

Ewa Kapińska, Zofia Szczerkowska

Ustalenie tożsamości nieznannej osoby w oparciu o określenie profilu DNA z ekshumowanych szczątków ludzkich

Personal identification of an unknown individual based on determination of his DNA profile from exhumed remains

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik Katedry dr hab. med. Zbigniew Jankowski

Celem pracy było ustalenie tożsamości nieznanego mężczyzny, którego szczątki ekshumowano po 4 latach od pochówku. Do badań genetycznych zabezpieczono kość udową denata a materiał porównawczy stanowiły wymazy z jamy ustnej pobrane od jego domniemanych krewnych – żony, syna i brata. DNA z kości wyizolowano dwiema metodami: metodą fenolowo-chloroformową oraz alternatywnie, zmodyfikowaną techniką opisaną przez T. Kalmára i wsp. Porównano uzyskane wyniki. Materiał genetyczny amplifikowano przy użyciu komercyjnego zestawu AmpF/STR®SEfiler™. Pełny profil genetyczny zmarłego mężczyzny uzyskano przy wykorzystaniu DNA izolowanego obu technikami, jednak metoda zaproponowana przez Kalmara w porównaniu do metody fenolowo-chloroformowej umożliwiła szybsze i prostsze pozyskanie materiału genetycznego. Zastosowana analiza statystyczna potwierdziła ojcostwo denata w stosunku do badanego dziecka ($P=99,999999\%$) a także pokrewieństwo z domniemanym bratem ($P=99,9999\%$).

The aim of the present investigation was personal identification of an unknown man whose remains were exhumed four years after burial. The femur of the deceased was secured for the genetic analysis. The comparative material included buccal swabs collected from the putative relatives of the deceased, i.e. the wife, son and brother. Genomic DNA was extracted from the bone using two methods: traditional isolation with phenol/chloroform and as a alternative technique, a simple and rapid method described by T. Kalmár et al. The results were then compared. The specimens underwent DNA amplification using the AmpFISTR®SEfiler™ PCR Amplification Kit. The authors obtained a full STR profile of the unknown man from

each isolate, yet the DNA extraction method proposed by T. Kalmár et al. allowed for simpler and faster isolation of genetic material. The statistical analysis of the obtained results confirmed the paternity of the deceased and established his son as his rightful child ($P=99,999999\%$), also confirming the consanguinity between the investigated individual and his putative brother ($P=99,9999\%$).

Słowa kluczowe: kość udowa, ekshumacja, izolacja DNA, ustalenie tożsamości
Key words: femur, exhumation, DNA extraction, personal identification

WSTĘP

Identyfikacja genetyczna osób o nieznannej tożsamości to jedno z podstawowych badań wykonywanych w laboratoriach genetycznych Zakładów Medycyny Sądowej. Często, ujawnione w różnych okolicznościach i miejscach zwłoki ludzkie, podlegają tak głębokim zmianom (rozkładowi, rozfragmentowaniu, zwęgleniu lub zeszkieletowieniu), że wizualna identyfikacja ciała przez najbliższą rodzinę zmarłego nie jest możliwa. W tej sytuacji, jedynym sposobem na ustalenie danych osobowych denata staje się analiza genetyczna obejmująca określenie profilu DNA nieznannej osoby i porównanie go z profilami genetycznymi jego domniemanych krewnych.

W przedstawianej przez nas sprawie zwłoki NN mężczyzny ujawnione zostały w czerwcu 2001 roku. Znajdowały się one w stanie zaawansowanego rozkładu, z częściowo zwęglonymi powłokami ciała wskutek

działania ognia. Po przeprowadzeniu sekcji zwłok i wobec braku jakichkolwiek danych, co do tożsamości denata, ciało zmarłego pochowano na cmentarzu komunalnym. Po kilku latach, do Prokuratury zgłosiły się osoby twierdzące, że NN mężczyzna może być ich krewnym. W celu potwierdzenia tożsamości zmarłego, po 4 latach od ujawnienia zwłok, przeprowadzono ekshumację jego szczątków. Do badań zabezpieczono kość udową denata a materiał porównawczy stanowiły wymazy z jamy ustnej pobrane od jego domniemanych krewnych – brata, żony i syna.

MATERIAŁ I METODY

Fragment kości udowej denata dokładnie oczyszczono i zmielono. Część uzyskanego proszku kostnego poddano na wstępie procesowi odwapniania (0,5M EDTA) [1] a drugą, równoważną ilość, trawiono bezpośrednio. DNA z kości NN mężczyzny izolowano dwiema metodami: metodą klasyczną fenolowo-chloroformową [2] oraz prostą metodą ekstrakcji opisaną przez T. Kalmára i wsp. [3], wprowadzając do niej drobne modyfikacje. W metodzie tej, 1,2-1,5 g sproszkowanej kości umieszczono w 2 ml buforu lizującego (0,1 M EDTA, 0,5% N-laurylsarcosina-Na) zawierającego 4 mg Proteiny K i 3 dni trawiono w temp. 52°C. Każdego dnia inkubacji bufor lizujący uzupełniano kolejną porcją Proteiny K. Po trawieniu, próbkę odwirowano w temp. pokojowej przy 12 tys. obr./min. przez 10 min. i zebrano supernatant. Dodano do niego 1µg/µl Dextranu Blue (steż. końc. 4µg/µl), równoważną supernatantowi obj. 4 M octanu amonowego oraz 2-krotnie większą objętość 96% etanolu. Całość dokładnie zworteksowano i umieszczono w temp. -75°C na 7-10 min. Po precypitacji DNA odwirowano

przy 14 tys. obr./min. przez 15 min. w 4°C, osad zawieszono w 50 µl buforu TE pH 8 i inkubowano w temperaturze 65°C przez noc.

Stężenie DNA uzyskanego z kości określono fluorometrycznie z wykorzystaniem zestawu Pico Green® ds DNA Quantitation Kit [4].

DNA z materiału porównawczego wyizolowano przy użyciu zestawu do izolacji DNA ze śladów biologicznych Sherlock AX firmy A&A Biotechnology, a jego stężenie określono metodą spektrofotometryczną.

Uzyskany materiał genetyczny poddano kompleksowej amplifikacji z zastosowaniem komercyjnego zestawu AmpF/STR®SEfiler™ (Applied Biosystems) [5]. Do reakcji PCR użyto 1-5 µg DNA wyizolowanego z kości, który amplifikowano w objętości 10 µl mieszaniny reakcyjnej, przy 32 cyklach. Warunki temperatury ww. reakcji były zgodne z zaleceniami producenta. Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler-Gradient (Eppendorf). Produkty PCR rozdzielono metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze 3130 firmy Applied Biosystems. Uzyskane wyniki poddano analizie przy użyciu programu GeneMapper® ID Software [5].

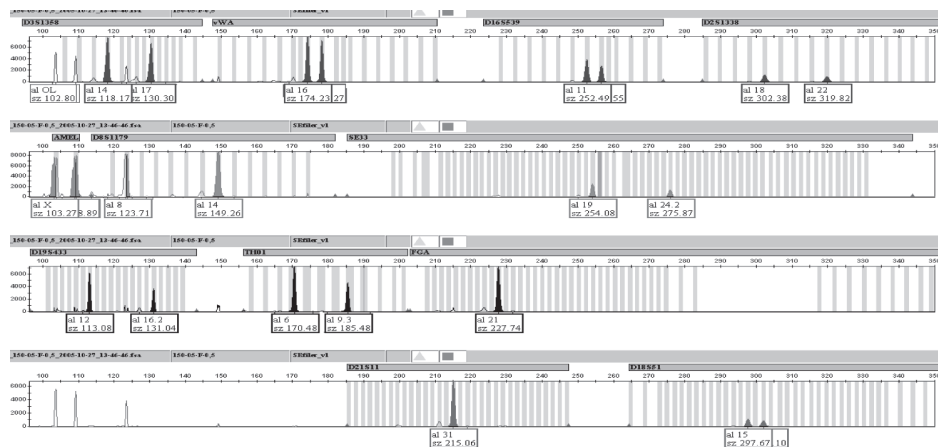
WYNIKI

Z DNA wyizolowanego z ekshumowanych szczątków kostnych określono pełny profil genetyczny zmarłego mężczyzny.

W przypadku stosowania ekstrakcji fenolowo-chloroformowej pełny profil DNA (12 markerów STR) określono z kości nie poddanej przed trawieniem procesowi odwapniania, ryc.1A. W wyniku amplifikacji DNA z kości odwapnianej, nie uzyskano pozytywnego sygnału PCR dla fragmentów powyżej 250 pz. i nie określono genotypów 3 STR loci: D2S1338, SE33 i D18S51 – ryc.1B.

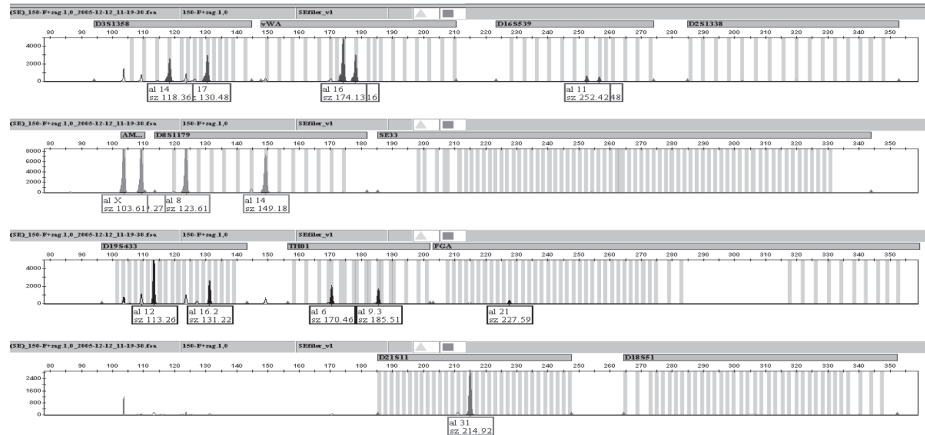
Ryc. 1A. Profil DNA izolowanego metodą fenol-chloroform z kości nieodwapnianej.

Fig. 1A. Profile of DNA extracted from a non-decalcified bone using the phenol-chloroform method.



Ryc. 1B. Profil DNA izolowanego metodą fenol-chloroform z kości odwapnianej.

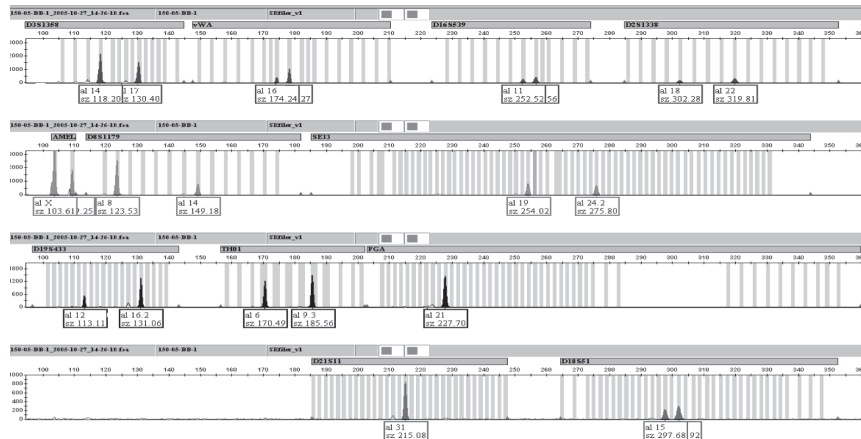
Fig. 1B. Profile of DNA extracted from a decalcified bone using the phenol-chloroform method.



W przypadku zastosowania do badania metody izolacji DNA opisanej przez T. Kalmára, pełną analizę wszystkich loci występujących w zestawie AmpF/STR®SEfiler™ uzyskano po amplifikacji DNA ekstrahowanego zarówno z kości odwapnianej jak i nieodwapnianej, ryc.2 A i B.

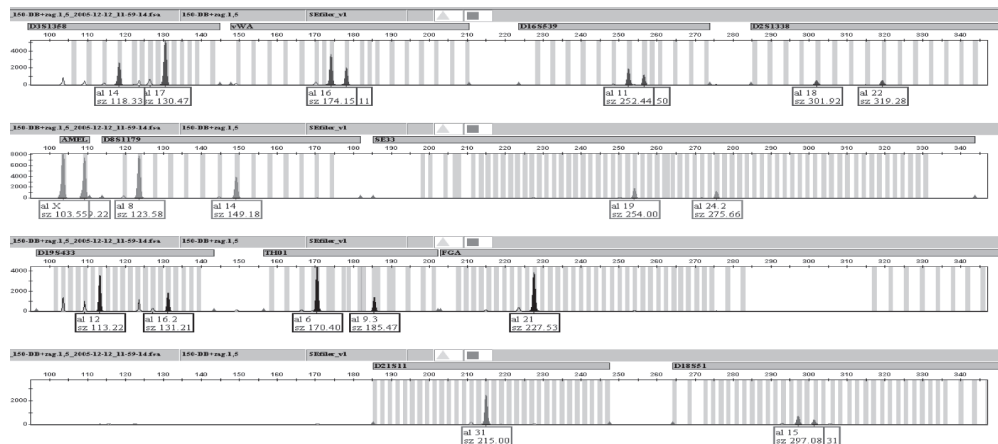
Ryc. 2A. Profil DNA izolowanego metodą T. Kalmára z kości nieodwapnianej.

Fig. 2A. Profile of DNA extracted from a non-decalcified bone using the T. Kalmár's method.



Ryc. 2B. Profil DNA izolowanego metodą T. Kalmára z kości odwapnianej.

Fig. 2B. Profile of DNA extracted from a decalcified bone using the T. Kalmár's method.



Genotypy wszystkich osób badanych w sprawie przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Profile genetyczne badanych osób.
Table I. Genetic profiles of the examined individuals.

Locus	NN mężczyzna kość udowa	syn NN-a	żona NN – a	brat NN-a
D3S1358	14/17	15/17	15/16	14/17
VWA	16/17	16/17	16/17	16/17
D16S539	11/12	11/12	11/11	11/12
D2S1338	18/22	13/18	13/23	18/22
AMGXY	XY	XY	XX	XY
D8S1179	8/14	8/13	13/14	8/14
SE33	19/24,2	24,2/28,2	24,2/28,2	19/28,2
D19S433	12/16,2	15,2/16,2	15/15,2	12/16,2
TH01	6/9,3	6/8	8/9	9,3/9,3
FGA	21/21	21/22	22/23	25/25
D21S11	31/31	28/31	28/29	29/33,2
D18S51	15/16	16/18	16/18	14/16

Wydajność zastosowanych metod była różna. W przypadku kości nieodwapnianych więcej DNA uzyskano przy zastosowaniu metody klasycznej. Różnic takich nie zaobserwowano w ilości DNA izolowanego z kości poddanych procesowi odwapniania. Wydajność izolacji w obu metodach była porównywalna.

Analiza polimorfizmu DNA badanych osób pozwoliła na ustalenie tożsamości zmarłego mężczyzny. Badania statystyczne (DNA VIEW 27,17) potwierdziły, że denat jest ojcem badanego dziecka ($P=99,999999\%$) i wykazały również jego wysokie pokrewieństwo z domniemanym bratem ($P=99,9999\%$).

DYSKUSJA

Wybór odpowiedniej metody izolacji jądrowego DNA jest bardzo ważnym elementem każdej analizy genetycznej, warunkującym powodzenie w dalszym etapie badań. Ma to szczególne znaczenie w przypad-

kach konieczności określenia profili DNA w oparciu o materiał biologiczny pobrany z ekshumowanych zwłok. W tych sprawach kości są często jedynym dostępnym do badań nośnikiem informacji genetycznej [6].

Kości, to szczególny rodzaj materiału biologicznego. Struktura tej tkanki twardej chroni materiał genetyczny przed działaniem czynników zewnętrznych i proces jego degradacji przebiega wolniej [7]. Zmniejszająca się w tym materiale biologicznym liczba kopii wysokocząsteczkowego DNA, wpływa na ilość i jakość izolowanego materiału genetycznego. Wstępna obróbka kości, odwapnianie i proces izolacji, obejmująca wiele pośrednich etapów powodują dodatkowe rozrywanie łańcucha DNA i utratę jego fragmentów [8]. Zmiany te, jak i obecność w ekstrakcie zanieczyszczeń organicznych mają wpływ na przebieg reakcji łańcuchowej polimerazy. W wyniku amplifikacji otrzymujemy tylko częściowy profil badanego DNA lub obserwujemy całkowity brak sygnału reakcji PCR – wynik negatywny [9, 10].

W pracy do ustalenia tożsamości mężczyzny, którego szczątki ekshumowano po czterech latach od pochówku, wykorzystano kość udową zmarłego, z której DNA izolowano dwiema metodami: klasyczną fenolowo-chloroformową i zmodyfikowaną techniką opisaną przez T.Kalmára i wsp.

Ekstrakcja metodą klasyczną obejmuje wiele dynamicznych i restrykcyjnych etapów, które mogą mieć wpływ na jakość wyizolowanego DNA a później proces jego amplifikacji.

W drugiej z metod wykorzystanej w niniejszej pracy a przedstawionej przez T. Kalmára występuje niewiele faz oczyszczania kwasów nukleinowych. Wprowadzone przez nas modyfikacje dotyczące głównie etapu trawienia kości (zwiększenie ilości inkubowanego proszku kostnego i proteiny K, podwyższenie temperatury oraz wydłużenie czasu trawienia próby) przyczyniły się do uzyskania pozytywnych rezultatów. Stosowany w tej technice Dextran Blue ułatwia precypitację nawet niewielkiej ilości DNA i ogranicza ilość inhibitorów reakcji PCR obecnych w ekstrakcie.

W bieżącej praktyce laboratoryjnej, w badaniach dotyczących analizy genetycznej szczątków kostnych, rutynowo stosowane są dwie różne, niezależne izolacje DNA. Uzyskanie powtarzalnych i identycznych wyników amplifikacji DNA z obu metod, pozwala na prawidłowe określenie profili genetycznych nieznanymi osobami [10]. Naszym zdaniem, zaproponowana przez T. Kalmára i wsp. prosta i szybka metoda izolacji DNA, eliminująca również stosowanie toksycznych odczynników organicznych, może być wykorzystywana jako alternatywna/dodatkowa lub kontrolna metoda ekstrakcji DNA z kości.

PÍSMIENICTWO

1. Latham K. & Ritke M.: Bone DNA Purification Protocols for Genetic Analysis. University of Indianapolis Archeology & Forensics Laboratory, 2002.

2. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

3. Kalmár T., Bachrati Z. C., Marcsik A., Raskó I.: A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no12, pp.e 67.

4. Molecular Probes, Inc.: PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent and Kits, 2003.

5. Applied Biosystems: User's Manual, AmpF/STR® SEfiler™ PCR Amplification Kit. 2001, 2002.

6. Iwamura E. S. M., Soares-Vieira J. A., Muñoz D. R.: Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 2004, vol. 59 (6), 383-388.

7. Wurmb-Schwark N., Harbeck M., Wiesbrock U., Schroeder I., Ritz-Timme S., Oehmichen M.: Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial

DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal Medicine*, 2003, vol. 5, S169-S172.

8. Schmerer W. M., Hummel S., Hermann B.: Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target, *Electrophoresis*, 1999, vol. 20, pp. 1712-1716.

9. Primorac D.: The role of DNA technology in identification of skeletal remains discovered in mass graves. *Forensic Science International*, 2004, 146S, S163-S164.

10. Promega Corporation: Alonso A., et al., DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Feature Article Introduction Profiles in DNA July 2001*, pp. 3-8.

Adres:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Akademii Medycznej w Gdańsku

ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk

prof. dr hab. Zofia Szczerkowska

– szczferko@amg.gda.pl

mgr Ewa Kapińska – kapiniaczek@wp.pl