnione przy testowaniu bardzo polimorficznych loci (16), wskazuje na pełną zgodność oczekiwanego i obserwowanego rozkładu alleli (test exact  $P > 0.9$ , test LR  $P > 0.9$ ).



Tabela II. Wyniki obliczeń statystycznych dla 3 lokus STR w populacji Polski południowo-wschodniej.

Table II. Statistical calculations and additional forensic data for three STR locus in a population from Southeast Poland.

Zastosowane testy i Współczynniki Performed Tests	D18S840	D3S1744	D12S1090
Heterozygotyczność obserwowana (oczekiwana) Observed (expected) heterozygosity	0.781 (0.764)	0.827 (0.816)	0.934 (0.921)
Test homozygotyczny Homozygosity test	$\chi^2 = 0.561$ d.f.=1 P = 0.46	$\chi^2 = 0.353$ d.f.=1 P = 0.56	$\chi^2 = 0.876$ d.f.=1 P = 0.35
Test „exact” Exact test	$\chi^2 = 19.1$ d.f.=20 P = 0.52	$\chi^2 = 43.2$ d.f.=44 P = 0.51	$\chi^2 = 332.9$ , d.f.=275, P <0.01 ( $\chi^2 = 67.1$ , d.f.=118; P >0.99)
Test „LR” Likelihood ratio test	$\chi^2 = 21.15$ d.f.=20 P = 0.39	$\chi^2 = 38.9$ d.f.=44 P = 0.68	$\chi^2 = 165.7$ , d.f.= 275, P <0.01 ( $\chi^2 = 85.2$ , d.f.= 118; P >0.99)
Wskaźnik polimorfizmu Polymorphism inf.cont. (PIC)	0.7255	0.7919	0.9131
Szansa dyskryminacji Power of discrimination (PD)	0.9016	0.9429	0.9846
Indeks dyskryminacji Discrimination index (DI)	0.0856	0.0545	0.0085
Średni indeks ojcostwa Mean paternity index (MPI)	2,2924	2.8616	7.3714
Szansa wykluczenia Power of exclusion (PE)	0.5443	0.6416	0.8352

(<sup>1</sup>) - wynik oiczeń w teście losowania 10 000 prób  
tests based on 10 000 total permutations

Częstości alleli uzyskane dla przebadanej populacji polskiej, porównano (przy pomocy testu Carmody'ego) z częstościami obliczonymi dla populacji niemieckiej (12) i Amerykanów rasy białej (14) (tab. III). Brak istotnych statystycznie różnic między tymi populacjami świadczy o ich homogenności w zakresie oznaczanych loci oraz o prawidłowej identyfikacji alleli, których nazewnictwo jest odpowiednie do ilości czteronukleotydowej sekwencji repetytywnej GATA, aczkolwiek w lokus D12S1090 allel 27 jest większy od 26 o 3 nukleotydy natomiast allel 29 jest większy od allela 28 jedynie o 2 nukleotydy.

Statystyczne parametry oceniające przydatność całego tripleksu STR (i każdego z badanych układów) dla genetycznych ekspertyz sądowych przedstawiono w tabeli II. Wysokie wartości indeksu dyskryminacji ( $DI = 1.1 \times 10^{-4}$ ),

szansy dyskryminacji ( $PD = 0.9991$ ), szansy wykluczenia ( $PN = 0.966$ ) i średniego indeksu ojcostwa ( $MPI = 37.25$ ) wskazują na dużą przydatność MultiPlexu I w badaniach kryminalistycznych oraz przy ustalaniu ojcostwa.

Tabela III. Porównanie rozkładu częstości alleli lokus: D3S1744, D12S1090 i D18S849 między populacją Polski południowo-wschodniej a dwiema innymi populacjami rasy białej.

Table III. Comparison of allele frequencies of three locus D3S1744, D12S1090 i D18S849 between population of the south-east Poland and two other Caucasian population.

Loci Locus	Porównywane populacje Compared populations							
	Polska / USA rasa biała <sup>2</sup> (12) Poland x USA Caucasians				Polska / Niemcy <sup>3</sup> (14) Poland x Germany			
	t <sub>xr</sub>	P	G-test	P	(x <sub>r</sub>	P	G-test	P
D3S1744	8.27	0.512	9.78	0.422	12.25	0.193	14.0	0.145
D12S1090	17.72	0.799	18.23	0.846	26.54	0.269	25.95	0.422
D18S849	10.01	0.121	10.79	0.109	7.76	0.252	8.83	0.204

- ilość alleli N=602 (number of alleles)  
- ilość alleli N=220 (number of alleles)  
<sup>3</sup> - ilość alleli N=298 (number of alleles)

Szczególną, wartość różnicującą wykazuje układ D12S1090 dla którego  $DI = 8.5 \times 10^{-3}$  a  $MPI = 7.37$ . Występowanie interalleli i wysoka mutacyjność tego loci sprawiają jednak, że jego oznaczanie dla celów identyfikacyjnych wymaga precyzyjnej technologii genotypowania, tj. takiej która umożliwi wykazywanie różnic (między produktami PCR) rzędu pojedynczego nukleotydu (9). Ponadto żaden z układów STR badanego tripleksu nie wchodzi w zakres międzynarodowych baz danych profilów genetycznych, co ogranicza celowość ich oznaczania w śladach biologicznych (4, 15).

W ustalaniu pokrewieństwa powyższe zastrzeżenia nie są jednak istotne (ponieważ próbki DNA porównywanych osób analizujemy jednocześnie oraz w identycznych warunkach technologicznych) a przebadany multipleks okazał się przydatny do tych celów. W 19 sprawach z ojcostwem wcześniej „potwierdzonym” przeanalizowano bowiem średnie wartości indeksu ojcostwa (i wykazano, że PI dla D3S1174 wynosił 2.69, 6.30 dla D12S1090 i 1.95 dla D18S849 oraz

<sup>2</sup> Średnią wartość indeksu ojcostwa obliczoną po prawdopodobieństwie.

37.25 dla całego tripleksu), co potwierdziło celowość jego zastosowania w przypadkach spornego ojcostwa. Stwierdzono ponadto, że zastosowanie wyłącznie tego tripleksu pozwoliło na wykluczenie ojcostwa we wszystkich 12 sprawach (wcześniej tak właśnie ocenionych) przy czym podstawę do wykluczenia w 93% przypadkach znaleziono w wysoce polimorficznym układzie D12S1090, w 67% w D3 S1174 a w 50% w D18S849. W aspekcie problematyki spornego ojcostwa dodatkowym atutem przebadanego zestawu (czyli MultiPlexu I) jest fakt, że loci D3S1744, D12S1090 i D18S849 nie zostały uwzględnione w żadnym innym komercyjnym multipleksie.

## PIŚMIENNICTWO

I. Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M.: Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1991, 196, 80-83., -2. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis RW.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1980, 32, 314-331., -3. Brenner C., Morris J.W.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. *Proceedings from the International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation 1989; 21-53., -4. Butler J.M.: *Forensic DNA Typing. Biology & technology behind STR markers.* Academic Press, London, UK, 2001., -5. Edwards M.C., Gibbs R.A.: Multiplex PCR: advantages, development and applications. *PCR Methods and Applications* 1994, 3, 565-575., -6. Guo S.W., Thompson E.A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48, 361-372., -7. Kloosterman A.D., Daselaar P., Budowle B., Riley E. L.: Population genetic study on the HLA-DQa and the D1S80 locus in Dutch Caucasians. *Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation 1992, 329-344., -8. Koziół P., Ciesielka M., Mądro R.: Genetic data on 9 complex STR systems in the population of south-east Poland and their usefulness in parentage testing. *Z Zagadnień Nauk Sadowych (Problems of Forensic Sciences)*, 2001, -9. Mertens G., Mommers N., Boutrand L., Gielis M., Vandenberghe A.: Flemish population data and sequence structure of the hypervaria tetranucleotide repeat locus D12S1090. *Int. J. Legal Med.* 2001, 115, 1, 40-44., -10. Nei M.: Sampling variance of heterozygosity and genetic distance, *Genetics* 1974, 76, 379-390.,

II. Neuweiler J., Perlee L., Venturini J., Balazs I.: Properties of a STR multiplex marker system suitable for paternity and forensic determinations, in: Carredo A., Brinkmann B., Bar W (Eds.) *Advances in Forensic Haemogenetics* 1996, 6, 148-150., -12. Perlee L., Neuweiler J., Balazs I.: Analysis of sequence variants in the alleles from three STR loci. in: Carredo A., Brinkmann B., Bar W (Eds.) *Advances in Forensic Haemogenetics* 1996, 6, 52-54., -13. Quick-Type® User's Manual. Lifecodes Corporation, USA, 1997., -14. Stein Ch., Lange T., Ferencik St., Grosse-Wilde H., Henzge CL: German population data of three tetrameric short tandem repeat loci -D3S1744, D1S1090 and D18S849. *Forensic Science International* 1998, 91, 103-107., -15. Watson S., Allsop R.,

Foreman L, Kelsey Z., Gili P.: Sequenced allelic ladders and population genetics of a new STR multiplex system. *Forensic Science International* 2001, 115, 207-217., -16. Weir B, S.: Independence of VNTR alleles defined as fixed bins. *Genetics* 1992, 130, 873-887., -17. Wiegand P., Budowle B., Rand S., Brinkmann B.: Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int. J. of Leg. Med.* 1993, 105, 315-320., -18. Wong Z., Wilson V., Patel I., Povey S., Jeffreys A.J.: Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals of Human Genetics* 1987, 51, 269-288.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
ul. Jaczewskiego 8  
20-706 Lublin