

Zofia Szczerkowska, Ewa Kapińska, Joanna Wysocka,
Grzegorz Jezierski

Rzadki wariant STR Locus HumCSFI PO

Rare variant of STR locus HumCSFI PO

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

Mikrosatelitarny układ CSF1PO (Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene) należy do dobrze poznanych markerów genetycznych wykorzystywanych w medycynie sądowej. Jego locus znajduje się w intronowej części chromosomu 5 (5q 33.3-34). Allele systemu CSF1PO zawierają 9 fragmentów obejmujących kolejno od 7 do 15 repetytywnych powtórzeń (TCTA). W czasie badań w sprawie spornego ojcostwa w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej AMG w omawianym locus ujawniono dodatkowy, bardzo rzadki allel niewystępujący w komercyjnych wzorcach. Poddano go sekwencjonowaniu. Wykazano obecność jednostki repetytywnej charakterystycznej dla CSF1PO pojawiającej się w 16 powtórzeniach (TCTA)ie.

This paper reports the sequences of allele 16 identified at the HumCSFI PO (Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene) microsatellite (STR) locus (5q 33.3-34). During routine practice at the Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, in a case of paternity testing, a very rare allele, not appearing in commercial ladders characteristic of CSF1PO were detected in 16 repetitive units (TCTA)IO.

Słowa kluczowe: PCR-STR, CSF1PO, rzadki allel
Key words: PCR-STR, CSF1PO, rare allele

Wysoce polimorficzne sekwencje ludzkiego DNA typu STR (short tandem repeats) określane metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), stanowią podstawowe narzędzie badawcze wykorzystywane w analizie spornego ojcostwa i identyfikacji śladów biologicznych. Charakteryzują się one zmienną liczbą krótkich tandemowych powtórzeń, z jednostką repetytywną 2-6 pz. Do dobrze poznanych i opracowanych metodycznie mikrosatelitarnych układów należą m.in. allele locus HumCSFI PO. Ich czteronukleotydowe powtórzenia zlokalizowane są na chromosomie 5 (5q33.3-34) (2). Produkty amplifikacji w/w systemu ocenia się względem markera wielkości (allelic ladder). Wzorzec alleli systemu CSF1PO składa się z 9 fragmentów DNA o długości od 295-327 pz obejmujących kolejno od 7 do 15 repetytywnych powtórzeń (AGAT) (3).

W czasie badań w sprawach spornego ojcostwa przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku w locus HumCSFI PO ujawniono dodatkowy, bardzo rzadki allel niewystępujący w komercyjnych wzorcach (4).

W celu dokładnego zbadania zidentyfikowanego wariantu fragmenty DNA poddano procedurze przygotowującej go do sekwencjonowania (7).

MATERIAŁ I METODY

1. Amplifikacja DNA

1-3 ng genomowego DNA amplifikowano przy użyciu termocyclera Mestercycler Gradient f-my Zeiss stosując primery f-my Integrated DNA Technology o przedstawionych niżej sekwencjach: (6, 9)

CSF 1PO forward

5-AAC CTG AGT CTG CCA AGG ACT AGC-3'

CSF 1PO reverse

5-TTC CAC ACA CCA ATG GCC ATC TTC-3'.

Reakcja PCR przebiegała w następujących warunkach:
wstępna denaturacja 96°C/2 min.

I faza: 10 cykli

II faza: 20 cykli

denaturacja 94°C/1 min.

90°C/1 min.

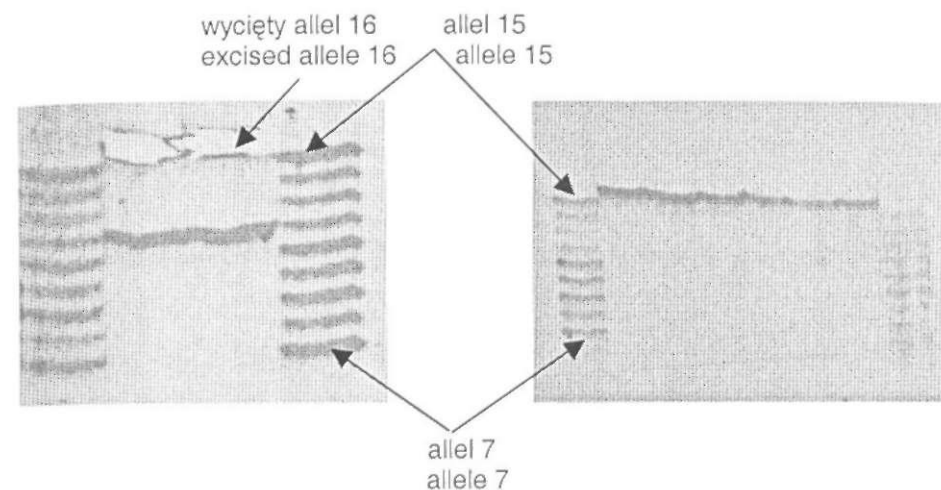
hybrydyzacja 64°C/1 min.

64°C/1 min.

elongacja 70°C/1,5min.

70°C/1,5 min.

Zamplifikowane produkty PCR locus HumCSFI PO zawierające fenotyp 12/16 poddano elektroforezie na 6% pionowych żelach denaturujących (Gene Page Plus 6% f-my Amresco). Elektroforezę prowadzono w aparacie S.A. 32 (f-ma Life Technologies Inc.) w czasie 2 godz. przy 2500V, 40W i 40 mA. Do detekcji alleli zastosowano metodę barwienia z azotanem srebra (1, 8) z niewielkimi własnymi modyfikacjami. Z żelu wycięto frakcję odpowiadającą 16 allelowi i rozpuszczano w 50 pl wody HPLC, w temp. 56°C. 3 pi ekstraktu użyto do ponownej amplifikacji locus HumCSFI PO. Produkty PCR oczyszczano na kolumnach Microcon - 100, do których dodawano po 30 pl produktu PCR i 450 pl wody. Po zwirowaniu przesącz odrzucano, a do supernatantu dodawano 450 pl wody i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Następnie kolumnienki odwracano, umieszczano w nowych jałowych probówkach i wirowano. Tak oczyszczony produkt poddano reakcji sekwencjonowania. Na rycinie 1 przedstawiono obraz elektroforetyczny układu CSF1PO po wycięciu allela 16, a na rycinie 2, produkt amplifikacji allela 16 systemu CSF1PO.



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny żelu po wycięciu allela 16 systemu CSF1PO

Ryc. 2. Produkt amplifikacji allela 16 systemu CSF1PO

Fig. 1. Electrophoretic pattern of the gel after the excision of unknown allele of the CSF1 PO system

Fig. 2. Product of the amplification of unknown allele

2. Reakcja sekwencjonowania:

Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono przy użyciu zestawu ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) (7). Produkt PCR sekwencjonowano w obu kierunkach w 20 pl mieszaniny reakcyjnej, w obecności 3,2 pmola tego samego startera, który użyty był do reakcji PCR. Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono w 0,2 ml probówkach typu MicroAmp (PE) z wykorzystaniem termocyclera Gene Amp PCR 2400 (PE), w następujących warunkach:
wstępna denaturacja: 96°C/11 sek.
25 cykli: 96°C/10 sek.; 50°C/5 sek; 60°C/4 min.

Produkty sekwencjonowania oczyszczano przez precypitację 95% etanolem w obecności octanu sodu. Po 30 min precypitacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano przy 14 tys. rpm przez 20 min. Usuwano supernatant, a produkty przemywano 70% etanolem. Po zworteksowaniu i zwirowaniu etanol usuwano, a produkt suszono w 90°C przez 1 min.

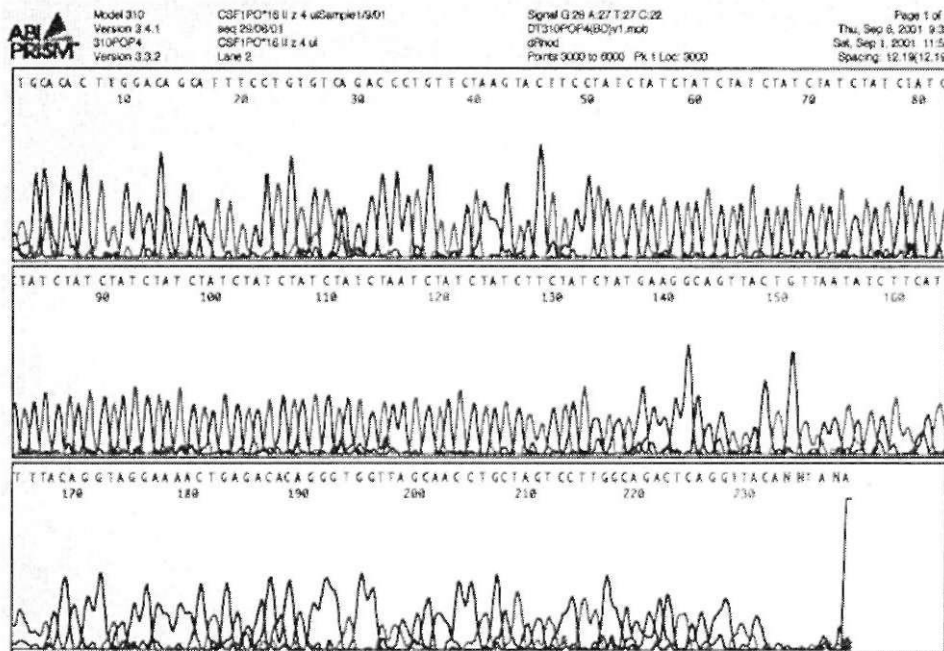
3. Rozdział produktów reakcji sekwencjonowania metodą elektroforezy kapilarnej

Do wysuszonego produktu reakcji sekwencjonowania dodawano 20 pl dejonizowanego formamidu. Następnie próbki denaturowano w temperaturze 95°C

przez 3 min i natychmiast umieszczano w lodzie. Tak przygotowany produkt rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI Prism 310, w kapilarze 50 pm x 47 cm wypełnionej denaturującym polimerem POP6, przy następnym 2,0 kV przez 45 s i późniejszym rozdzielaniu przez 20 min przy 15 kV. Do analizy uzyskanych wyników zastosowano program komputerowy Sequence Analysis v.3.4.1. (Applied Biosystems, USA).

WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano sekwencję dla jednej nici omawianego allela systemu CSF1PO. Przetworzono ją na rycinie 3.



Ryc. 3. Sekwencja 16 allela locus HumCSF1 PO
Fig. 3. Sequence of allele 16 of locus HUMCSF1 PO

Analiza sekwencji allela wykazała obecność następującej jednostki repetytywnej: (TCTA)₆ charakterystycznej dla locus HumCSF1 PO. Sekwencja regionu flankującego (ang. flanking region) jest zgodna z tą, którą podano w Gene Bank.

PIŚMIENNICTWO

- Allen R., Graves G., Budowle B. (1989): Polymerase chain reaction amplification products separated on the hydratable polyacrylamide gels and stained with silver, *Biotechniques* 7, 736-744.
- Budowle B., Koons B.W., Keys K.M., Smerick J.B: Methods for typing the STR Triplex CSF1PO, TPOX and HUMTH01 That Enable Compatibility Among DNA Typing Laboratories. *Forens. Sc. Resear. Unit, Laboratory Division, FBI.*
- Crouse CA, Rogers S., Anlott E., Gibson S., Masibay A. (1999): Analysis and Interpretation of Short Tandem Repeat Microvariants and Three - Banded Allele Patterns Using Multiple Allele Detection System. *J. Forens. Sc.* 44 (1), 87-94.
- Gene M., Carracedo A, Huguet E., Perez-Perez A., Moreno P. (1998): Population genetics of the D12S391, CSF1PO and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain). *Int. J. Leg. Med.* 111, 52-54.
- Hochmeister M.N., Budowle B., Schumn J.W., Sprecher C.J., Borer U.V., Dirnhofer R. (1995): Swiss population data and forensic efficiency values on 3 tetrameric short repeat loci - HumTH01, TPOX and CSF1PO - derived using a STR multiplex system. *Int. J. Leg. Med.* 107, 246-249.
- Huang N.E., Schumn J., Budowle B. (1995): Chinese population data on three tetrameric short tandem repeat loci - HumTH01, TPOX, and CSF1PO - derived using multiplex PCR and manual typing *Forens. Sc. Int.* 71, 131-136.
- Protocol - Applied Biosystems ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits.
- Technical Manual 7/1999, Promega Gene Print® STR Systems (Silver Stain Detection).
- Yoshida K., Sekiguchi K., Kasai K., Sato H., Seta S. (1997): Evaluation of new primers for CSF1PO. *Int. J. Leg. Med.* 110, 36-38.

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