

**KOMUNIKAT I**

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
oraz  
Krakowski Oddział Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii  
uprzejmie informują, że  
w dniach 15-17 września 2004 r. w Krakowie odbędzie się

**XIII Zjazd PTMSiK****Tematyka Zjazdu:**

- Historia krakowskiej medycyny sądowej w 200-lecie Katedry Medycyny Sądowej UJ.
- Problemy polskiej medycyny sądowej u progu wejścia do Unii Europejskiej.
- Patologia sądowo-lekarska.
- Współczesna hemogenetyka sądowo-lekarska.
- Toksykologia sądowo-lekarska XXI wieku.

Wstępne zgłoszenia uczestnictwa w Zjeździe prosimy kierować na adres:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UJ  
31-531 Kraków  
ul. Grzegorzewska 16

**Joanna Wysocka, Zofia Szczerkowska**

**Możliwości wykorzystania polimorfizmu locus HLA-DR w identyfikacji osobniczej****Application of polymorphism of HLA-DR locus in personal identification**

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

W pracy przedstawiono wyniki badań nad polimorficznym locus HLA-DR. Oceniono przydatność metody PCR-SSP w medycynie sądowej. Analizie poddano DNA wyizolowany z krwi obwodowej, płam krwi i tkanek miękkich (mięśnie szkieletowe, mózg). Do amplifikacji alleli DR metodą PCR-SSP zastosowano komercyjny zestaw odczynników Dynal DR „low resolution”. U 228 dorosłych niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej wykazano 39 fenotypów HLA-DR spośród 55 możliwych. Badana populacja pozostawała w zgodzie z regułą Hardy-Weinberga. Analiza statystyczna wykazała dużą przydatność locus DR w medycynie sądowej. Allele HLA-DR można było również określić w tkankach miękkich (także dwumiesięcznego płodu) i z nieco gorszym rezultatem w płamach krwi.

The aim of this paper was to present the results of investigation of the high polymorphic HLA-DR locus by the PCR-SSP method. Genomic DNA was isolated from whole blood, tissue samples (muscles and brains). HLA-DR alleles were typed using the DYNAL DR "low resolution" SSP kit. PCR products were separated on agarose gel with ethidium bromide and estimated in ultraviolet light. Phenotypic and genotypical rates of blood and tissues have been analysed. After electrophoresis in 228 DNA samples 39 phenotypes and 10 alleles were identified. The most frequent phenotypes of the HLA-DR locus were 5/6, 6/6 and 3/5. The high frequency of HLA-DR 6, DR 5 and DR 7 alleles have been found. No deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were observed. The HLA-DR locus has a relatively high information content (PIC), power of discrimination (PD) and mean exclusion chance (MEC). The molecular PCR-SSP method allows for very rapid and highly discriminatory HLA analysis. We found the PCR-SSP technique very useful in routine HLA-DR identification.

**Słowa kluczowe:** metoda PCR-SSP, HLA klasa II

**Key words:** PCR-SSP method, HLA II class

## WSTĘP

### Główny układ zgodności tkankowej

Główny układ zgodności tkankowej MHC (*major histocompatibility complex*) został odkryty przez Gorera w 1937 r. w trakcie badań dotyczących odrzucenia przeszczepów skóry u myszy (8). Niepowodzenia w transplantacji wg autora zależą od zdolności rozpoznania różnic w antygenach komórkowych gospodarza i tkanki przeszczepianej. Zespół genów odpowiedzialnych za odrzucenie przeszczepu został określony jako główny układ zgodności tkankowej, u myszy oznaczony jako H-2. Produkty tych genów nazywano antygenami transplantacyjnymi lub antygenami zgodności tkankowej.

W 1958 roku Dausset (6) jako pierwszy opisał jeden z antygenów HLA u ludzi Mac układu Hu-1 (obecnie swoistość HLA-A2). Zasadnicza rola cząsteczek HLA (human leukocytes antigens) polega na prezentacji obcych antygenów własnym limfocytom T.

Początkowo antygeny HLA określano testami serologicznymi, widoczny postęp wiąże się z włączeniem do badań technik molekularnych (1, 2). Określenie sekwencji nukleotydów kodujących łańcuchy polipeptydów HLA o takich samych antygenach umożliwiło wykazanie, że alleli kodujących daną cząsteczkę jest więcej niż swoistości antygenowych wykrywanych metodami serologicznymi.

Układ antygenów zgodności tkankowej człowieka stanowi zespół sprzężonych genów kodujących syntezę poszczególnych alloantygenów HLA umiejscowionych w obrębie krótkiego ramienia chromosomu 6. Obejmuje on ponad 4 miliony par zasad i zawiera ponad 80 genów (5). Region chromosomalny genów HLA stanowi segment o długości 3 jednostek rekombinacyjnych (3 cM).

W obrębie regionu HLA człowieka wyróżnia się trzy klasy antygenów o odmiennej strukturze i lokalizacji. W każdej z klas występują wieloalleliczne kompleksy genowe.

Antygeny klasy I HLA zwane też klasycznymi antygenami transplantacyjnymi występują na powierzchni wszystkich komórek jądrzastych. Największą ich koncentrację stwierdzono we frakcji limfocytarnej leukocytów T, następnie w śledzionie, wątrobie, skórze, płytkach krwi, tkankach łożyska. Niewielkie ilości antygenów HLA klasy I wykazano w nerkach, płucach a nawet w erytrocytach. Cząsteczki HLA klasy I kodowane są przez geny loci A, B, C.

Antygeny klasy II HLA kodowane przez geny loci: DR, DQ i DP występują na komórkach prezentujących antygen APC (*antigen presenting cell*): na limfocytach B, makrofagach, komórkach Langerhansa, komórkach nabłonkowych grasicy (3).

Antygeny klasy III (nie HLA) obejmują białka wchodzące w skład układu dopełniacza (C2, C4) oraz czynnik properdyny (Bf) (18).

W regionie klasy III znajdują się również dwa geny CYP21 i CYP21B kodujące strukturę enzymu 21-hydroksylazy oraz czynnik martwicy nowotworu (TNF) (7).

### Struktura antygenów HLA klasy II

Cząsteczki HLA klasy II są heterodimerami zbudowanymi z łańcuchów glikoproteinowych ciężkich  $\alpha$  (31-34 kDa) i lekkich  $\beta$  (26-29 kDa). Część zewnątrzkomórkowa (N-końcowa) jest zbudowana w obydwu łańcuchach z dwóch domen. Krótki odcinek śródbłonowy ma długość 23 aminokwasów, a odcinek wewnątrzkomórkowy 8-15 aminokwasów (15). Polimorfizm cząsteczek MHC klasy II dotyczy głównie domen  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  (31). Domeny  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  są podobne do domen części stałych immunoglobulinowych łańcuchów ciężkich.

Region genomu kodujący antygeny HLA klasy II ma długość około 1000 kpz i dzieli się na kilka podregionów, z których przynajmniej trzy wieloalleliczne grupy: DR, DQ, DP, kodują klinicznie istotne białka. Dotychczas opisano 28 serologicznych swoistości HLA-DR, 9 dla HLA-DQ oraz 8 swoistości dla HLA-DP. W obszarze regionu HLA klasy II wyróżniono łącznie 425 alleli (4). Obecnie wiadomo, że w regionie tym mieszczą się również loci określone jako DMA, DMB, DOA i DOB.

Najbardziej polimorficzną budowę wykazują łańcuchy  $\beta$  (3 DR, a w genomie mogą występować aż cztery funkcjonalne geny kodujące ich sekwencję: DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5 (12). Pierwszy z nich, wykazujący najwyższy stopień polimorfizmu, występuje w wszystkich ludzi. Pozostałe mogą, ale nie muszą mu towarzyszyć. W zależności od budowy tego regionu genomu wśród ludzi wyróżniono 5 haplotypów (16). W trzech z nich genowi DRB1 towarzyszą inne geny: DRB5 (haplotyp DR51), DRB3 (haplotyp DR52) czy DRB4 (haplotyp DR53) (3). Dodatkowo stwierdza się w tym regionie szereg pseudogenów DRB.

Zastosowana w pracy metoda PCR-SSP (sequence specific primer) wg Olerupa (13) umożliwia szybkie typowanie HLA i ujawnienie w krótkim czasie produktów PCR w elektroforezie agarozowej.

Celem pracy była optymalizacja warunków izolacji genomowego DNA z krwi pełnej, płam krwi, a także tkanek miękkich (mięśni poprzecznie prążkowanych i mózgu), amplifikacji alleli HLA-DR metodą PCR-SSP i ich detekcji, a także określenie częstości alleli HLA-DR w populacji Polski północnej. Oceniono również parametry charakteryzujące przydatność alleli HLA-DR w medycynie sądowej, w dochodzeniu ojcostwa oraz w identyfikacji osobniczej przy wykorzystaniu DNA wyizolowanego z różnego rodzaju materiałów biologicznych.

### MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

DNA izolowano z krwi pełnej pobranej od 228 dorosłych niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej, z eksperymentalnych płam krwi (rocznych i dwuletnich) oraz z tkanek miękkich pobranych ze zwłok podczas sekcji (mięśni szkieletowych, mózgu, w tym tkanek dwumiesięcznego płodu).

Do ekstrakcji DNA wykorzystano komercyjne zestawy do izolacji DNA z krwi świeżej, oraz płam krwi „Blood DNA Prep Plus - A & A BIOTECHNOLOGY”, „Wizard® Genomie DNA Purification Kit PROMEGA” oraz z tkanek stałych „Genomie DNA Prep Plus A & A BIOTECHNOLOGY”.

Dodatkowo do izolacji DNA z krwi pełnej zastosowano metodę nieenzymatyczną wg Lahiri (10), z plam krwi - technikę z Chelex 100 (19), DNA z tkanek miękkich izolowano metodą klasyczną (fenol/chloroform) (20).

Do amplifikacji wybranego fragmentu DNA locus HLA-DR zastosowano zestaw odczynników DYNAL DR „low resolution” - SSP (17) z 24 parami starterów, w tym 21 par starterów dla locus DRB1 i 3 pary starterów dla loci DRB3, DRB4 i DRB5. Do zestawu dołączone są kontrolne pary starterów pozwalające na wykluczenie fałszywej pozytywnej lub negatywnej kontroli reakcji PCR i jednoznaczny identyfikację alleli regionu DR w zakresie 1-18 z locus DRB1 (10 różnych alleli z podtypami) z włączeniem allela DR 103 oraz trzema tzw. „publicznymi allelami” loci DRB3 (DR52), DRB4 (DR53) i DRB5 (DR51).

Mieszanina do reakcji PCR zawierała: 25 ul buforu do reakcji PCR (500mM KCl; 100mM Tris/HCl-pH9,0; 1% Triton® X-100), 20 ul dNTP (200uM), 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1,9 ul Taq DNA Polimerazy (5U/ul), 45 uJ DNA (stężenie końcowe 10-50 ng/ul), 11 ul wody HPLC.

W/w mieszaninę umieszczano w termocyclerze (Mastercycler Gradient, f-my Eppendorf) i poddawano amplifikacji w 30 cyklach w następujących warunkach:

Wstępna denaturacja	94° C - 2 min
I FAZA 10 cykli	
Denaturacja	94° C - 10 s
Hybrydyzacja (przyłączanie starterów)	65° C - 60 s
i Elongacja DNA (wydłużanie)	
II FAZA 20 cykli	
Denaturacja	94° C - 10 s
Hybrydyzacja	61° C - 50 s
Elongacja DNA	72° C - 30 s

Produkty reakcji PCR rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Żel wylewano na płytkę o wymiarach 15x14cm zawierającą dwa 20-studzienkowe grzebienie i pozostawiono na około 30 min aż do zastygnięcia. Następnie żel umieszczano w komorze elektroforetycznej wypełnionej buforem TBE. Do studzienek nanoszono po 8 lxl próbek DNA uprzednio zmieszanych z 2 uJ buforu obciążającego.

Elektroforezę na żelu agarozowym prowadzono przy 180 V przez okres 20 mm.

## ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane wyniki poddano komputerowej analizie statystycznej. Obliczono częstości alleli, a także współczynniki określające przydatność analizowanego locus w medycynie sądowej: szansę wykluczenia ojcostwa MEC (mean exclusion probability), zawartość informacji genetycznej PIC (polymorphic information

content), prawdopodobieństwo zgodności pM (probability of match) oraz siłę dyskryminacji PD (power of discrimination).

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Zastosowane w pracy metody izolacji pozwoliły na uzyskanie optymalnej ilości DNA koniecznej do jego amplifikacji. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR umożliwił uzyskanie czytelnego obrazu analizowanych alleli zarówno w odniesieniu do DNA ekstrahowanego z krwi pełnej jak i z tkanek miękkich.

W przypadku krwi pełnej najlepsze rezultaty uzyskiwano stosując metodę nieenzymatyczną, a przy typowaniu DNA w tkankach miękkich (mięśnie, mózg) najlepsze wyniki uzyskiwano przy użyciu klasycznej metody fenolowo-chloroformowej. Zarówno krew jak i tkanki miękkie okazały się dobrym materiałem do oznaczania alleli HLA-DR, każdorazowo uzyskiwano wyraźny sygnał amplifikacji.

Dobre rezultaty uzyskano również przy typowaniu alleli HLA-DR w tkankach dwumiesięcznego płodu.

Taka możliwość z sądowego punktu widzenia jest szczególnie ważna, gdyż pozwala na określenie profilu DNA locus DR już w życiu płodowym.

Analiza alleli DR w śladach krwi nie zawsze dawała zadowalające rezultaty, z plam krwi o powierzchni 0,5x0,5 cm otrzymywano średnio 6-10 ng/ul DNA. Często uzyskiwano słaby sygnał amplifikacji, trudny do zinterpretowania, a wydajność zastosowanych technik izolacji DNA do analizy alleli locus DR w śladach krwi wynosiła ok. 60%. Na podobne rezultaty wskazywali również inni autorzy (1).

W analizowanej populacji spośród 55 teoretycznie możliwych fenotypów HLA-DR wykazano 39. Najczęstszymi były: HLA-DR 5/6, HLA-DR 6/6 i HLA-DR 3/5 (z częstościami: 0,084; 0,07 i 0,053 odpowiednio). Najrzadziej, z częstością 0,0045, obserwowano fenotypy HLA-DR 6/7, HLA-DR 5/9 i HLA-DR 5/10.

W oparciu o wykazane częstości fenotypowe obliczono częstości alleli dla układu HLA-DR. Przedstawiono je w tabeli I.

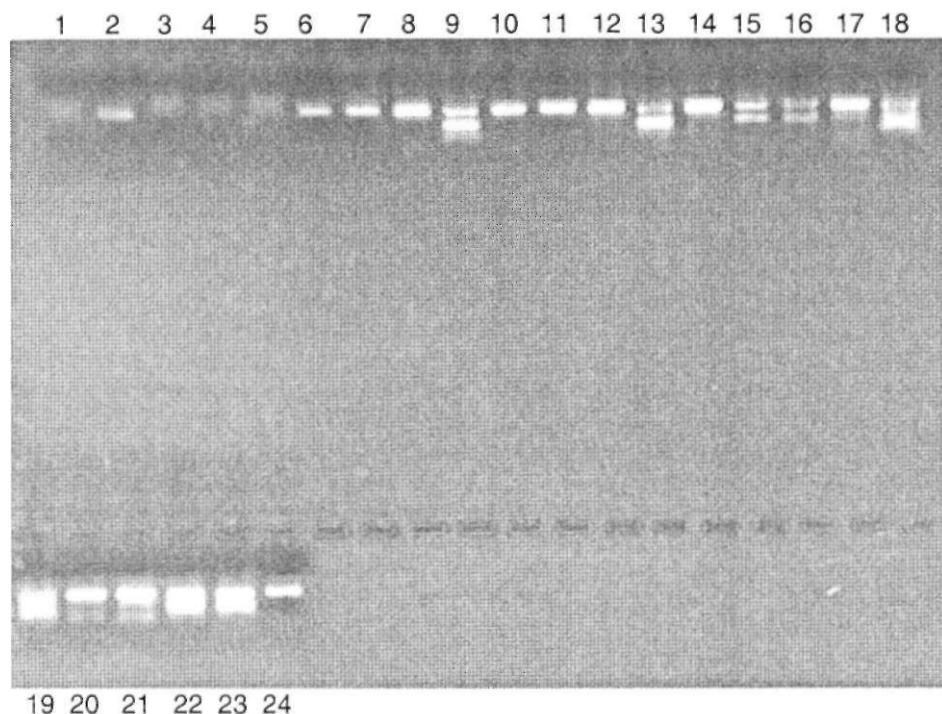
Tabela I. Częstości alleli locus HLA-DR.

Table I. Frequencies of the HLA-DR alleles.

Allel	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5	DR6	DR7	DR8	DR9	DR10
Ilość Amount	45	51	56	38	79	96	58	11	5	11
Częstość obserwowana frequency observed (%)	9,3	11,8	12,2	9,8	17,3	20,9	12,7	2,4	1,2	2,4

W badanej populacji wykazano obecność 10 różnych alleli HLA-DR. Najczęściej pojawiały się allele DR6, DR5 i DR7 (z częstościami odpowiednio 20,9%; 17,3% i 12,7%). Najrzadziej z częstością 1,2% pojawiał się allel DR9.

Na ryc. 1 przedstawiono przykład fenotypu locus HLA-DR 5/7.



Ryc. 1. Przykład fenotypu HLA-DRB 5/7 od lewej: ścieżka 9 - allel DR 7, potwierdzony na ścieżce 23 ścieżki 13, 15, 16, 18 - allel DR 5, potwierdzony na ścieżce 22

Fig. 1. Phenotype of HLA-DR B 5/7 from left: lane 9 - allel DR7 lanes 13,15, 16, 18-allele DR5

W celu sprawdzenia, czy badana populacja pozostaje w równowadze Hardy-Weinberga, obliczono częstości oczekiwane, a uzyskane wartości zweryfikowano testem  $\chi^2$ . Uzyskano następujące wartości:  $\chi^2 = 55,65$ ;  $0,3 < p < 0,7$  dla 54 stopni swobody. Powyższe dane dowodzą że analizowana populacja odpowiada warunkom próby losowej i znajduje się w stanie równowagi genetycznej.

Rozkład częstości alleli dla badanego locus HLA-DR porównano z rozkładem częstości tych alleli w innych populacjach. Wyniki zostały przedstawione w tabeli II.

Częstości alleli wykazane w badaniach populacji Polski były najbardziej

zblizone do danych populacji francuskiej. W obu przypadkach najczęściej pojawiały się allele DR5 i DR6. Stosunkowo największe różnice w częstościach alleli obserwowano przy porównaniu własnych danych z populacją Tajwanu.

Tabela II. Porównanie częstości występowania alleli locus HLA-DR w różnych populacjach.

Table II. Frequencies of the HLA-DR alleles in different populations

Allel	Populacja (Population)				
	Polska pn Poland n=228	Francja France (14) n=100	Finlandia Finland (9) n=182	Szwecja pd Sweden (2) n=340	Tajwan Taiwan (11) n=136
DR1	0,0930	0,1000	0,1896	0,1120	0,0070
DR2	0,1180	0,0830	0,1648	0,0030	0,1810
DR3	0,1220	0,1250	0,1099	0,1360	0,0740
DR4	0,0980	0,1140	0,1786	0,2600	0,1520
DR5	0,1730	0,2080	0,0550	0,1260	0,1890
DR6	0,2090	0,2010	0,1236	0,1680	0,0980
DR7	0,1270	0,1300	0,0412	0,1180	0,0120
DR8	0,0240	0,0350	0,0934	0,0710	0,0960
DR9	0,0120	0,0000	0,0302	0,0030	0,1610
DR10	0,0240	0,0050	0,0137	0,0030	0,0110

Na podstawie obserwowanej częstości fenotypów w badanej populacji obliczono szereg parametrów charakteryzujących przydatność omawianego układu, zarówno do badań w dochodzeniu ojcostwa, jak i do identyfikacji osobniczej. Przedstawiono je w tabeli III.

Tabela III. Parametry statystyczne genetyczne wskazujące na przydatność locus HLA-DR w medycynie sądowej.

Table III. Indicator values for the usefulness of HLA-DR locus in forensic Medicine

Parametry statystyczne	Wartość
Heterozygotyczność (heterozygotes)	Obserwowana (observed) 0,822 Oczekiwana (expected) 0,825
Siła dyskryminacji PD (power of discrimination)	0,963
Wskaźnik informacji genetycznej PIC (polymorphic information content)	0,850
Szansa wykluczenia ojcostwa MEC (mean exclusion chance)	0,743
Siła wykluczenia PE (power of exclusion)	0,641
Prawdopodobieństwo zgodności pM (matching probability)	0,037

Powyższe parametry, a szczególnie wysoka siła dyskryminacji wynosząca 0,963 oraz wysoka wartość informacji polimorficznej (0,850) czynią badany system przydatnym w medycynie sądowej w badaniach identyfikacyjnych.

Wartość heterozygotyczności obserwowanej wynosi 0,822, podczas gdy heterozygotyczność oczekiwana wynosi 0,825. Uzyskana wysoka zgodność obu wartości dowodzi, że zastosowane w pracy metody są właściwe.

W pracy obliczono również średnią szansę i siłę wykluczenia ojcostwa, które wyniosły odpowiednio 0,743 i 0,641. Powyższe dane świadczą o wysokiej przydatności systemu HLA-DR w dochodzeniu spornego ojcostwa.

## WNIOSKI

1. Zastosowana w pracy metoda PCR - SSP okazała się bardzo czuła i pozwoliła na uzyskanie pewnych i powtarzalnych wyników amplifikacji w oparciu o niewielką ilość matrycowego DNA (również tkanek dwumiesięcznego płodu).
2. Rozkład alleli HLA-DR badanej populacji był zgodny z prawem Hardy-Weinberga.
3. Korzystne parametry statystyczne dla locus HLA-DR (DP, PIC, MEC, PE, pM) wskazały na jego wysoką przydatność w medycynie sądowej zarówno w dochodzeniu ojcostwa jak i w badaniach identyfikacyjnych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Allen, M., Saldeen, T., Gyllensten, U.: PCR-Based DNA Typing of Saliva on Stamps and Envelopes, 1994, *BioTechniques* 17, 3: 546-552. - 2. Allen, M., Saldeen, T., Pettersson, U., Gyllensten, U.: Genetic typing of HLA class II genes in Swedish populations application to forensic analysis, 1993, *J.Forens.Sci.* 38: 554-570 - 3. Bodmer, J. G., Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach, W. R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G. M. Th., Strominger, J.L., Svejgaard, A., i Terasaki, P. I.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1994, *Tissue Antigens* 44: 1-18. - 4. Bodmer, J.G., Marsh, S.G., Albert, E.D., et al.: Nomenclature for factors of the HLA system 1998, *Eur.J.Immunogenetics*, 1999, 26: 81-116. - 5. Breuning, M. H., van den Berg-Loonen, E., Bernini L. F., Bijlsma, J. B., van Loghem, E., Khan, P. M., Nijenhuis, L. E.: Localization of HLA on the short arm of chromosome 6, 1977, *Hum. Genet.* 37: 131-139. - 6. Dausset, J.: Iso-leuco-anticorps., 1958, *Acta Haemat.* 20: 156-166. - 7. Ghanen, N., Lobaccaro, J.M., Buresic, C, Abbal, M., Halaby, G., Sultan, C, Lefranc, G.: Detective, deleted or converted CYP21B gene and negative association with rare restriction fragment length polymorphism allele of the factor B gene in congenital adrenal hyperplasia, 1990, *Hum.Genet.* 86, 117-125. - 8. Gorer, P.A.: The genetic and antigenic basis of tumour transplantation, 1937, *J.Pathol.Bacteriol.*, 44: 691-697. - 9. Ikaheimo, I., Silvennoinen-Kassinen,

S. & Tiilikainen, A.: HLA five-locus haplotypes in Finns, 1996, *Eur.J.Immuogenet.* 23, 321-328. - 10. Lahiri, D.K., Bye, S., Nurberger, J.L., Hodes, M.E., Crisp, M.: A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested, 1992, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 25, 193-205.

11. Lin, M.: The origin of Minnan and Hakka the so-called "Taiwanese" inferred by HLA study, Mackay Memorial Hospital, WUFI World United Formosans for Independence, 5.11.2001. - 12. Matsuzaka, Y., Makino, S., Nakakjima, K., Tomizawa, M., Oka, A., Kimura, M., Bahsam, S., Tamiya, G., Inoko, H.: New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region, 1999, *Tissue Antigens* 56 (6), 492-500. - 13. Olerup, O., Zetterquist, H.: Identification of the HLA-DRB1\*04,- DRB1\*07, and, - DRB1\*09 Alleles by PCR Amplification with Sequence - Specific Primers (PCR-SSP) in 2 Hours, 1992, *Hum. Immunog.* 34, 64-74. - 14. Sanchez-Mazas, A., et al.: A Linkage Disequilibrium Map of the MHC Region Based on the Analysis of 14 loci Haplotypes in 50 French Families, 2000, *Eur.J.Hum.Genet.* 8: 33-41. - 15. Strominger, J. L.: Structure of Class I and Class II HLA antigens, 1987, *Brit. Med. Buli.* 43: 81-90. - 16. Svensson, A.C., Setterblad, N., Pihlgren, U., Rask, L., Andersson, G.: Evolutionary relationship between human major histocompatibility complex HLA-DR haplotypes, 1996, *Immunogen.* 43: 304-314. - 17. Szczerkowska, Z., Wysocka, J.: Określenie alleli HLA klasy II locus DR metodą PCR-SSP. Zastosowanie w medycynie sądowej, 1999, *Post.Med.Sąd.Kryminol.*, Tom V, 357-364. - 18. Teisberg, P., Akenson, I., Olaisen, B., Gedde-Dahl, T., Thorsby, E.: Genetic polymorphism of C4 in man and localization of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6, 1976, *Nature* 264: 253-254. - 19. Walsh et al., Metzger, D.A., Higuchi, R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, 1991, *BioTechniques* 1, 91-98. - 20. Wiegand, P., Schurenkamp, M., Schuttler, U.: DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis, 1992, *Int. J. Leg. Med.* 104, 359-360.

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