

Monica Abreu-Głowacka¹, Małgorzata Koralewska-Kordel¹, Eliza Michalak¹, Czesław Żaba¹, Zygmunt Przybylski²

Zastosowanie Y-SNPs w genetyce sądowej

Application of Y-SNPs in forensic genetics

¹ Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
p.o. Kierownik: dr n. med. C. Żaba

² Z Wyższej Szkoły Pedagogiki i Administracji w Poznaniu

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki uzyskane metodą LightSNiP z zastosowaniem 2 SNPs znajdujących się na chromosomie Y przy badaniu mieszanin materiału genetycznego w postaci krwi mężczyzny i kobiety w różnych rozcieńczeniach. Wielkość markerów STR-PCR dostępnych na rynku znajduje się między 100 a 500 pz co może ograniczyć analizę takich mieszanin DNA, gdzie ilość męskiego DNA jest stosunkowo mała lub materiał genetyczny do badań jest zdegradowany. Dobór odpowiednich SNPs, w tym przypadku na chromosomie Y, może dostarczyć informacji ułatwiającej interpretację mieszanin DNA kobiety i mężczyzny. Analizę przeprowadzono przy pomocy LightCycler® 2.0, firmy Roche® Diagnostics.

The study presents the results obtained by LightSNiP method with the use of 2 SNPs located on Y chromosome. The purpose of this study was examination of the mixture of the genetic material in the form of male and female blood in different dilutions. The size of available STR-PCR markers is between 100 and 500 bp, which can limit the possibility of DNA mixture analysis, where the amount of male DNA is relatively low or the genetic material is markedly degraded. Selection of appropriate SNPs placed on Y chromosome can provide information that will facilitate interpretation of the female and male DNA mixture. The test was performed on a Light Cycler 2.0, Roche Diagnostic.

Słowa kluczowe:

Y-SNPs, mieszaniny DNA,
PCR w czasie rzeczywistym,
marker amelogeniny, temperatura topnienia

Key words:

Y-SNPs, mixtures of DNA, real-time PCR, amelogenin marker, melting temperature

WSTĘP

Przyszłość badań genetycznych w medycynie sądowej jest ściśle związana z Polimorfizmem Pojedynczego Locus (SNP), który polega na zmianie punktowej w sekwencji DNA. Zwany jest też mutacją w wyniku tranzycji lub transwersji [1, 2].

W genomie człowieka liczba SNPs jest ogromna, mająca istotne znaczenie w badaniach populacyjnych oraz w diagnostyce medycznej w kierunku badania chorób genetycznych [3]. Najważniejszą zaletą SNPs jest możliwość uzyskania produktu reakcji PCR mniejszego niż 100 pz, co ma ogromne znaczenie przy analizie zdegradowanego DNA. Badając jeden SNP uzyskujemy maksymalnie dwa allele [1, 3]. Siła dyskryminacji w stosunku do badań systemem STR jest niska. Do porównywalnej analizy 13 *loci* STR jest potrzebna analiza 25 do 45 *loci* SNP [1, 4].

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym charakteryzuje się tym, że amplifikacja oraz detekcja amplifikowanego produktu, przeprowadzone są równocześnie w tej samej probówce co ogranicza ryzyko zanieczyszczenia. Inną ważną zaletą tej metody jest możliwość ilościowej analizy produktów amplifikacji uzyskanych w każdym cyklu reakcji łańcuchowej polimerazy poprzez detekcję fluorescencji. Emisja fluorescencji uzyskana w reakcji jest proporcjonalna do ilości amplifikowanego DNA [1, 5, 6, 7, 8].

W reakcji PCR w czasie rzeczywistym stosuje się różne systemy detekcji sygnału fluorescencyjnego. Są to związki fluorescencyjne (fluorochromy), które znacznie podwyższają poziom emisji fluorescencji. Między nimi znajduje się SYBR Green I oraz sondy specyficzne znakowane fluorochromami, do których zaliczyć należy sondy molekularne Beacons, TaqMan i typu Scorpions [1, 7, 8, 9, 10, 11].

Analiza markerów SNPs w genetyce sądowej na chromosomie Y dostarcza ważnej informacji genetycznej, w sytuacjach kiedy badamy DNA w stanie degradacji lub analizujemy mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny, w której ilość DNA kobiety jest dużo większa od ilości DNA mężczyzny.

Interpretacja wyników uzyskanych przy badaniu Y-SNPs jest bardzo łatwa, ponieważ uzyskujemy tylko jeden allel [12].

Obecnie wyboru SNPs na chromosomie Y można dokonać poprzez wgląd na strony internetowe, które zawierają szeroką oraz dokładną bazę SNPs w zależności od zastosowanej metody laboratoryjnej: www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/, www.snp.cshl.org, www.ensembl.org/.

CEL PRACY

Analiza oceny przydatności metody LightSNiP oraz wybranych Y-SNPs w badaniu śladów biologi-

cznych w postaci mieszanin krwi mężczyzny i kobiety w różnych rozcieńczeniach oraz porównanie z wynikami analiz uzyskanych metodą STR-PCR.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła mieszanina DNA mężczyzny i kobiety w postaci plam krwi, w porcjach 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 oraz 1:50.

Metoda kolumnkowa pozwoliła na izolację DNA z plam krwawych. Zastosowano w tym celu kit Sherlock AX, firmy A&A Biotechnology. Uzyskany DNA został oczyszczony oraz zagęszczony przy pomocy kolumnek filtracyjnych Amicon Ultra 30k Montage® PCR Centrifugal Filter Devices, firmy Millipore. Pomiar stężenia uzyskanego DNA wykonano przy pomocy spektrofotometru Nanodrop wersja ND-1000 V3.1.0, Firmy NanoDrop Technologies, Inc, USA.

Badania przeprowadzono przy pomocy techniki real-time PCR, która pozwala na szybką interpretację wyników. Test LightSNiP zawiera primery, wybrane Y-SNPs oraz sondy molekularne typu SimpleProbe®. Działanie tych sond opiera się na reakcji FRET (ang. *Fluorescent Resonant Energy Transfer*) – procesie transferu energii fluorescencji z jednego fluorochromu do drugiego. Testy LightSNiP zamówiono w firmie TIB®Molbiol, Niemcy.

Tabela 1. Przedstawia zastosowane Y-SNPs, gen na którym się znajdują, lokalizację chromosomalną, zmianę nukleotydową oraz wielkość analizowanego amplikonu.

Table 1. Information about the Y-SNPs, name of the gene, location at the chromosome, nucleotide polymorphism and amplicon size.

SNP	Gen Gene	Lokalizacja chromosomalna Chromosomal location	Allel Allele	Długość produktu PCR PCR product length	Referencje References
rs3900	CYorf15A	Yq11.222	C/G	91 bp	Skaletsky et al. (2003)
rs11553055	ASMTL	Yp11.32	G/A	101 bp	K. Ried et al. (1998)

Skład mieszaniny reakcyjnej:

- 1 μ l H₂O do PCR
- 0,5 μ l Reagent Mix - rs3900 lub rs11553055
- 1 μ l FastStart DNA Master (firmy Roche® Diagnostics)
- 0,8 μ l MgCl₂ (25mM)
- 7,7 μ l DNA

Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy użyciu aparatu LightCycler® 2.0 firmy Roche® Diagnostics na ścieżce fluorescencyjnej 530 w następujących warunkach:

- denaturacja – 95°C przez 10 min – 1 cykl
- amplifikacja – 95°C przez 10 s, 60°C przez 10 s (Single), 72°C przez 15 s. – 45 cykli
- topnienie – 95°C przez 20 s, 40°C przez 20°C, 85°C przez 0 s (0,2°C/s-continuous) – 1 cykl
- chłodzenie – 40°C przez 30 s.

Analizę temperatur oraz krzywych topnienia przeprowadzono za pomocą programu wersji 4.05 firmy Roche® Diagnostics.

Próby poddano reakcji PCR systemem PowerPlex® ESX 17, firmy Promega. Elektroforezę kapilarną przeprowadzono w analizatorze genetycznym ABI PRISM 310, firmy Applied Biosystems. Wyniki zostały podane analizie przy pomocy programu GeneMapper® ID wersja 3.2, firmy Applied Biosystems.

WYNIKI

Metoda LightSNiP pozwala na badania Polimorfizmu Pojedynczego Locus co skłoniło autorów do sprawdzenia jej przydatności w badaniach genetyczno-sądowych.

Uzyskano produkt amplifikacji dla przygotowanych mieszanin DNA mężczyzny i kobiety we wszystkich badanych proporcjach 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 i 1:50 metodą LightSNiP oraz Y-SNP rs11553055.

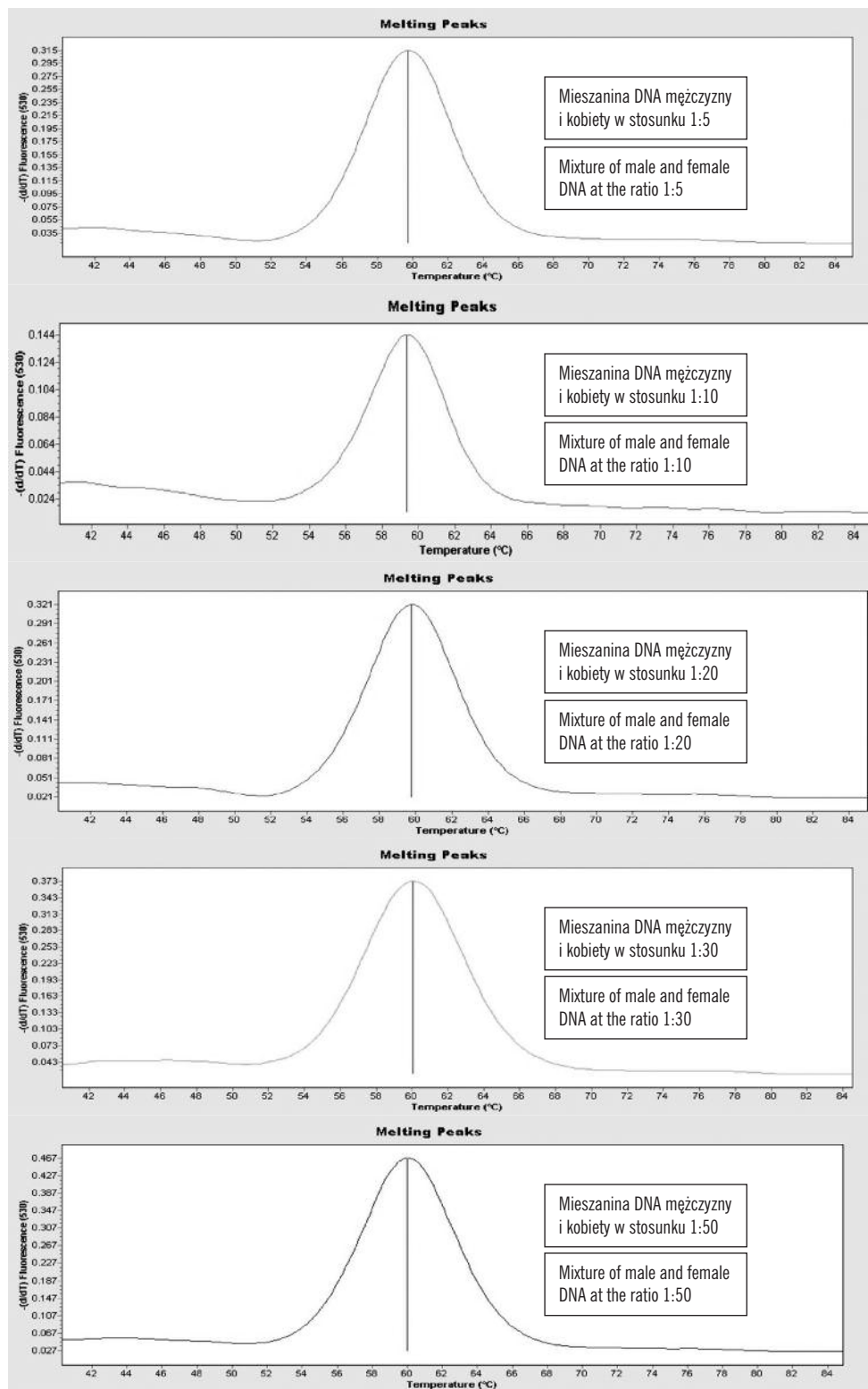
Uzyskano produkt amplifikacji dla przygotowanych mieszanin DNA mężczyzny i kobiety w badanych proporcjach 1:5, 1:10, 1:20 i 1:30 metodą LightSNiP oraz Y-SNP rs3900.

Temperatura topnienia przy analizie metodą LightSNiP oraz Y-SNP rs11553055 przy badaniu przygotowanych mieszanin DNA mężczyzny i kobiety wyniosła ~ 59,00°C.

Temperatura topnienia przy analizie metodą LightSNiP oraz Y-SNP rs3900 przy badaniu przygotowanych mieszanin DNA mężczyzny i kobiety wyniosła ~ 58,00°C.

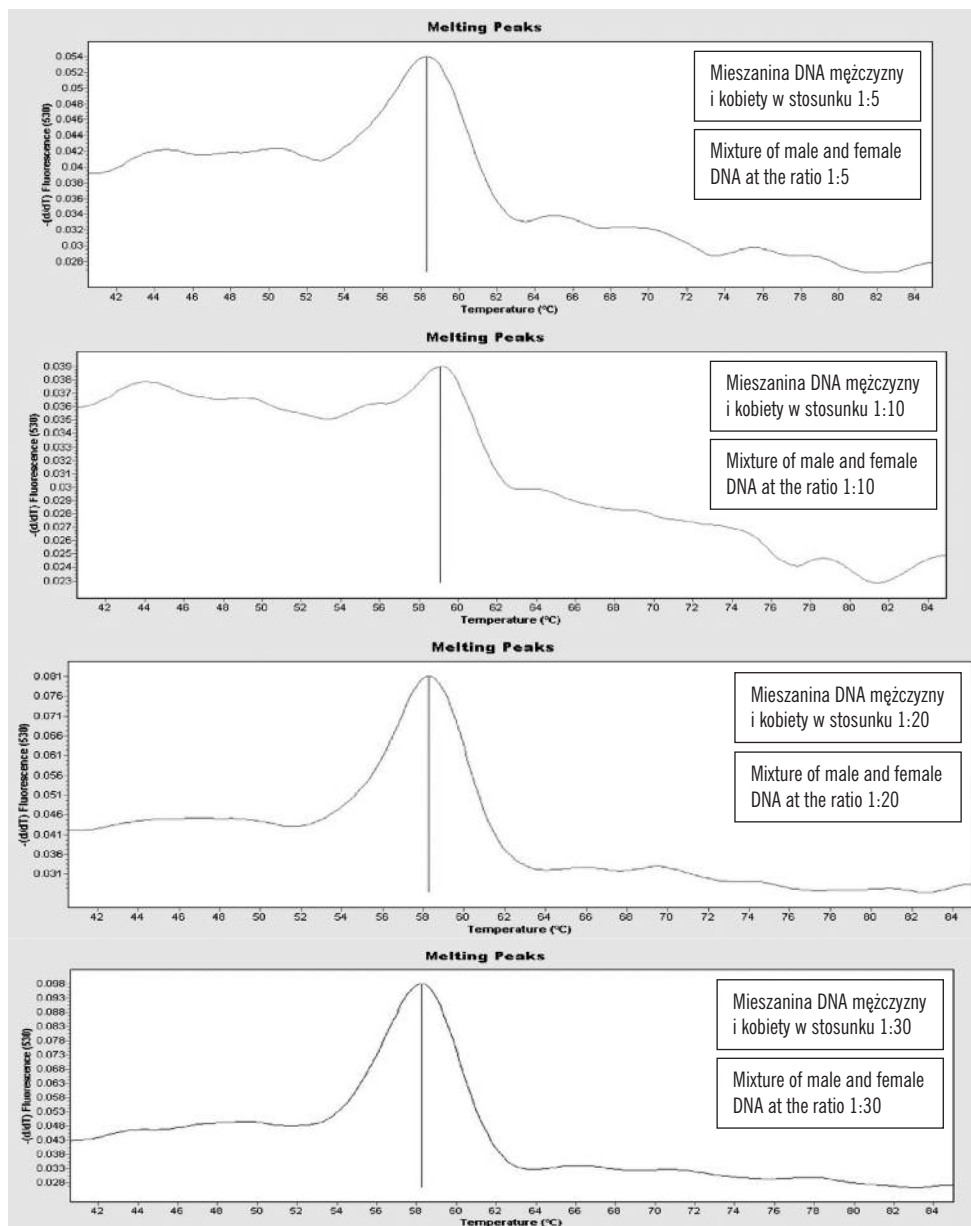
Uzyskane temperatury topnienia są zgodne z oczekiwanymi przy zastosowaniu badanych Y-SNPs (protokół metody LightSNiP, firmy TIB®-Molbiol, Niemcy).

Zestawem PowerPlex®ESX17 zbadano mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety tylko w proporcjach 1:30 i 1:50.



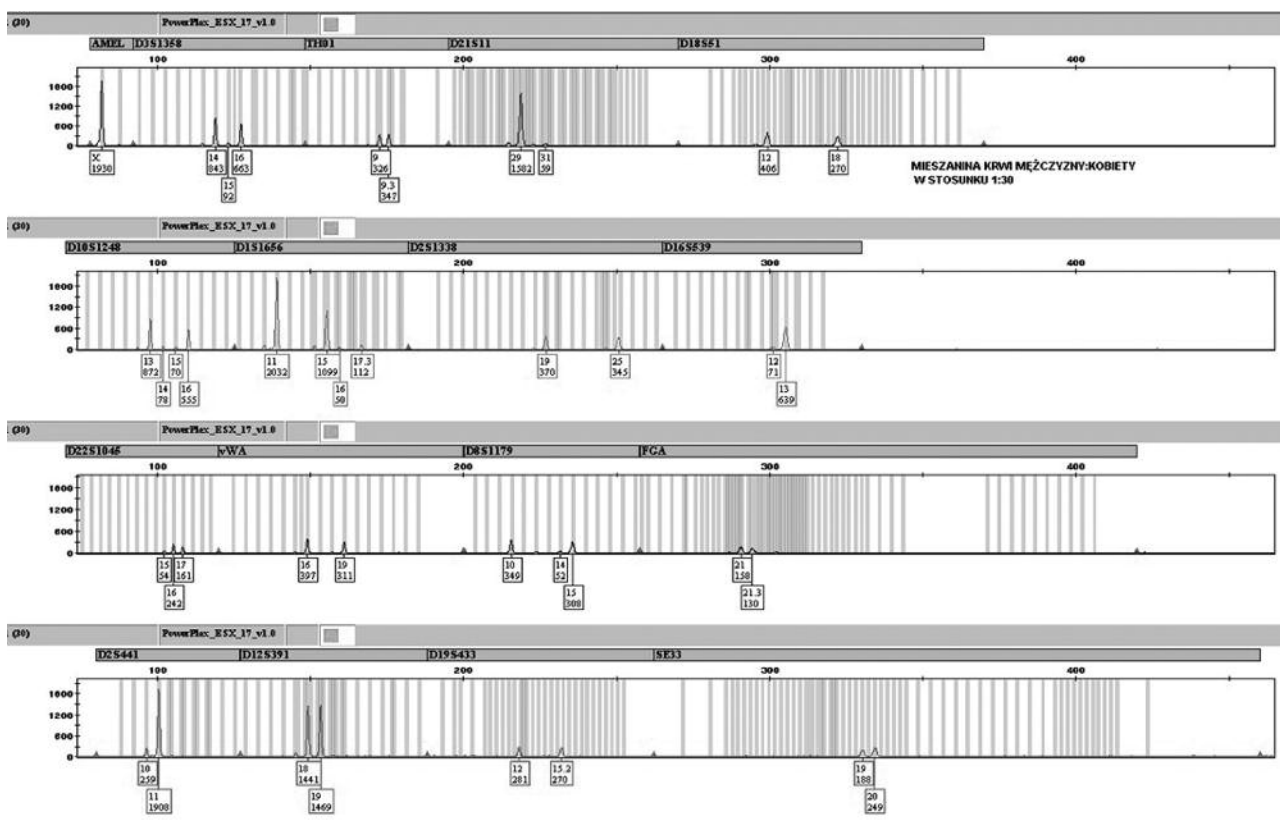
Ryc. 1. Przedstawia temperatury topnienia uzyskane z zastosowaniem metody LightSNiP-rs11553055 przy badaniu mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w różnych rozcieńczeniach.

Fig. 1. The melting curves obtained with LightSNiP-rs 11553055 shown for comparison of various dilutions of male and female DNA.



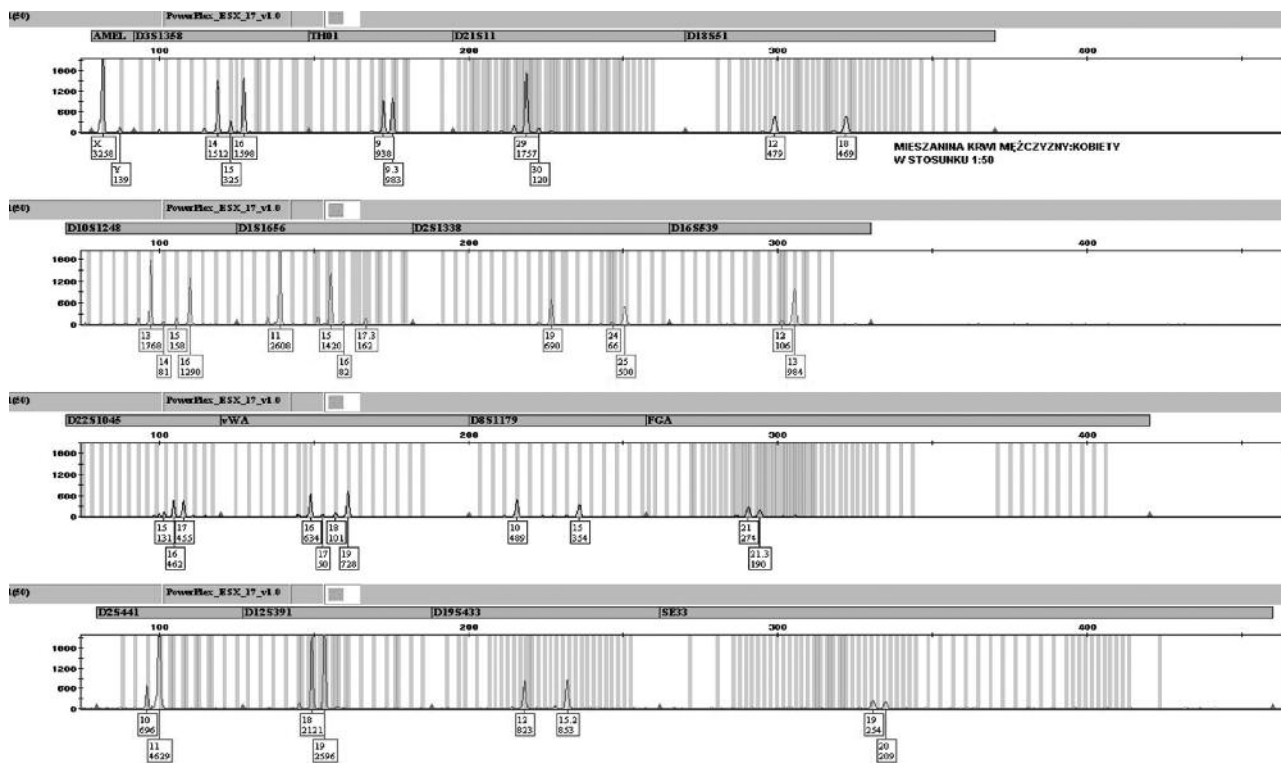
Ryc. 2. Przedstawia temperatury topnienia uzyskane z zastosowaniem metody LightSNiP-rs3900 przy badaniu mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w różnych rozcieńczeniach.

Fig. 2. The melting curves obtained with LightSNiP-rs 3900 shown for comparison of various dilutions of female and male DNA.



Ryc. 3. Przedstawia elektroforegram uzyskany przy badaniu mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:30 przy zastosowaniu zestawu STR-PCR PowerPlex®ESX17.

Fig. 3. Electroforegram obtained during the test of male and female DNA mixture in the ratio of 1:30, using STR-PCR PowerPlex®ESX17 set.



Ryc. 4. Przedstawia elektroforegram uzyskany przy badaniu mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:50 przy zastosowaniu zestawu STR-PCR PowerPlex®ESX17.

Fig. 4. Electroforegram obtained during the test of male and female DNA mixture in the ratio of 1:30, using STR-PCR PowerPlex®ESX17 set.

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki nie wykazują obecności artefaktów (stutters), co ma duże znaczenie w analizie mieszanin DNA. Badania przeprowadzone są w pełni zautomatyzowaną metodą, co skraca czas badania oraz pracy laboratoryjnej.

W wyniku przeprowadzonych badań metodą STR-PCR przy zastosowaniu systemu Power Plex® ESX17 uzyskano mieszaninę DNA mężczyzny i kobiety w przygotowanych proporcjach 1:30 i 1:50. Taki obraz często uzyskujemy w sprawach dotyczących przemoc seksualnej opracowywanych w Pracowni Hemogenetycznej w ZMS w Poznaniu, w których trudno jest jednoznacznie stwierdzić obecność allelu Y w markerze amelogeniny. Powstaje wtedy problem identyfikacyjny, przede wszystkim w sytuacji, kiedy do analizy nie mamy materiału porównawczego podejrzanego w sprawie.

W przypadku zilustrowanym wynikami na ryc. 3 uzyskano mieszaninę DNA dwóch osób – mężczyzny i kobiety, lecz nie stwierdzono obecności allelu Y w markerze amelogeniny. Potwierdzenie obecności DNA mężczyzny w tej mieszaninie inną metodą może okazać się istotne.

Metodą LightSNiP oraz wybranymi do niej Y-SNPs wykryto obecność DNA mężczyzny w przygotowanych mieszaninach DNA mężczyzny i kobiety w pro-

porcjach 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 i 1:50, co ułatwiło interpretację wyników uzyskanych przy badaniu przygotowanych mieszanin DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:30 i 1:50 systemem STR-PCR. Niemniej jednak zastosowanie markerów na chromosomie Y metodą STR-PCR może znacznie zwiększyć poziom oznaczalności niezdegradowanego materiału genetycznego mężczyzny w mieszaninie DNA w porównaniu z metodą LightSNiP. Badania przeprowadzone w tym kierunku wskazują na możliwość uzyskania pełnego profilu genetycznego mężczyzny w mieszaninach DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:1000 i 1:2000 [13].

WNIOSKI

Uzyskane wyniki z zastosowaniem metody LightSNiP oraz Y-SNPs rs11553055 i rs3900 wskazują na obecność allelu Y w badanych mieszaninach DNA mężczyzny i kobiety.

Wielkość (pz) zastosowanych Y-SNPs gra ważną rolę w analizie mieszanin DNA kobiety i mężczyzny. Wybór amplikonu o wielkości poniżej 100 pz może mieć potencjalne znaczenie w trudnej do interpretacji mieszaninie DNA uzyskanej w badaniach systemem STR-PCR, gdzie ilość materiału genetycznego kobiety jest 50 razy większa od męskiego.

PIŚMIENICTWO

1. Carracedo A.: Forensic DNA Typing Protocols. Methods in Molecular Biology™. Human Press. Totowa, New Jersey, USA. 2005, 297: 1064-3745.

2. Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J.: Baza 500 alleli SNP w populacji centralnej Polski. Arch. Med. Sąd. Kryminol. 2008, LVIII: 27-31.

3. Butler J. M.: Forensic DNA Typing. Biology & Technology behind STR Markers, Academic Press. London, UK. 2001.

4. Chakraborty R., Stivers D., Su B., Zhong Y., Budowle B.: The utility of short tandem repeat loci beyond human identification. Implications for development of new DNA typing systems. Electrophoresis. 1999, 20: 1682-1696.

5. Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym: Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. Biotechnologia. 2008, 1(80): 71-85.

6. Mackay I. M., Arden K. E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. Nucl. Acids Res. 2002, 30: 1292-1305.

7. Ginzinger D. G.: Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. Exp. Hematol. 2002, 30: 503-512.

8. Bubner B., Baldwin I. T.: Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. Plant Cell Rep. 2004, 23: 263-271.

9. Mackay I. M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Mikrobiol. Infect. 2004, 10: 90-212.

10. Wong M. L., Medrano J. F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.*, 2005, 39: 75-85.
11. Mikula M., Dzwonek A., Jagusztyn-Krynicka K., Ostrowski J.: Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real-time PCR. *Mikrobiol. Methods.* 2003, 55: 351-359.
12. Butler J. M.: Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Science Review.* 2003, Volume Fifteen Number Two, July.
13. Mulero J. J., Chang C. W., Calandro L. M., Green R. L., Li Y., Johnson C. L., Hennessy L. K.: Development and Validation of the AmpF ϵ STR[®] Yfiler[™] PCR Amplification Kit: A ale Specific, Single Amplification 17 Y-STR Multiplex System. *Journal Forensic Science.* 2006, 51(1): 64-75.

Adres do korespondencji:
Monica Abreu-Głowacka
ul. Świącickiego 6
60-781 Poznań
tel.: +48 618546416
e-mail: makoncia@poczta.onet.pl