

Agnieszka Krzyżańska, Elżbieta Kowalczyk, Joanna Markowska, Tadeusz Dobosz

Loci STR D2S1338 i D19S433 w próbce populacyjnej z terenu Dolnego Śląska

STR loci D2S1338 and D19S433 in a population sample from the Lower Silesia region

Z Zakładu Technik Molekularnych Katedry Medycyny Sądowej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Kierownik: dr hab. Tadeusz Dobosz

W pracy analizowano loci STR D2S1338 i D19S433. Badanie populacyjne przeprowadzono na grupie 1500 niespokrewnionych osób zamieszkałych na terenie województwa dolnośląskiego. Rozkład częstości alleli w obrębie badanych loci był zgodny z regułą Hardy'ego-Weinberga.

Over the past decade, the human identity testing community has established a set of core short tandem repeat (STR) loci that are widely used for DNA typing applications [1]. The present paper analyzed the usefulness of STR D2S1338 and D19S433 loci in paternity testing and human identity establishment. The population study was performed on 1500 individuals, inhabitants of the Lower Silesia region. The DNA samples were amplified simultaneously at 15 STR loci using a multiplex kit AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit. The amplified products were separated by capillary electrophoresis using an ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) with the separation medium POP4™ according to the manufacturer's recommended protocols. Loci D2S1338 and D19S433 are highly polymorphic [2]. There were no detectable differences from Hardy-Weinberg expectations (HWE) in both the tested loci. The distribution of the observed allele is shown in Figures 1 and 2. The observed and expected homozygotes, the exact test for departures from HWE, probability of discrimination (PD), power of exclusion (PE), matching probability (MP), polymorphism information content (PIC), typical paternity index (TPI) and probability of paternity (PP) were also calculated and presented.

Słowa kluczowe: D2S1338, D19S433, Dolny Śląsk
Key words: D2S1338, D19S433, the Lower Silesia region

WSTĘP

Jednoczesna amplifikacja wielu loci STR z różnych miejsc ludzkiego genomu jest podstawową techniką identyfikacji śladów osobniczych, a także dochodzenia spornego ojcostwa. Sekwencje mikrosatelitarne złożone są z jednego do sześciu nukleotydów powtarzających się w pojedynczym locus od pięciu do stu razy. W badaniach do celów sądowych znajdują zastosowanie sekwencje o powtórzeniach trój- cztero- i pięcionukleotydowych. Rozmieszczone są równomiernie w całym genomie, co 300-500 kpz., charakteryzują się dużym zróżnicowaniem i stosunkowo małą wielkością amplikonów od 100 do 400 pz [2].

W celu szybkiej identyfikacji, weryfikacji i porównalności standardów STR w 1997 roku laboratoria FBI wybrały 13 loci STR tworząc bazę Combined DNA Index System (CODIS). Jeszcze wcześniej w 1994 roku powstała National DNA Database (NDNAD) utrzymana przez Forensic Science Service (FSS) w Anglii, zawierająca osiem loci zgodnych z CODIS plus dwa dodane tetranukleotydowe markery D2S1338 i D19S433 [1, 3, 4]. Te dwa, stosunkowo mało znane układy są przedmiotem zainteresowania tej pracy.

MATERIAŁ I METODY

Izolację DNA wykonano stosując metodę cheleksową [5]. Próby DNA były jednocześnie amplifi-

kowane w 13 STR loci należących do systemu CO-DIS: CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D16S539, D18S51, D21S11 i locus amelogeniny oraz dodatkowych 2 loci STR: D2S1338 i D19S433 przy użyciu AmpFISTR®Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) [6].

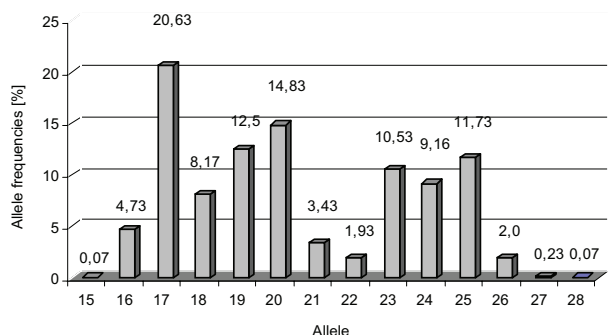
Produkty PCR zestawu Identifiler są znakowane 6FAM™ na niebiesko, VIC® na zielono, NED™ na żółto, PET™ na czerwono. Dodawano GS500 LIZ™ znakowany na pomarańczowo stanowiący standard wielkości. Produkt amplifikacji był rozdzielany w procesie elektroforezy kapilarnej na ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) z zastosowaniem buforu POP4™ (Applied Biosystems). Oznaczenie alleli było determinowane przez porównanie amplifikowanych fragmentów z drabiną alleliczną i standardem wewnętrznym. Wyniki analizowano w programie Gene Scan [3].

Częstość poszczególnych alleli obliczono z uzyskanych genotypów stosując test dokładny Guo i Thompsona przy użyciu oprogramowania Arlequin v. 2001 [7]. Przeprowadzona kalkulacja wykazała zgodność z równowagą Hardy’ego-Weinberga. Współczynnik dyskryminacji (PD), prawdopodobieństwo wykluczenia (PE), prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (MPI), współczynnik informacji o polimorfizmie (PIC), typowy indeks ojcostwa (TPI) obliczano z użyciem oprogramowania PowerStats v. 1,2 firmy Promega [8].

WYNIKI I DYKUSJA

Ryc. 1. Obserwowana częstość alleli locus D2S1338 w populacji dolnośląskiej, N=1500.

Fig. 1. The observed allele distribution of D2S1338 locus in the population from the Lower Silesia region, N=1500.



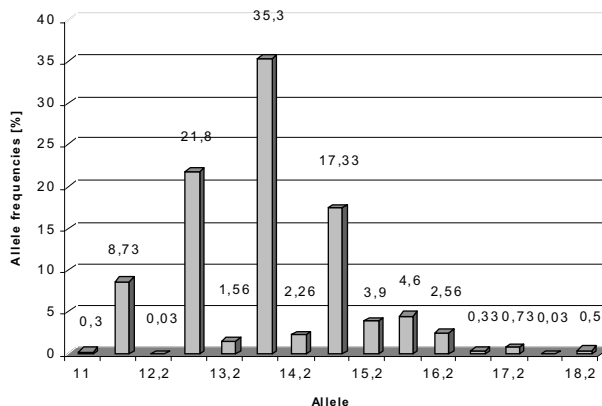
Locus	Ho	He	PIC	PD	TPI	PP	PE	MP	p
D2S1338	13,93%	12,43%	0,86	0,972	3,59	0,722	0,716	0,028	>0,995

Ho – obserwowana częstość homozygot, He – oczekiwana częstość homozygot

Ho – homozygoties observed, He – homozygoties expected

Ryc. 2. Obserwowana częstość alleli locus D19S433 w populacji dolnośląskiej, N=1500.

Fig. 2. The observed allele distribution of D19S433 locus in the population from the Lower Silesia region, N=1500.



Locus	Ho	He	PIC	PD	TPI	PP	PE	MP	p
D19S433	19,26%	21,44%	0,76	0,924	2,60	0,782	0,613	0,076	>0,995

Ho – obserwowana częstość homozygot, He – oczekiwana częstość homozygot

Ho – homozygoties observed, He – homozygoties expected, p-exact test

Uzyskany rozkład alleli loci D2S1338 i D19S433 w badanej populacji dolnośląskiej zestawiono z podobnymi danymi populacyjnymi północnej i centralnej Polski [9]. Nie odnotowano znaczących różnic między porównywanymi populacjami.

Analizę polimorfizmu loci D2S1338 i D19S433 przeprowadzono w celu zbudowania odpowiedniej bazy danych, która zostanie wykorzystana w obliczeniach prawdopodobieństwa częstości wystąpienia danego profilu DNA populacji Dolnego Śląska. Zaobserwowane częstości alleli przedstawiają ryciny 1 i 2.

Wysokie wartości PD wykazywane przez loci STR D2S1338 (0,972) i D19S433 (0,924) czynią te układy szczególnie przydatnymi w analizie spornego ojcostwa. Niewielka wielkość produktu PCR (106-141 pz.) loci D19S433 sprawia, że układ ten jest niezmiernie cenny w analizie zdegradowanych próbek [1]. Jednoczesna amplifikacja sekwencji 15 loci STR w reakcji multiplexowej pozwala na znaczne ograniczenie próbki materiału potrzebnej do oznaczenia profilu genetycznego [3].

Wprowadzenie tetranukleotydowych markerów STR D2S1338 i D19S433 do zestawów komercyjnych pozwala na lepszą interpretację wyników, natomiast użycie zawierającego te markery testu Identifiler zapewnia prawie we wszystkich analizowanych sprawach osiągnięcie prawdopodobieństwa ojcostwa, co najmniej 99,9999% [1].

PIŚMIENNICTWO

1. Butler J.: Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 2006; 3 (3).
2. Budowle B., Collins P., Dimsoski P., Ganong C., Hennessy L., Leibelt C., et al. Population data on the STR loci D2S1338 and D19S433. *Forensic Science Communications* 2001; 3 (3): www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2001/budowle1.html
3. Collins P., Hennessy L., Leibelt C., Roby R., Reeder D., Foxall P.: Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433 and Amelogenin: AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit.
4. FBI homepage www.fbi.gov/hq/lab/codis/index
5. Walsch P., Metzger D., Higuchi R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10, 506-513.
6. www.products.appliedbiosystems.com
7. www.lgb.inige.ch/arlequin
8. Tereba A.: Tools for analysis of population statistics. Technical Tips Promega Corporation. www.promega.com/genetictools/powerstats
9. Czarny J., Grzybowski T., Derenko M. V., Malyarchuk B. A., Miścicka-Śliwka D.: Genetic variation of 15 STR loci (D3S1358, vWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, and D19S433) in populations of north and central Poland. *For. Sci. Int.* 2005, 147; 97-100.

Adres autorów:

Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich
Katedra Medycyny Sądowej
Zakład Techniki Molekularnych
ul. Curie-Skłodowskiej 52
50-369 Wrocław
e-mail: agniek@forensic.am.wroc.pl