

JOANNA WYSOCKA, EWA KAPIŃSKA, LIDIA CYBULSKA, KRZYSZTOF RĘBAŁA,
ZOFIA SZCZERKOWSKA

**IDENTYFIKACJA OSOBNICZA W OPARCIU O ANALIZĘ
11 POLIMORFICZNYCH LOCI DNA TYPU STR. BADANIA POPULACJI
POLSKI PÓŁNOCNEJ Z WYKORZYSTANIEM
ZESTAWU AMPFISTR® SEFILER™ KIT**

STUDY ON THE APPLICATION OF AMPFISTR® SEFILER™ KIT
TO PERSONAL IDENTIFICATION. DISTRIBUTION OF ALLELE
FREQUENCIES IN THE POPULATION FROM NORTHERN POLAND

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
kierownik: dr hab. Zbigniew Jankowski

Częstości alleli 11 markerów typu STR: D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA, D21S11, D18S51 określono w oparciu o komercyjny zestaw AmpFISTR® SEfiler™ (f-my Applied Biosystems). Badaniom poddano DNA 255 dorosłych, niespokrewnionych osób z Polski północnej. Mając na uwadze przydatność w/w markerów w medycynie sądowej, obliczono parametry statystyczne, takie jak zawartość informacji polimorficznej, współczynnik dyskryminacji, siła wykluczenia, indeks ojcostwa oraz prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności, a także wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej.

Polimorficzne mikrosatelitarne sekwencje typu STR (ang. short tandem repeat) w ostatnich latach znalazły zastosowanie w badaniach dotyczących ustalenia ojcostwa, jak również w identyfikacji osobniczej. Wykorzystanie zestawów kompleksowej reakcji PCR pozwoliło na jednoczesną amplifikację wielu loci genowych. W pracy przedstawiono wyniki praktycznego zastosowania zestawu AmpFISTR® SEfiler™. Przeprowadzone badania populacyjne umożliwiły ocenę przydatności 11 analizowanych loci STR: D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA, D21S11, D18S51 w hemogenetyce sądowej.

MATERIAŁ I METODA

Badaniom poddano materiał biologiczny pochodzący od 255 dorosłych, niespokrewnionych osób z terenu Polski północnej. DNA izolowano z krwi lub z nabłonków jamy ustnej, stosując tzw. nieenzymatyczną metodę wg Lahiri [4]. Do ekstrakcji DNA stosowano również zestaw „Sherlock AX” [1]. Stężenie DNA określano metodą spektrofotometryczną. Amplifikację i typowanie próbek wykonano przy użyciu systemu AmpFISTR® SEfiler™ (Applied Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta [2]. Produkty amplifikacji rozdzielano drogą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze 3130 Genetic Analyzer. Jako standardu wewnętrznego wielkości DNA użyto markera GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems). Genotypy określono w odniesieniu do drabin allelicznych przy użyciu programu komputerowego GeneMapper ID v.3.2 software (Applied Biosystems). Określono profile 11 autosomalnych loci DNA oraz genu amelogeniny – charakteryzującego płeć badanych osób.

WYNIKI I DYSKUSJA

Rozkład częstości alleli dla 11 systemów STR wykazanych dla populacji Polski północnej przedstawiono w tabeli I.

Testami χ^2 (HWE v. 1.10) oraz Exact (Arlequin Program) zweryfikowano i wykazano zgodność badanej populacji z prawem Hardy–Weinberga [3, 6, 7, 8, 10]. W oparciu o uzyskane częstości alleli obliczono następujące parametry statystyczne: PD (power of discrimination – siła dyskryminacji), PIC (polymorphic information of content – zawartość informacji polimorficznej), PE (power of exclusion – siła wykluczenia), PI (paternity index – indeks ojcostwa), pM (matching probability – prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności), oceniające przydatność analizowanych układów w hemogenetyce sądowej. Przedstawiono je w tabeli II.

Ww. parametry obliczono, stosując program komputerowy PowerStats Version 1.2 (Promega). Otrzymane wartości współczynnika dyskryminacji mieściły się w zakresie od 0,902 (locus D16S539) do 0,991 (locus SE33), zaś siły wykluczenia od 0,515 (D16S539) do 0,880 (SE33). Minimalna wartość PIC wynosiła 0,73 dla loci D16S539 i D19S433, podczas gdy maksymalną wartość tego parametru uzyskano dla układu SE33 i wynosiła ona 0,94. Wyniki te potwierdziły wysoką polimorficzność analizowanego multipleksu AmpFISTR®SEfiler™, zwłaszcza jednego z jego markerów – tj. locus SE33.

Dodatkowo, przeprowadzone badania porównawcze częstości alleli locus SE33 populacji Polski północnej z populacjami węgierską i portugalską (północny jej obszar), nie wykazały znaczących różnic statystycznych ($p=0,19$ i $p=0,61$ odpowiednio) [5, 9].

Łączna przydatność analizowanych loci dla potrzeb sądowych wyrażała się siłą dyskryminacji równą 0,999999999999999. Teoretyczna szansa wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny dla wszystkich analizowanych loci wynosiła łącznie 0,99999 a teoretyczna średnia szansa ojcostwa 0,99999.

Metoda kompleksowej reakcji PCR zastosowana w niniejszej pracy jest bardzo przydatną techniką badawczą, gdyż wymaga niewielkiej ilości DNA, a w czasie jednej reakcji możliwe jest równoczesne określenie wielu polimorficznych markerów. Jest to metoda bardzo ekonomiczna, pozwalająca na uzyskanie wyniku już po kilku godzinach analizy.

System AmpFISTR® SEfiler™ charakteryzuje wysoka czułość, umożliwiającą równoczesną amplifikację 11 loci autosomalnych i genu amelogeniny. Przy użyciu dwóch niezależnych metod

Tab. I

Częstości alleli dla 11 loci STR zestawu AmpFISTR®SEfiler™ w populacji Polski północnej (n=255)
 Allele frequencies for AmpFISTR®SEfiler™ loci in the Northern Poland (n=255)

Locus Allele	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	SE33	D19S433	TH01	FGA	D21S11	D18S51
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	0.224	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	0.135	-	-	-
8	-	-	0.004	-	0.012	-	-	0.106	-	-	-
9	-	-	0.106	-	0.008	-	-	0.204	-	-	-
9.3	-	-	-	-	-	-	-	0.325	-	-	-
10	-	-	0.043	-	0.057	-	-	0.006	-	-	0.010
11	0.002	-	0.263	-	0.067	-	0.002	-	-	-	0.010
11.2	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-
12	-	-	0.312	-	0.184	0.006	0.075	-	-	-	0.110
13	-	0.010	0.229	-	0.322	0.010	0.200	-	-	-	0.106
13.2	-	-	-	-	-	0.002	0.014	-	-	-	-
14	0.169	0.129	0.039	-	0.208	0.024	0.392	-	-	-	0.171
14.2	-	-	-	-	-	-	0.027	-	-	-	-
15	0.237	0.092	0.004	-	0.114	0.051	0.182	-	-	-	0.139
15.2	-	-	-	-	-	-	0.029	-	-	-	-
15.3	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-
16	0.216	0.159	-	0.053	0.027	0.043	0.041	-	-	-	0.145
16.2	-	-	-	-	-	-	0.022	-	-	-	-
17	0.212	0.245	-	0.186	0.002	0.053	-	-	-	-	0.149
17.2	-	-	-	-	-	-	0.010	-	-	-	0.002
18	0.147	0.251	-	0.075	-	0.067	-	-	0.014	-	0.076
18.2	-	-	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-
19	0.018	0.100	-	0.106	-	0.080	-	-	0.076	-	0.031
19.2	-	-	-	-	-	0.006	-	-	-	-	-
20	-	0.014	-	0.133	-	0.059	-	-	0.159	-	0.031
20.2	-	-	-	-	-	0.002	-	-	0.004	-	-
21	-	-	-	0.055	-	0.029	-	-	0.198	-	0.014
21.1	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-
21.2	-	-	-	-	-	0.014	-	-	0.004	-	-
22	-	-	-	0.020	-	0.004	-	-	0.212	-	0.006
22.2	-	-	-	-	-	0.027	-	-	0.016	-	-
23	-	-	-	0.067	-	0.002	-	-	0.096	-	-
23.2	-	-	-	0.002	-	0.041	-	-	0.004	-	-
24	-	-	-	0.110	-	-	-	-	0.114	-	-
24.2	-	-	-	0.006	-	0.037	-	-	0.002	-	-
25	-	-	-	0.175	-	-	-	-	0.076	-	-
25.2	-	-	-	-	-	0.051	-	-	-	-	-
26	-	-	-	0.014	-	-	-	-	0.018	-	-
26.2	-	-	-	-	-	0.061	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006	0.010	-
27.2	-	-	-	-	-	0.067	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.214	-
28.2	-	-	-	-	-	0.092	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	0.188	-
29.2	-	-	-	-	-	0.075	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.247	-
30.2	-	-	-	-	-	0.037	-	-	-	0.043	-
31	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.059	-
31.2	-	-	-	-	-	0.020	-	-	-	0.086	-
32	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.010	-
32.2	-	-	-	-	-	0.012	-	-	-	0.090	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.004	-
33.2	-	-	-	-	-	0.012	-	-	-	0.043	-
34	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.002	-
34.2	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	-
35.2	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	0.002	-
36	-	-	-	-	-	0.002	-	-	-	-	-

Tab. II

Parametry statystyczne charakteryzujące przydatność zestawu AmpFISTR®SEfiler™ w hemogenetyce sądowej
 Statistical parameters of the usefulness of AmpFISTR®SEfiler™ in forensic medicine

Parametry statystyczne locus	χ^2 Test	<i>Exact test</i>	Heterozygotyczność ocz./obs. (%)	Siła dyskryminacji PD	Zawartość informacji polimorficznej PIC	Siła wykluczenia PE	Prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności pM	Indeks ojcostwa PI
D3S1358	0,059	0,076	80,5/79,2	0,926	0,77	0,585	0,074	2,41
VWA	0,581	0,589	81,9/80,4	0,940	0,79	0,606	0,060	2,55
D16S539	0,871	0,849	74,1/72,9	0,902	0,73	0,515	0,098	2,02
D2S1338	0,838	0,897	88,0/86,3	0,971	0,87	0,720	0,029	3,64
D8S1179	0,791	0,810	79,0/78,4	0,932	0,77	0,570	0,068	2,32
SE33	0,623	0,617	94,9/94,1	0,991	0,94	0,880	0,009	8,50
D19S433	0,699	0,750	76,6/76,5	0,914	0,73	0,535	0,086	2,13
TH01	0,485	0,340	77,6/80,6	0,908	0,74	0,599	0,092	2,50
FGA	0,417	0,370	80,0/78,4	0,961	0,84	0,676	0,039	3,11
D21S11	0,507	0,550	75,0/78,4	0,946	0,82	0,728	0,054	3,75
D18S51	0,200	0,196	75,2/69,8	0,969	0,86	0,736	0,031	3,86

statystycznych, wykazano zgodność badanej populacji z prawem Hardy–Weinberga w zakresie rozkładu cech loci AmpFISTR® SEfiler™. Wartości obliczonych parametrów statystycznych, zwłaszcza wysoki współczynnik dyskryminacji, heterozygotyczność obserwowana (najwyższe dla locus SE33 – 0,991; 94,1% odpowiednio), wskazują na dużą przydatność analizowanych polimorficznych systemów w badaniach genetycznych przy rozwiązywaniu różnych problemów w medycynie sądowej. Problemy te mogą dotyczyć zarówno kwestii związanych z dochodzeniem ojcostwa, jak również szeroko pojętych badań identyfikacyjnych.

WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania wykazały wysoką przydatność zastosowanego zestawu AmpFISTR® SEfiler™ w genetyce sądowej.
2. Ważnym argumentem za jego szerokim stosowaniem w praktyce laboratoryjnej jest, z jednej strony wysoka czułość, a z drugiej, stosunkowo niskie koszty analizy.

PIŚMIENNICTWO

1. A&A Biotechnology, 2004. Uniwersalny zestaw do izolacji DNA ze śladów biologicznych „Sherlock AX”. – 2. Applied Biosystems, 2002. AmpFISTR®SEfiler™ PCR Amplification Kit User’s Manual, Foster City, CA, P/N 4335145. – 3. Brenner C., Morris J.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. W: Proceedings of the International Symposium on Human Identification, Madison: Promega Corporation 1989, 21–53. – 4. Lahiri DK, Bye S, Numberger JL, Hodes ME, 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. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1992, 25, 193-205. – 5. Lászik A., Sótonyi P., Rand S., Hohoff C.: Frequency data for the STR locus ACTBP2 (SE33) in eight populations. *Int. J. Legal Med.* 2001, 115, 94–96. – 6. Ott J.: Utility Programs for analysis of Genetic Linkage, Program HWE version 1.10, New York Rockefeller University. – 7. Ott J.: Utility Programs for analysis of Genetic Linkage, Program CONTING version 2.81, New York Rockefeller University. – 8. Parker R.E.: Wprowadzenie do statystyki dla biologów. Warszawa: PWN 1993 rozdz. 6. – 9. Pinheiro M.F., Cainé L., Pontes L., Abrantes D., Lima G., Pereira M.J., Rezende P.: Allele frequencies of sixteen STRs in the population of Northern Portugal. *Forensic Sci. Int.* 2005, 148, 221-223. – 10. Schneider S., Roessli D., Excoffier L.: Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Geneva 2000: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

J. Wysocka, E. Kapińska, L. Cybulska, K. Rębała, Z. Szczerkowska

STUDY ON THE APPLICATION OF AMPFISTR® SEFILER™ KIT TO PERSONAL IDENTIFICATION. DISTRIBUTION OF ALLELE FREQUENCIES IN THE POPULATION FROM NORTHERN POLAND

Summary

Short tandem repeat (STR) loci are important polymorphic markers for paternity testing and personal identification. The AmpFLSTR SEfiler Kit commercially available is designed to amplify simultaneously eleven STR loci: D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, SE33, D19S433, TH01, FGA,

D21S11, D18S51. In this study, this kit was applied to analyze the STR loci in blood/saliva samples from 255 unrelated individuals from northern Poland. Genomic DNA was isolated from the blood using a non-enzymatic method and from the saliva using „Sherlock AX”. Multiplex PCR was performed using fluorescent primers according to the manufactures instructions – AmpFISTR®SEfiler™ users manual (Applied Biosystems). PCR products were separated by denaturing polyacrylamide capillary electrophoresis in an automated 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Fragment sizes were determined using the internal standard GeneScan-500 LIZ. Alleles were compared with AmpFISTR SEfiler allelic ladder. The results were analyzed using GeneMapper ID v.3.2 software (Applied Biosystems).

Allele frequencies for the eleven STR systems in North Poland population and statistical parameters like PD, PIC, PE, PI, pM, heterozygosity observed (Ho) and heterozygosity expected (He) were calculated. Possible divergence from Hardy-Weinberg equilibrium was determinate by χ -square test using Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage HWE Version 1.10 and by Exact test using Arlequin Program. The AmpFISTR®SEfiler™ has a combined power of discrimination greater than 0,999999999999999 and a cumulative power of exclusion greater than 0,99999 in the population of northern Poland.

The comparison of our data for the SE33 locus with Hungarian and northern Portugal populations revealed no significant differences ($p=0,19$ and $p=0,61$ respectively).

This paper showed that this commercial kit is useful for personal identification and paternity testing.

Adres: dr n. med. Joanna Wysocka
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AMG
ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk
e-mail: wysocka@amg.gda.pl