

Agnieszka Maciejewska*, Regina Paszkowska*, Ryszard Pawłowski

Identyfikacja trzech rzadkich alleli: D21S11*24.2, D7S820*9.1 i HUMFGA*19.2 w populacji polskiej

Identification of three rare allele: D21S11*24.2, D7S820*9.1 and HUMFGA*19.2 in the Polish population

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska - profesor AM
Z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie
Dyrektor: mgr A. Głazek

Praca przedstawia identyfikację w populacji polskiej trzech rzadkich alleli: D21S11*24.2, D7S820*9.1 i HUMFGA*19.2 nie obserwowanych dotychczas w Polsce. Warianty zidentyfikowano podczas rutynowych badań ponad 1600 próbek porównawczych. Praca prezentuje również obserwowane częstości alleli dla trzech w/w loci w dużych próbkach populacyjnych osobników z obszaru Polski.

This paper presents the identification of three rare alleles: D21S11*24.2, D7S820*9.1 and HUMFGA*19.2 not observed previously in a polish population. Allelic variants were identified during routine analysis of more than 1600 reference samples. DNA extracts were amplified using ProfilerPlus kit or monoplex reactions. PCR products were separated using capillary electrophoresis with fluorescent detection. Population genetics data of D21S11, D7S820 and HUMFGA loci including minimal allele frequencies (p_{min}) in large population samples from Poland are also presented.

Słowa kluczowe: STR, rzadkie warianty, genetyka populacyjna, Polska północna

Key words: STR, rare variants, population genetics, North Poland

WSTĘP

Od szeregu lat wiele *loci* typu STR znalazło szerokie zastosowanie w genetyce sądowej zarówno do badania spornego ojcostwa jak i identyfikacji śladów

biologicznych. Szczególnie przydatne są te *loci*, które charakteryzują się wysoką siłą dyskryminacji, obecnością alleli o bardzo krótkich fragmentach oraz możliwością ich amplifikacji w reakcji kompleksowego PCR. Ta ostatnia cecha jest niezaprzeczalną zaletą szczególnie w przypadku pracy ze zdegradowanym materiałem biologicznym bądź znikomymi ilościami DNA. Od szeregu lat na rynku dostępne są komercyjne zestawy do kompleksowej amplifikacji wielu *loci* człowieka. Szereg z nich zostało poddanych szczegółowej weryfikacji w aspekcie ich przydatności do badań identyfikacyjnych (6,7,9). Zastosowanie wysoce rozdzielczych technik badania długości i sekwencji fragmentów DNA stworzyło możliwość precyzyjnej identyfikacji nie tylko powszechnie występujących alleli ale również rzadkich wariantów wykazujących polimorfizm długości lub sekwencji. Znajomość częstości alleli i genotypów jest nieodzowna przy statystycznym opiniowaniu przypadków z zakresu genetyki sądowej. Wysoce polimorficzne *loci*, takie jak mikrosatelity (STR) zawierają liczne allele a szereg z nich należy do rzadkich (5). Zgodnie z sugestiami Chakraborty'ego (4) za rzadki allele uważa się ten, który występuje w populacji z częstością poniżej 0.01. Niniejsza praca opisuje identyfikację, metodą wysocerodzielczej techniki elektroforezy kapilarnej, trzech bardzo rzadkich alleli w zakresie *loci* D21S11, D7S820 i HUMFGA, które nie były dotychczas obserwowane w Polsce.

MATERIAŁY I METODY

Badaniom poddano materiał biologiczny w postaci krwi lub wymazów z jamy ustnej pobranych jako materiał porównawczy od 2122 (HUMFGA), 1843 (D21S11) i 1622 (D7S820) osób obu płci pochodzących głównie z obszaru Polski północnej. DNA izolowano metodą Wieganda i wsp. po zastosowaniu niewielkich modyfikacji [10]. Ilość DNA oznaczano metodą fluorymetryczną (1,2) lub metodą hybrydacji z sondą swoistą dla DNA naczelnych (QuantiBlot, Perkin-Elmer, USA).

Amplifikację 10 *loci* zawartych w zestawie ProfilerPlus prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (Perkin-Elmer, USA). Amplifikację *loci* HUMFGA i D21S11 metodą monopleksowego PCR prowadzono jak opisano wcześniej (5,8). Reakcję PCR prowadzono stosując urządzenia do PCR firm Perkin-Elmer (ABI2400 i 877), Biometra (Trithermobloc i T-personal) oraz Polygen (Poly-ChainII).

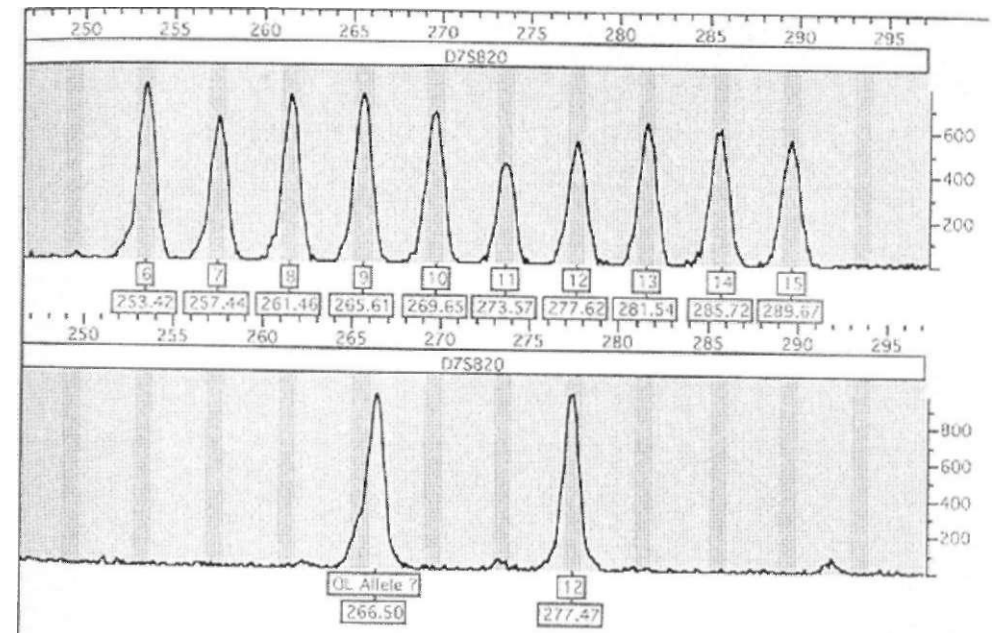
Wielkości produktów PCR znakowanych fluorescencyjnie analizowano metodą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze DNA ABI310 (Perkin-Elmer, USA). Produkty rozdzielano w kapilarze o długości 47 cm wypełnionej denaturującym nośnikiem POP4. Rozdział prowadzono przez 24 min. przy napięciu 15kV, 9mW i ok. 8mA. Jako standardu wewnętrznego wielkości DNA użyto markera ILS400 znakowanego CXR (Promega, USA) (9). Analizę wielkości fragmentów DNA przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania Gene Scan v.2.0. firmy Perkin-Elmer, USA. Allele dla *loci* powielanych metodą monopleks PCR określano porównując do sekwencjonowanych drabin alleli otrzymanych dzięki uprzejmości Prof. B. Brinkmann'a.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badaniom poddano stosunkowo liczne próbki populacyjne: 1649, 1869 i 2122 odpowiednio w przypadku *loci* D7S820, D21S11 i HUMFGA.

Wśród 3244 alleli w *locus* D7S820 stwierdzono łącznie 11 alleli (Tabela I) i 34 z 66 możliwych genotypów oraz heterozygotyczność obserwowaną (H_{obs}) równą 0.7944.

Trzy z zaobserwowanych alleli w badanej populacji pojawiły się tylko raz. Są to allele: 6, 15 i nie obserwowany dotychczas w Polsce allele 9.1. Rycina 1 przedstawia elektroforegram prezentujący genotyp 9.1,12.



Ryc. 1. Elektroforegram prezentujący obecność allelu 9.1 w *locus* D7S820. Panel górny: rozdział drabiny alleli *locus* D7S820 metodą CE; Panel dolny: rozdział próbki o fenotypie 9.1,12.

Fig. 1. Electropherogram presenting the allele 9.1 in D7S820 locus. Upper panel: D7S820 allelic ladder. Lower panel: D7S820 genotype 9.1,12.

Wariant 9.1 nie jest obecny w drabiny alleli zestawu ProfilerPlus a zatem, że jest to ten właśnie wariant przemawia jego wielkość określona przy zastosowaniu standardu wewnętrznego w postaci ILS400, który umożliwia znacznie precyzyjniejsze określenie wielkości allelu (5,9) niż przy zastosowaniu GS500. W badanym przypadku wielkość nieznanego allelu była dokładnie o 11pz krótsza niż 12 allelu obecnego w tej samej próbce (Ryc. 1). Ustalenie, iż zidentyfikowano wariant potwierdzone zostało również analizą monopleksową w zakresie *locus*

Tabela I. Częstości alleli dla loci HUMFGA, D21S11 i D7S820 w populacji polskiej.

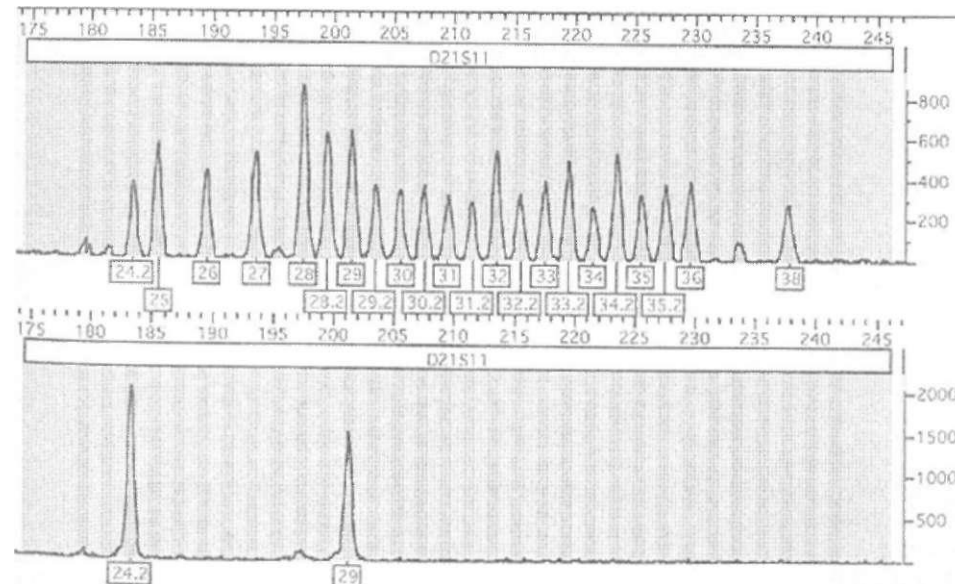
Table I. Allele frequencies of HUMFGA, D21S11 and D7S820 loci in the polish population.

Allele	HUMFGA (n=2122)	D21S11 (n=1843)	D7S820 (n=1622)
6			0.0003
7			0.0132
8			0.1511
9			0.1439
9.1			0.0003
10			0.2924
11			0.1980
12			0.1594
13			0.0292
14			0.0049
15			0.0003
16	0.0007		
17	0.0025		
18	0.0179		
19	0.0867		
19.2	0.0002		
20	0.1524		
20.2	0.0003		
21	0.1870		
21.2	0.0023		
22	0.1889		
22.2	0.0124		
23	0.1185		
23.2	0.0094		
24	0.1237		
24.2	0.0007	0.0003	
25	0.0688		
25.2	0.0007	0.0003	
26	0.0216	0.0037	
27	0.0030	0.0209	
28	0.0011	0.1782	
29		0.2089	
29.2		0.0003	
30		0.2190	
30.2		0.0564	
31		0.0695	
31.2		0.0876	
32		0.0111	
32.2		0.1020	
33		0.0027	
33.1.2		0.0007	
33.2		0.0364	
34.2		0.0024	

D7S820 po ponownej izolacji tej samej próbki. Jak wykazaliśmy uprzednio (9) zastosowanie standardu wewnętrznego w postaci ILS400 umożliwia znacznie precyzyjniejsze określenie wielkości fragmentu niż w przypadku zastosowania GS500 (wartość SD wynosiła 0.06-0.16pz dla analiz wykonanych na różnych kapilarach) i tym samym rozróżnienie nie tylko alleli różniących się o 2pz ale również o 1pz ($\pm 3SD$). Ostateczne potwierdzenie tego wariantu wymaga jednak zastosowania bezpośredniego sekwencjonowania produktu PCR. Obliczone częstości rzadkich alleli dla tego locus wynoszą 0.0003. Mając jednak na uwadze sugestie Chakraborty'ego (4) oraz Budowle i wsp. (3) przy obliczeniach częstości profili DNA zawierających rzadkie allele dla celów sądowych, należy posługiwać się wartością minimalnej częstości alleli (p_{min}), uwzględniającej nie tylko liczebność badanej populacji ale również wartość heterozygotyczności locus. Tak obliczone wartości dla tych trzech alleli winny więc wynosić 0.001312.

Dla 1843 próbek DNA badanych w zakresie locus D21S11 stwierdzono 17 alleli (Tab. I) i 77 genotypów z 153 możliwych oraz heterozygotyczność obserwowaną równą 0.8550. Wśród 3686 alleli stwierdzono 7 rzadkich (Tab. I). Cztery z zaobserwowanych 17 alleli pojawiły się tylko raz. Są to: 33.1.2 (5), 29.2, 25.2 i nie obserwowany dotychczas w Polsce allel 24.2.

Rycina 2 przedstawia elektroforegram genotypu 24.2, 29. Allel 24.2 jest w pełni zgodny co do ruchliwości elektroforetycznej z obecnym w drabinie alleli ProfilerPlus sekwencjonowanym standardem 24.2.



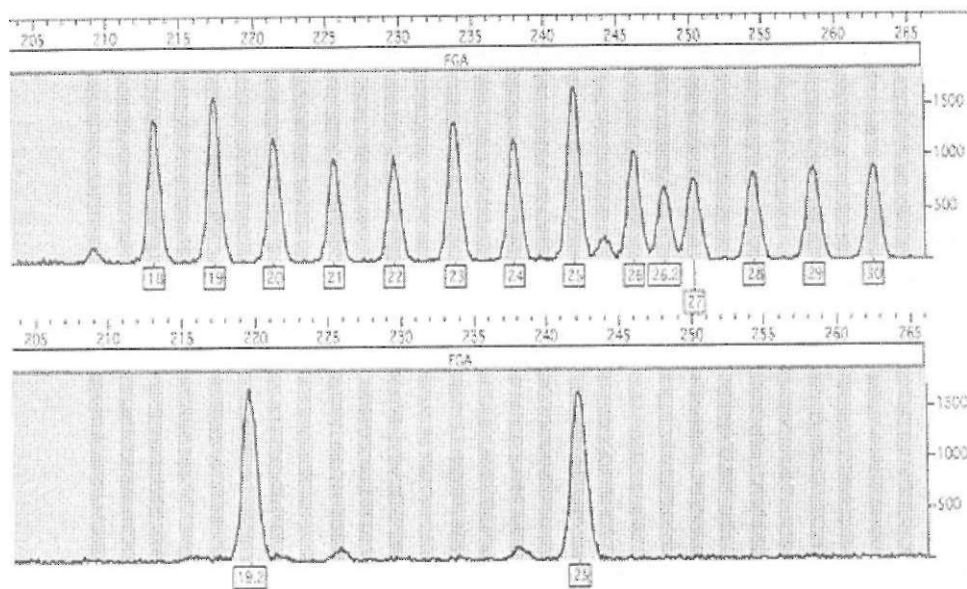
Ryc. 2. Elektroforegram prezentujący obecność allelu 24.2 w locus D21S11.

Panel górny: rozdział drabiny alleli locus D21S11 metodą CE; Panel dolny: rozdział próbki o fenotypie 24.2, 29.

Fig. 2. Electropherogram presenting the allele 9.1 in D21S11 locus. Upper panel: D21S11 allelic ladder. Lower panel: genotype 24.2, 29 in locus D21S11.

Analogicznie, jak w przypadku locus D7S820 obliczono wartość p_{min} , która dla próbki liczącej 1843 alleli i obserwowanej heterozygotyczności równej 0.8550 wynosi 0,001270.

Trzeci nie obserwowany dotychczas w Polsce allel stwierdzono w zakresie locus HUMFGA. W badanej populacji 2122 osób zaobserwowano łącznie 20 alleli (Tabela I) oraz 91 genotypów z 210 możliwych. Obliczona wartość heterozygotyczności obserwowanej wyniosła 0.8523. W analizowanej populacji allel 19.2 pojawił się tylko raz i nie był obserwowany dotychczas w Polsce. Ponadto zaobserwowano 9 rzadkich alleli: 16, 17, 20.2, 21.2, 23.2, 24.2, 25.2, 27 i 28 (Tab. I). Rycina 3 przedstawia elektroforegram prezentujący genotyp 19.2, 25.



Ryc. 3. Elektroforegram prezentujący obecność allelu 19.2 w locus HUMFGA. Panel górny: rozdziel drabiny alleli locus HUMFGA metodą CE; Panel dolny: rozdziel próbki o fenotypie 24.2, 29.

Fig. 3. Electropherogram presenting allele 19.2 in HUMFGA locus. Upper panel: HUMFGA allelic ladder. Lower panel: genotype 19.2, 25 in locus HUMFGA.

Porównanie wielkości allelu 19.2 z obecnymi w drabnie alleli Profilera, allelami 19 i 20 wykazało, iż jego wielkość dokładnie odpowiada allelowi pośredniemu 19.2.

Obliczona wartość p_{min} , dla 4244 alleli i $H_{obs} = 0.8523$ wynosi 0,001113. Wartość ta jest niższa niż w przypadku p_{min} dla D21S11 głównie ze względu na fakt liczniejszej o prawie 400 osobników populacji. Zgodnie z zależnościami podanymi przez Chakraborty'ego przy tej samej liczebności badanych prób

niższa wartość p_{min} charakteryzuje loci o mniejszej heterozygotyczności obserwowanej (3, 4).

PIŚMIENNICTWO

1. Bontemps I., Houssier O., Frederig E.: Physico-chemical study of the complex of „33258 Hoechst” with DNA and nucleohistone. *Nucleic Acids Res.*, 1975, 2: 971-984.
2. Brunk O F., Jones K. D. James T. W.: Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal. Bioch.* 1979, 92: 497-500.
3. Budowle B., Monson K.L., Chakraborty. R.: Estimating minimum allele frequencies for DNA profile frequency estimates for PCR-based loci. *Int-J-Legal-Med.* 1996, 108(4), 173-6.
4. Chakraborty R.: Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum-Biol.* 1992, 64(2), 141-59.
5. Dettlaff-Kąkol A., Pawłowski R.: Additional variability at the D21S11 locus: sequencing evidence of a new allele D21S11*33.1, *ZZagad. Nauk sądowych* 2001, XLVII, 314-322.
6. Frank W.E., Llewellyn B.E., Fish P.A., Riech A.K., Marcacci T.L., Gandor D.W., Parker D., Carter R.R., Thibault S.M.: Validation of the AmpFISTR Profiler Plus PCR amplification kit for use in forensic casework. *J-Forensic-Sci.* 2001, 46(3), 642-46.
7. Holt C.L., Buoncristiani M., Wallin J.M., Nguyen T., Lazaruk, K.D., Walsh, P.S.: TWGDAM validation of AmpFISTR PCR amplification kits for forensic DNA casework. *J-Forensic-Sci.* 2002, 47(1), 66-96.
8. Pawłowski R.: HUMFIBRA allele distribution in the Northern Poland using capillary electrophoresis. *Int J Legal Med.* 1999, 112, 139-141.
9. Pawłowski R., Maciejewska A.: Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in northern Poland. *Int-J-Legal-Med.* 2000, 114 (1-2), 45-49.
10. Wiegand P., Schuerenkamp M., Schuette U.: DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. *Int. J Leg Med.*, 1992, 104, 359-360.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
ul. Dębinki 7
80-211 Gdańsk