

Anna Skowron

Molekularne podstawy oznaczania klasycznego układu grupowego krwi – ABO

Molecular basis of typing of the classical ABO group system

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

W pracy przedstawiono postęp nauki w oznaczaniu grup krwi w klasycznym zakresie ABO. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie podstaw teoretycznych oraz technik badawczych oznaczania tego klasycznego układu czerwonokrwinkowego na poziomie molekularnym, co może stanowić pierwszy etap wprowadzenia tego układu do badań identyfikacyjnych jako uzupełnienie zakresu badawczego z zastosowaniem reakcji PCR. W pracy zawarto przegląd metod molekularnych oznaczania grup w tym zakresie, przedstawiono plusy i minusy tych metod, a także wykazano ich przewagę nad klasycznymi metodami serologicznymi.

Elucidation of the molecular basis for the classical ABO group system had given knowledge about the differences between ABO gene sequences and made it useful for determining ABO genotype for individuals and complementing PCR-based methods in forensic individualization. This paper presents some methods of determination of the ABO genotype, with their positive and negative aspects. Advantages of these methods over the classical serological methods are presented.

Słowa kluczowe: grupy krwi ABO, DNA, allele, technika PCR, genotypowanie

Key words: ABO blood group, DNA, alleles, PCR, genotyping

WSTĘP

Układ grupowy ABO był pierwszym spośród wykrytych układów grupowych krwi. Po nim odkryto jeszcze bardzo wiele układów grupowych erytrocytów. Pogrupowanie krwi w tym systemie opiera się na występowaniu na powierzchni błony komórkowej erytrocytów glikolipidów i glikoprotein (antygenów), a w surowicy krwi odpowiednich przeciwciał. Grupy krwi: A, B, AB, to wynik przekształcenia prekursora antygenów, substancji grupowej H, z udziałem

odpowiednich enzymów, w złożone antygeny grupowe. Substancje histo-krwinkowe H, A i B występują w większości tkanek ludzkiego organizmu, a ponadto mogą występować w substancjach zewnątrzwydzielniczych, jak ślina, nasienie, płyn nasienny, pot itp.

Wszystkie ludzkie erythrocyty posiadają w różnym stężeniu, zależnym od fenotypu ABO, substancję grupową H (lub jej przekształconą formę). Występuje ona w największej ilości i jednocześnie jako jedyna na erythrocytach grupy krwi O. Na powierzchni krwinek grupy A jest ona przekształcona do substancji A, a w przypadku krwinek grupy B, do substancji B. Analogicznie, w przypadku erythrocytów grupy AB, mamy do czynienia z występowaniem obydwu typów substancji grupowych: A i B, a w przypadku grupy O, jak wcześniej wspomniano, tylko z substancją H. Aktywność antygenów grupowych związana jest z determinantami, a nie z całymi cząsteczkami glikoproteinowymi lub glikolipidowymi. Tymi determinantami są reszty cukrowe, np. N-acetylo-D-galaktozamina (determinanta antygeny A) czy D-galaktoza (determinanta antygeny B).

Antygeny grupowe w większości przypadków rozwinięte są już w momencie urodzenia, nie zmieniają się w ciągu życia osobniczego i nie są zależne od środowiska zewnętrznego. Dlatego stanowią dogodny przedmiot badań w przypadku identyfikacji osobniczej.

Przez wiele lat układ ten wraz z innymi polimorficznie zróżnicowanymi antygenami czerwono-krwinkowymi, białkami surowicy oraz enzymami czerwono-krwinkowymi był użyteczny w analizach dochodzenia ojcostwa, a przy identyfikacji śladów biologicznych był jednym z wąskiego katalogu grup krwi wykrywanych metodami pośrednimi. Wprowadzenie do praktyki oznaczania układów DNA, w szczególności mikrosatelitarnego, poszerzyło znacznie możliwości identyfikacji osobniczej nawet niewielkiej ilości śladów krwawych i wydawało się, że oznaczanie układu ABO w tej sytuacji stanie się bezcelowe. Tymczasem z praktyki sądowo-lekarskiej wynika, że w pewnych sytuacjach układ ten, wobec powszechnej znajomości w społeczeństwie grup krwi właśnie w tym układzie, może pozwolić na rozstrzygnięcie wielu kwestii. Stosowane jednak do tej pory metody badania układu ABO wymagające dużej ilości materiału w porównaniu do ilości niezbędnej przy badaniu układów DNA oznaczanych metodami PCR były przeszkodą włączenia tego układu do analiz mikrosatelitarnych. Tymczasem układ może być oznaczany technikami DNA poprzez badanie obecności alleli umiejscowionych dla tego układu na chromosomie 9.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie podstaw teoretycznych oraz technik badawczych oznaczania układu ABO na poziomie molekularnym, co może stanowić pierwszy etap wprowadzenia tego układu do badań identyfikacyjnych jako uzupełnienie zakresu badawczego stosowanych coraz powszechniej reakcji multipleksowych PCR.

GENETYCZNE PODSTAWY POLIMORFIZMU LOCUS ABO

Geny odpowiedzialne za występowanie antygenów ABO nie kodują bezpośrednio glikoprotein lub glikolipidów. Umiejscowione są na chromosomie 9q34

a ich produktem są różne formy glikozylotransferazy, enzymu odpowiedzialnego za modyfikowanie substancji H do A i B. W ten sposób istnieją geny glikozylotransferazy A i B oraz geny charakterystyczne dla grupy O, które kodują nieaktywny produkt białkowy.

Molekularne klonowanie locus ABO nastąpiło po oczyszczeniu A-transferazy ($\alpha 1 \rightarrow 3$ N-acetylogalaktozaminylotransferazy) z ludzkiej tkanki płucnej i częściowym ustaleniu jej sekwencji aminokwasowej. Wraz z wprowadzeniem techniki PCR w 1985 roku a klonowania i sekwencjonowania locus ABO w 1990 roku, opublikowano wiele prac dotyczących nie tylko fenotypowego, ale również genotypowego oznaczania grup w systemie ABO z użyciem techniki PCR-reakcji łańcuchowej polimerazy. Porównanie alleli krwi ABO przeprowadzono na podstawie faktu, że allele te są konserwatywne pod względem bardzo nielicznych substytucji nukleotydowych i jednej delecji. Widoczna różnica rozróżniająca allel B od A dotyczy siedmiu nukleotydowych pozycji, co objawia się czterema aminokwasowymi substytucjami w domenie katalitycznej białka. Grupa krwi O nie jest uwarunkowana zespołem dwóch genów recesywnych aa lub bb, ale odrębnym genem zerowym. Jediną cechą odróżniającą allel O od A jest pojedyncza delecja w pozycji 261, co powoduje przesunięcie ramki odczytu i prowadzi do powstania nieaktywnej funkcjonalnie transferazy O, zbudowanej ze 117 aminokwasów. W białku tym brak większości domeny katalitycznej (2, 22, 24).

Antygen A nie jest jednolity, wykazuje zróżnicowanie na odmiany A_1 i A_2 . Gen transferazy A_2 różni się od A_1 pojedynczą substytucją w pozycji 467, co powoduje zamianę leucyny na prolinę w domenie katalitycznej enzymu i stratę pojedynczego aminokwasu na końcu C. Funkcjonalną ważność dwóch substytucji (między A i B) oraz delecji (charakterystycznej dla O) pokazano przez transfekcję DNA do komórek HeLa, po której zastosowano immunoreakcję antywęglowodorową (9).

Ciekawy jest fakt, że sklonowano również gen transferazy H i poznano jego sekwencję nukleotydową (2). Gen ten znajduje się na chromosomie 19 i koduje $\alpha 1 \rightarrow 2$ -fukozylotransferazę. Jego izolacja otwiera drogę do badań wariantów ABO, spowodowanych ekspresją tego genu i jej zaburzeniami (np. występowania tzw. fenotypów Bombay i para-Bombay). Wczesne badania prowadzone na nielicznych rzadkich przypadkach ujawniły, że gen H jest zdezaktywowany przez punktowe mutacje prowadzące m.in. do przesunięcia ramki odczytu i zbyt wczesnego odczytu kodonu STOP, co fizycznie przejawia się defektami w miejscu aktywnym enzymu.

Analiza DNA, materiału dużo stabilniejszego od białek, obecnego we wszystkich ludzkich komórkach jądrzastych, dostarcza silnego narzędzia umożliwiającego przezwycięzenie trudności przy detekcji antygenów, jeżeli występują w niewielkiej ilości.

TECHNIKA PCR W GENOTYPOWANIU ABO

Od roku 1990, w którym podano sekwencje genów układu ABO używa się wielu technik genetyki molekularnej do genotypowania w systemie ABO.

Większość z tych technik opiera się na reakcji PCR.

Do nich należą :

- 1) technika PCR, po której następuje trawienie restrykcyjne produktów i analiza otrzymanych fragmentów w żelu poliakrylamidowym, czyli technika PCR–RFLP (restriction fragments length polymorphism) (1,6);
- 2) technika PCR z użyciem allelo–specyficznych primerów (as –PCR), specyficznych dla podstawowych substytucji pomiędzy allelami A i B i pojedynczą delecją w pozycji 261 (O) i bezpośrednia analiza produktów w żelu poliakrylamidowym (PASA) (5, 21);
- 3) bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR alleli ABO (16, 17);
- 4) analiza DGGE (elektroforeza w gradiencie denaturującego żelu);
- 5) PCR–SSCP (single strand conformation polymorphism) czyli analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowego DNA; może wykryć pojedynczą mutację jako wynik różnic w szybkości migracji jednoniciowych fragmentów DNA(6);
- 6) PCR z użyciem sond oligonukleotydowych (SSO) o sekwencjach specyficznych dla występujących w allelach ABO, a będących charakterystycznymi dla poszczególnych grup krwi .

We wszystkich tych metodach do badań używa się DNA otrzymany w izolacji metodą organiczną, fenolowo-chloroformową , z proteinazą K. W niniejszej pracy omówiono tylko niektóre z nich.

PCR–RFLP

Zastosowanie techniki PCR, po której można przeprowadzić analizę restrykcyjną, ma związek z występowaniem lub brakiem miejsc restrykcyjnych w polimorficznych sekwencjach genów ABO (3). W badaniu genotypów ABO tą metodą najbardziej popularnym podejściem okazało się amplifikowanie eksonów 6 i 7 genu glikozylotransferazy, oraz użycie enzymów *Kpn I*, *Maell* i *AluI* do trawienia produktów PCR. Fragmenty po trawieniu restrykcyjnym rozdzielano elektroforetycznie np. w 8% żelu poliakrylamidowym.

W ten sposób oznaczono poszczególne długości fragmentów po trawieniu restrykcyjnym dla wszystkich sześciu genotypów układu ABO – OO, AO , BO, AB, AA i BB. Istnieje potrzeba przeprowadzenia przynajmniej dwóch reakcji amplifikacji, ponieważ kilka substytucji i pojedyncza delecja rozróżniająca geny O, B i A leżą zbyt daleko od siebie, co uniemożliwia przeprowadzenie pojedynczej amplifikacji.

Metoda ta okazała się skuteczna w genotypowaniu dla potrzeb medycyny sądowej w zakresie ustalania ojcostwa, a także dała satysfakcjonujące wyniki w przypadku prób pochodzących ze szczątków ludzkich. Jednak pewną niedogodnością w jej stosowaniu jest konieczność użycia dość dużej ilości DNA (25–50ng).

Modyfikacją tej metody jest multiplex–PCR, w którym do pojedynczej reakcji amplifikacji używa się w tym samym czasie kilku różnych par primerów. Uzyskuje

się w ten sposób redukcję czasu amplifikacji, a do samej reakcji potrzeba DNA w ilości nawet poniżej 1ng.

```

252      Bst EII
A) C G T G G T G A C C C C T T
   C G T G G T - A C C C C T T
      KpnI

517      Bss HII
B) G A G G T G C G C G C C T
   G A G G T G G G C G C C T
      Nar I

694      Hpa II
C) C A C C C C G G C T T C T
   C A C C C A G C T T C T
      Alu I

787      Bst NI
D) T A C T A C C T G G G G G G T T C T T
   T A C T A C A T G G G G G C G T T C T T
      Nla III

```

Rys.1 Genotypowanie alleli ABO przy użyciu enzymów restrykcyjnych. Allelo-specyficzne miejsca restrykcyjne dla cDNA z alleli ABO.

A) Pojedyncza delecja związana z allelem O (pozycja 258) tworzy miejsce restrykcyjne dla enzymu *Kpn I* i eliminuje miejsce trawienia enzymu *Bst EII* (allele A/B).

B, C, D) Trzy z czterech substytucji pomiędzy allelami A i B z cDNA również można wykryć za pomocą analizy restrykcyjnej. Substytucja w pozycji 523 zmienia charakterystyczne dla enzymu *Bss HII* miejsce (allel A) na miejsce trawienia enzymu *Nar I* (allel B), w pozycji 700 miejsce dla enzymu *Hpa II* (allel A) do miejsca dla enzymu *Alu I* (allel B) i w pozycji 793 *Bst NI*, charakterystyczne dla allelu A, na miejsce *Nla III*, charakterystyczne dla allelu B (24).

Fig. 1 Genotyping by diagnostic restriction enzyme digestion. Allele-specific restriction sites for the ABO allelic cDNAs were identified.

PASA- PCR Z UŻYCIEM ALLELO-SPECYFICZNYCH PRIMERÓW

Ta technika umożliwia rozróżnianie sześciu podstawowych genotypów: AO, BO, OO, AA, BB, AB, natomiast nie wykrywa podalleli systemu ABO. W przypadku jednej z jej odmian – RAPID-ABO (5), wynik otrzymuje się bardzo szybko, bo w ciągu niecałego dnia. Najlepsze wyniki amplifikacji otrzymywano przy użyciu stosunkowo niewielkich ilości, bo 2–25ng DNA. Technika ta jest gatunkowo-specyficzna i można nią analizować, poza ludzką, jedynie krew pochodzącą od szympanсів i goryli. Metodę tą można używać wstępnie do identyfikacji szczątków ludzkich po katastrofach, w którym to przypadku mamy do czynienia z dużym stopniem destrukcji tkanek i organów. Składa się ona

z dwóch etapów:

- a) amplifikacja prób DNA z użyciem zestawów primerów charakterystycznych dla alleli ABO,
- b) elektroforeza i wizualizacja zamplifikowanych fragmentów w 3% żelu agarozowym lub przy pomocy detekcji fluorescencyjnej.

Tabela I. Przykładowe sekwencje primerów allelo-specyficznych zaprojektowanych parami do amplifikacji alleli ABO w technice RAPID-ABO.

Table I. Example sequences of the allelo-specific primer pairs for the ABO PCR in RAPID-ABO technique.

Specyfika Allelowa (allelic specific)	Primer ID (primer ID)	Sekwencja primera (primer sequence)	Charakterystyczna pozycja rozpoznawana (characteristic recognized position)
O	5'Op	5'GGAAGGATGTCCTCGTCGTGGTA*	238
	3'Op	5'GGTGGTGTTCGTGAGCCTG	321
B	5'Bp	5'GTGGAGATCCTGACTCCGCTG	789
	3'Bp	5'GAAGAACG*CCCCCAT*GTAG	661
A lub O	5'A/Op	5'GTGGAGATCCTGACTCCGCTG	789
	3'A/Op	5'GAAGAACC*CCCCCAG*GTAG	661
A lub B	3'A/Bp	5'AATGTCCACAGTCACTCGCC	INTRON
	5'A/Bp	5'GGAAGGATGTCCTCGTGGTG*	238

Gwiazdkami (*) zaznaczono różnice między primerami.

The differences between primers are marked with asterisks (*).

BEZPOŚREDNIE SEKWENCJONOWANIE PRODUKTÓW PCR

Ta metoda opiera się na amplifikacji alleli ABO i poddaniu jej produktów bezpośredniemu sekwencjonowaniu i rozdzieleniu w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Technika ta, ze względu na wykorzystanie odczynników do sekwencjonowania i kolumniek do oczyszczania produktów PCR, jest dość droga, a oprócz tego czasochłonna w porównaniu z innymi technikami opartymi na PCR. Może ona jednak posłużyć ostatecznemu potwierdzeniu wcześniej wykrytych substytucji i delecji. W ten sposób, ze względu na dostarczenie obszernego i dokładnego wyniku, zapobiega błędom w genotypowaniu. Umożliwia również wykrycie podtypów alleli. Niestety, do sekwencjonowania potrzebna jest dosyć duża ilość DNA – ok. 30ng. Sekwencjonuje się allele ABO zarówno z użyciem znakowanych terminatorów, jak i primerów. Obydwoma metodami można wykryć z łatwością delecję charakterystyczną dla allelu O oraz substytucje rozróżniające allele A i B, natomiast istnieją doniesienia o lepszych wynikach wykrycia pojedynczej delecji w przypadku alleli AO i BO przy użyciu znakowanego startera (16, 17).

ELEKTROFOREZA W GRADIENTCIE DENATURUJĄCEGO ŻELU – DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS)

Technika ta została wprowadzona w 1980 roku i umożliwia rozpoznanie nawet pojedynczych zmian nukleotydowych w DNA. Polega ona na rozdzieleniu różniących się od siebie pojedynczymi zmianami fragmentów na podstawie różnej ich zdolności do denaturacji. W żelu poliakrylamidowym z gradientem czynnika denaturującego (mocznika lub formamidu) fragmenty DNA migrują w zależności od ich wielkości do momentu, gdy wchodząc w określone stężenie czynnika denaturującego zaczynają ulegać rozplataniu, co powoduje zmianę struktury cząsteczki. Proces denaturacji przebiega szybciej w przypadku cząsteczek o dużej zawartości par A/T, a obecność pewnych zmian w tych domenach zmienia tę ich zdolność, czego efektem jest zmiana migracji w żelu. Ponieważ po denaturacji dwuniciowego DNA szybkość migracji zależy jedynie od długości fragmentu DNA, dlatego też ważne jest aby nie dopuścić do całkowitego rozplecenia DNA. W tym celu w analizie DGGE wykorzystuje się specjalnie przygotowane fragmenty DNA (bogate w pary G/C, a więc mające wysoką temperaturę topnienia) tzw. kłamy GC o długości 40 pz dodawane do badanego fragmentu w jego amplifikacji. Czulość tej metody określa się na 90% i zależy od długości badanego fragmentu.

Tą metodą można genotypować w zakresie locus ABO w stosunkowo krótkim czasie, ale ponieważ główną trudność w jej zastosowaniu przedstawia dobór odpowiednich warunków rozdziału elektroforetycznego, wymaga użycia wyspecjalizowanego sprzętu. Metoda ta rozróżnia nie rozpoznawane innymi metodami polimorfizmy związane z allelami O i B.

ANALIZA TYPÓW ABO Z UŻYCIEM SPECYFICZNYCH DLA NICH SOND OLIGONUKLEOTYDOWYCH

Skonstruowane zostały oligonukleotydowe sondy (SSO) specyficzne dla sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne i innych specyficznych polimorficznych miejsc odkrytych poprzez sekwencjonowanie alleli ABO. Technika polega na amplifikacji polimorficznych regionów alleli ABO i genotypowaniu za pomocą hybrydyzacji „dot-blot” z wcześniej skonstruowanymi sondami oligonukleotydowymi. Metoda daje satysfakcjonujące wyniki w identyfikacji osobniczej i za jej pomocą można wykryć aż 25 alleli w zakresie ABO.

GENOTYPOWANIE ABO Z UŻYCIEM SYSTEMU DETEKCJI FLUORESCENCYJNEJ

Metoda ta może opierać się na detekcji specyficznych sekwencji z użyciem systemu komercyjnego TaqMan™. Jego działanie opiera się na specyficznej,

5'nukleazowej aktywności Taq polimerazy. Do reakcji PCR podaje się dodatkową sondę (wyznakowany fluorescencyjnie oligonukleotyd specyficzny dla alleli ABO), która hybrydyzuje z jej produktem. To częściowo dwuniciowe DNA jest pocięte przez Taq polimerazę.

Kiedy próba jest nie pocięta przez polimerazę, wyznakowany fragment bardzo redukuje fluorescencję emitowaną przez reporterowy koniec. Natomiast, kiedy próba jest zdegradowana przez polimerazę, emituje charakterystyczną fluorescencję. Korzyści płynące z tej techniki, to brak potrzeby użycia żelu elektroforetycznego; próby mogą być analizowane w zamkniętych probówkach, a wtedy nie istnieje możliwość zanieczyszczenia produktów PCR.

Można przeprowadzić PCR z użyciem allelo-specyficznych primerów i produkty analizować za pomocą tego systemu.

TECHNIKI BIOLOGII MOLEKULARNEJ A METODY KLASYCZNEJ SEROLOGII

Istnieje szereg korzyści płynących z zastosowania technik biologii molekularnej do genotypowania ABO.

Oto niektóre z nich:

- techniki oparte na PCR mogą być prowadzone z użyciem bardzo niewielkich ilości DNA;
- DNA jest bardziej stabilny pod wpływem zmieniających się warunków środowiska w porównaniu z białkami;
- pojedynczy protokół może być zastosowany do praktycznie wszystkich rodzajów prób z materiału biologicznego;
- istnieje możliwość rozróżnienia, czy grupy A i B są homo-, czy też heterozygotyczne;
- użycie techniki PCR szybko i wprost identyfikuje typ O wśród typów ABO;
- do reakcji PCR mogą być użyte próby biologiczne również stare, częściowo zdegradowane;
- wyniki uzyskane drogą reakcji PCR – dostarczają większej ilości informacji (zarówno o genotypie, jak i fenotypie danego osobnika w zakresie ABO) w porównaniu z metodami klasycznymi (informacja wyłącznie o fenotypie);
- w sprawach o gwałt można definitywnie rozstrzygnąć, jaką grupę krwi miał gwałcień, co jest niemożliwe do określenia przez badanie antygenów grupowych – w przeważających wypadkach nasienia jest za mało do badań serologicznych (19);
- metody genetyki molekularnej są mniej pracochłonne, a zarazem bardziej wiarygodne (trudniej o uzyskanie wyników niespecyficznych).

PODSUMOWANIE

Za pomocą stosowanych do tej pory technik badany jest rutynowo materiał biologiczny w postaci krwi, nasienia i płynów wydzielniczych takich jak pot czy ślina.

Oczywiście przy wyborze odpowiedniej techniki trzeba brać pod uwagę wiele czynników: jakość materiału badawczego, możliwości badacza (sprzęt i finanse), możliwość zastosowania skutecznej, standardowej metodyki itp.

Przedstawione dane dotyczące użycia technik biologii molekularnej w oznaczaniu grup ABO mogą być wystarczające, aby przekonać badaczy, jak wnikliwą można przeprowadzić analizę, jak cenne mogą być wyniki otrzymane przy ich zastosowaniu i jak dużą można mieć pewność, że są one wiarygodne.

PIŚMIENNICTWO

1. Akane S., Yoshimura S., Yoshida M., Okii M., Watabiki T., Matsubara K., Kimura K.: ABO Genotyping Following a Single PCR Amplification, *Advances in Research on DNA Polymorphisms. ISFH Hakone Symposium Program Committee, Tokyo, 1997*:340– 344
- 2. Bauer– Tutsch E., Weichhold G.M., Josephi E.: Blood Group Typing and PCR– Analysis in Stored Blood Samples, *Advances in Forensic Haemogenetics 5, Springer– Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1994*, 304– 306
- 3. Cairns P., Shaw M.E., Knowles M.A.: Preliminary Mapping of the Deleted Region of Chromosome 9 in Bladder Cancer. *Cancer Res, 1993*, 53: 1230–1232
- 4. Chun– Lee J., Chang M.S.: ABO Genotyping by Polymerase Chain Reaction. *J Forensic Sci, 1992*, 1269–1275
- 5. Crouse C., Vincek V.: Identification of ABO Alleles on Forensic– Type Specimens Using Rapid– ABO Genotyping. *Biotechniques, 1995*, 18(3):478–483
- 6. Dissing J., Christiansen D.: Detection of the ABO, GC, ACP, and HLA– DQA1 Polymorphisms at the DNA Level Using PCR and SSCP. *Advances in Forensic Haemogenetics 6, Springer– Verlag, Berlin , Heidelberg, New York 1996*: 407– 410
- 7. Fukumori Y., Ohnoki S., Shibata H., Nishimukai H.: Suballeles of the ABO Group System in a Japanese Population. *Human Heredity, 1996*, 46: 85–91
- 8. Grunbaum B. *Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains. Grunbaum , California 1980*
- 9. Grunnet N., Steffensen R., Bennett E.P., Clausen H.: Evaluation of Histo– Blood Group ABO Genotyping in a Danish Population: Frequency of a Novel O Allele Defined as O2. *Vox Sang, 1994*, 67(2): 210–215
- 10. Kogler G., Callejas J., Hakenberg P. et al.: Hematopoietic Transplant Potential of Unrelated Cord Blood: Critical Issues. *J Hematotherapy, 1996*, 5:105–116
11. Ladd C., Bourke M.T., Scherczinger C.A., Pagliaro E.M., Gaensslen R.E., Lee H.C.: *J Forensic Sci, 1996*, 41(1);134–137
- 12. Liechti– Gallati S., Neeser D.: Efficient and Reliable PCR– Based Detection of the ABO Blood Group Alleles: Genotyping on Stamps and Other Biological Evidence Samples. *J Forensic Sci, 1996*, 41(4): 653–657
- 13. Meldgaard P., Holmes E.H., Bennett

E.P., Clausen H., Zeuthen J., Wolf H., Torben F.: Blood Group ABO– related Glycosylation of Urothelial Cell Lines: Immunocytological, Enzymatic, and Genetic Characterization.. *Cancer Res*, 1994, 54(9): 2440–2447 –14. Mukaida M., Takada Y.: ABO Genotyping of the small DNA fragments from the decomposed body by PCR. *Advances in Forensic Sciences 6*. Verlag Dr. Koster. Berlin 1995: 253– 256 –15. Nakanishi A., Moriya F., Hashimoto Y.: Utility of Loci ABO, HLA–DQA and D1S80 in Excluded Paternity Cases. *Advances in Research on DNA Polymorphisms*. Toyoshoten. Tokyo. 1997:236– 240 –16. Nata M., Hashiyada M., Aoki Y., Sagisaka K.: Genotyping of ABO Blood Group by Direct Sequence. *Advances in Research on DNA Polymorphisms, Toyoshoten. Tokyo. 1997:364– 369 –17. Nata M., Kanetake J., Adachi N., Hashiyada M., Aoki Y., Sagisaka K.: ABO Genotyping by PCR– Direct Sequencing. *Jpn J Leg Med. 1997, 51:1–5 –18. Nishimukai H., Fukumori Y., Okiura T., Yuasa I.: Genotyping of the ABO Blood Group System by PCR– Based Methods. *Advances in Research on DNA Polymorphisms. Toyoshoten. Tokyo. 1997:369– 374 –19. Sasaki M., Shimuzu K., Fukushima T., Shiono H.: ABO Genotyping of the Suspects Using Their Sperm DNA. *Advances in Forensic Haemogenetics 6. Springer. Berlin Heidelberg New York. 1996:322– 325 –20. Schacker U., Schneider M., Zapata M.: ABO Genotyping with PCR *Advances in Forensic Haemogenetics 6. Springer. Berlin Heidelberg New York. 1996: 416– 418*****

21. Suzuki K., Henke J., Henke L., Ogasawara K., Iwata M., Tamura A., Nishio H., Miyazaki T., Tsuji H., Matsui K., Konishi R.: Recombination as a Mechanism for Sequence Diversities in the ABO Gene: Population Difference in the Occurrence of the Recombination and Evidence for Gene Conversion. *Progress in Forensic Genetics 7, 1998: 237– 239 –22. Tsuji H., Iwata M., Tamura A., Miyazaki T., Matsui K., Suzuki K.: Sequence Diversities in the O Allele of the ABO Blood Group: Occurrence of a Novel O Allele. *Current Topics in Forensic Science. 14 IAFS. Shunderson. Ottawa. 1997, 1:12– 15 –23. Yamada M., Ushiyama I., Sato M., Ueyama H., Ohkubo I., Nishimura A., Nishi K.: Species Identification by Analysis of the Genes for ABO Blood Group. *Advances in Forensic Haemogenetics 6. Springer. Berlin Heidelberg New York. 1996, 452– 457 –24. Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J., Hakomori S.: Molecular genetic basis of the histo– blood group ABO system. *Nature, 1990, 345: 229–233 –25. Yamamoto F., McNeill P.D., Hakomori S.: Genomic organization of human histo– blood group ABO genes. *Glycobiology. 1995, 5(1):51–58*****

Adres autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz