

Joanna Dąbrowska, Żanetta Makowska,
Magdalena Spólnicka, Emilia Szablowska-Gnap

Najczęstsze zjawiska występujące podczas analizy profili DNA w multipleksowych systemach STR

Wstęp

Metody badań stosowane na potrzeby genetyki sądowej ewoluowały na przestrzeni lat od metod mikroskopowych przez serologiczne do współcześnie stosowanych metod biologii molekularnej. Najczęściej stosowaną metodą w kryminalistycznych badaniach genetycznych jest analiza DNA w multipleksowych systemach STR (*short tandem repeats*) oparta na reakcji PCR (*polymerase chain reaction*) oraz rozdzielaniu namnożonych fragmentów DNA w automatycznym analizatorze podczas kapilarnej elektroforezy wykorzystującej zjawisko fluorescencji. Zebrane przez detektor sygnały fluorescencji są następnie analizowane komputerowo, co pozwala na określenie, jakie produkty PCR są obecne w badanej próbce oraz ile ich jest. Poszczególnym produktom PCR przypisywane są symbole liczbowe odpowiadające liczbie jednostek repetytywnych obecnych w namnożonym fragmencie DNA. Możliwe jest to dzięki porównaniu długości fragmentu DNA do wzorca w postaci tzw. drabiny alleli zawierającej poznane i zsekwencjonowane allele. Uzyskiwany obraz umożliwia zdefiniowanie fragmentów DNA różniących się jedną parą zasad przy wysokiej precyzji analizy.

Prężny rozwój metodologii badań genetycznych na potrzeby medycyny sądowej wymusza szczegółowe opracowanie precyzyjnych kryteriów analizy uzyskanych wyników w aspekcie sądowym. Kryteria te nie wynikają tylko z zasad dobrej praktyki laboratoryjnej, ale przede wszystkim mają na celu zapewnienie wiarygodności uzyskanych wyników. Ponadto system zarządzania jakością w laboratoriach wymusił stosowanie metody i procedur, w których zawarte są wszystkie istotne z punktu widzenia analizy uzyskiwanych wyników badań aspekty. Dlatego też istnieje ciągła potrzeba doskonalenia i precyzowania zasad analizy danych DNA. Narzędziami służącymi do tego są wytyczne i normy formułowane przez środowiska naukowe opisujące możliwe dokładnie istotne czynniki wpływające na wyniki badań genetycznych, które powinny być wzięte pod uwagę podczas ich analizy. Dlatego też w artykule opisano najczęściej pojawiające się zjawiska genetyczne, z jakimi mają do czynienia eksperci wykonujący kryminalistyczną analizę profili STR.

Prawidłowa interpretacja profilu DNA powinna uwzględniać następujące zjawiska genetyczne: piki n i $n + 1$;

amplifikację preferencyjną; stuttery; degradację DNA; efekt stochastyczny; nadmierną amplifikację; nakładanie się alleli; mutacje obszaru wiązania primerów; mutacje somatyczne; trisomie, translokacje i duplikacje; mieszaniny DNA.

Piki n i $n + 1$

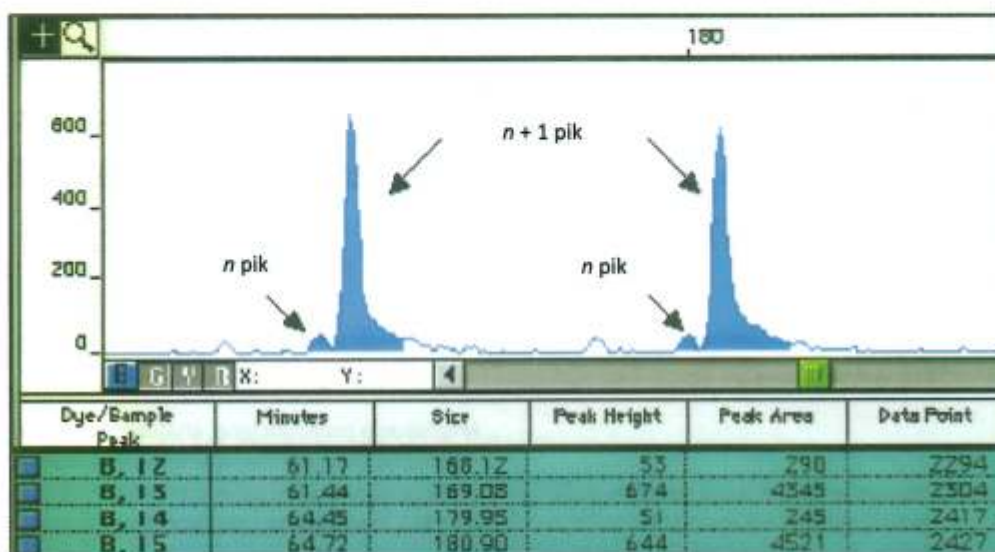
Rzeczywista długość allele oznaczana jest jako pik n . Dołączenie dodatkowej zasady adeniny przez enzym polimerazę na końcu etapu wydłużania może dać produkt PCR o jedną zasadę większy niż rzeczywista długość danego allele, czyli pik $n + 1$. Parametry amplifikacji w multipleksowych zestawach STR są tak ustalone, aby ułatwiać powstawanie pików $n + 1$ dla wszystkich loci w czasie ostatniego cyklu wydłużania, którego rezultatem jest zazwyczaj profil składający się z pojedynczych pików alleli ($n + 1$). Jeżeli więc powstają piki n , to pojawiają się one w połączeniu z pikami $n + 1$, w którym relatywna intensywność sygnału n pod względem wysokości i pola jest niższa niż $n + 1$ (ryc. 1).

Amplifikacja preferencyjna

Amplifikacja preferencyjna to zjawisko polegające na tym, iż jeden allel w locus heterozygotycznym jest amplifikowany z większą wydajnością niż drugi, przez co otrzymuje się parę alleli heterozygotycznych o różnych wysokościach i polach powierzchni pików. Amplifikacja preferencyjna może wystąpić we wszystkich loci. Zazwyczaj jednak obserwuje się ją w loci o wysokiej masie cząsteczkowej, najbardziej narażonych na degradację (ryc. 2). Przy bardzo zdegradowanych próbkach lub w wypadku pików o wysokości poniżej 300 RFU różnica w wysokości pików może sięgać nawet 70%.

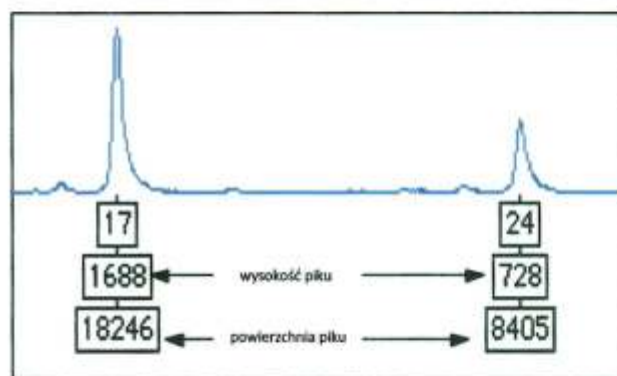
Przy braku równowagi powierzchni piku w locus heterozygotycznym należy rozważyć następujące czynniki:

- zrównoważenie wysokości pików,
- morfologię pików,
- odległość między allelami – zazwyczaj allele o niskiej masie cząsteczkowej amplifikują się z większą wydajnością,



Ryc. 1. Elektroforegram ukazujący morfologię pików n i $n + 1$ w locus vWA
 Fig. 1. Electropherogram with n and $n + 1$ peak morphology in VWA locus
 Źródło (ryc. 1–16): autorzy

- wydajność amplifikacji – zazwyczaj słabo amplifikowane próbki są mniej zrównoważone (efekt stochastyczny),
- podciągnięcie (zjawisko *pull-up*) jednego allela przez drugi spowoduje zawyżenie pola podciągniętego piku,
- degradację w całym profilu,
- możliwość wykonania profilu mieszaniny lub kontaminacji,
- mutację obszaru przyłączania primera,
- somatyczną mutację homozygoty,
- trisomię 2 : 1.



Ryc. 2. Przykład amplifikacji preferencyjnej w locus $D2S1338$
 Fig. 2. Example of preferential amplification in $D2S1338$

Stuttery

Stuttery są to prążki artefaktowe powstające podczas wydłużania nici w trakcie amplifikacji na skutek poślizgu enzymu polimerazy. Dokładny mechanizm poślizgu nie jest znany, ale uważa się, że jest on wynikiem jednego z dwóch zjawisk: częściowego stapiania się nitki w czasie

wydłużania, po którym następuje ponowne przyłączenie komplementarnej sekwencji docelowej w nieodpowiedniej pozycji (z przesunięciem o jedną albo dwie jednostki powtórzeń), powstaje wówczas pętla i fragment skrac się; przyłączania w złej pozycji niepełnych produktów PCR przed wydłużeniem enzymu.

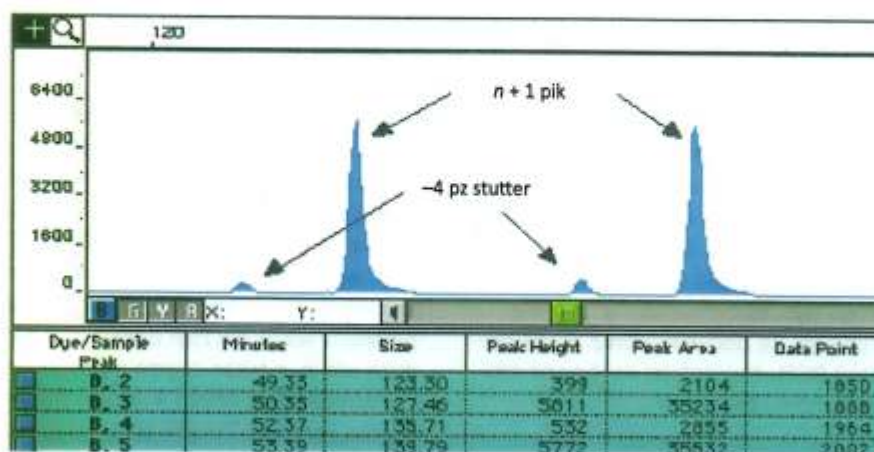
Wynikiem poślizgu jest tworzenie niewielkiej ilości produktów PCR, które są o jedną jednostkę powtórzenia mniejsze niż prawdziwy produkt alleli i obserwuje się je jako mniejszy pik 3 (locus $D22S1045$) lub 4 pary zasad przed prawdziwym pikiem allela (ryc. 3). Pole pików stutterów dla każdego locus jest każdorazowo określone w procesie walidacji. Produkty w postaci stutterów zazwyczaj występują w większej ilości i powstają dużo częściej, kiedy próbka jest nadmiernie amplifikowana lub przeprowadzono zbyt dużo cykli PCR.

Stutter może występować tylko dla jednego allela w danym locus. Dodatkowe piki stutterów można zaobserwować 2 pz przed głównym pikiem allela. Zwane są one często stutterami 2 pz – przypuszczalnie przyczyną ich obecności może być renaturacja DNA.

Ponadto mogą pojawić się również stuttery 8 pz przed prawdziwym allelem w locus $D3S1358$ (możliwe jest także zaobserwowanie ich 12 pz przed prawdziwym allelem). Takie stuttery 8 pz zdają się związane z nadmiernie amplifikowanymi próbkami i mają mniejszą powierzchnię niż stuttery 4 pz (stutter 12 pz jest mniejszy niż 4 pz) (ryc. 4). Dokładny mechanizm ich powstawania nie jest znany.

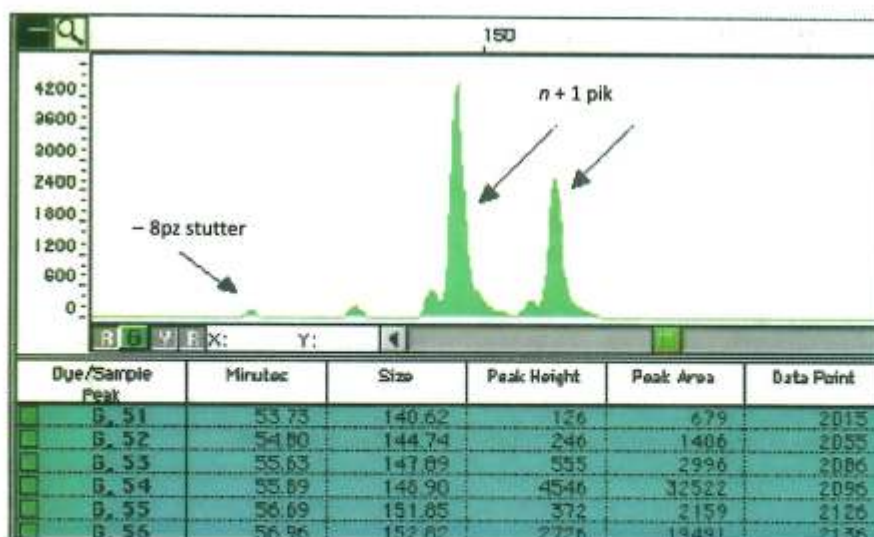
Możliwe jest także wykrycie stuttera większego o jedną jednostkę powtórzenia niż główny pik allela (ryc. 5).

Przy zbyt małej ilości DNA (*low copy number – LCN*) to zjawisko może zaistnieć, gdy piki stutterów będą wyższe niż oznaczone w procesie walidacji.



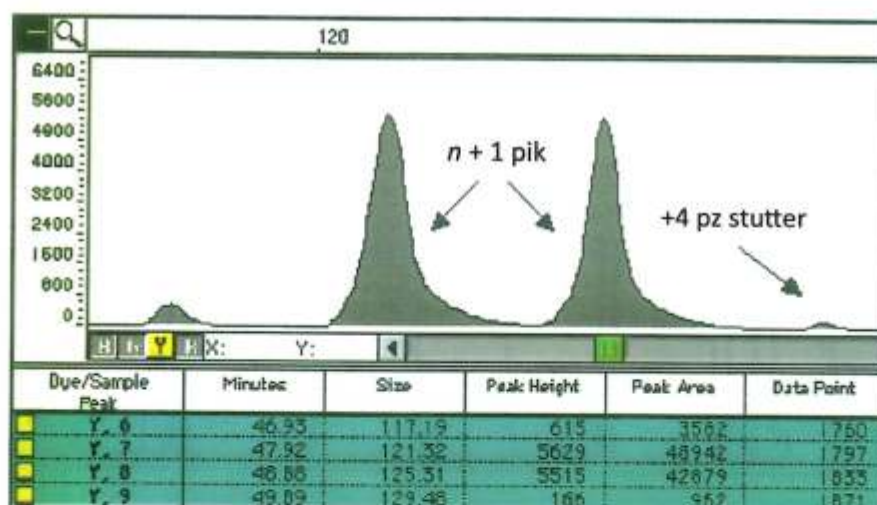
Ryc. 3. Elektroforegramy ukazujące stutter piki w locus D3S1358

Fig. 3. Electrophoregrams with stutters in D3S1358



Ryc. 4. Elektroforegram przedstawiający podprążek 8 pz w locus D8S1179

Fig. 4. Electrophoregram with -8bp stutter in D8S1179



Ryc. 5. Elektroforegram przedstawiający stutter +4 pz w locus D19S433

Fig. 5. Electrophoregram with +4bp stutter in D19S433

Próbki zdegradowane

Podczas reakcji PCR próbek zdegradowanych może występować zjawisko zwane wypadaniem alleli. Występuje ono najczęściej w loci o wysokiej masie cząsteczkowej.

W zdegradowanych próbkach nadmierna amplifikacja może być widoczna tylko w jednym albo dwóch loci, podczas gdy pozostałe loci mogą dawać dużo słabsze sygnały, często poniżej progu (ryc. 6).

Należy zwrócić uwagę, że podobny obraz mogą wywołać inhibitory reakcji PCR. Najczęściej spotykane inhibitory PCR to: barwniki, hem i chelex.

Efekt stochastyczny

Efekt stochastyczny rozumiany jest jako niepożądane zjawisko charakterystyczne dla reakcji PCR mogące wystąpić losowo podczas badania zbyt małej ilości DNA (LCN). Może on polegać na nadmiernej amplifikacji w locus heterozygotycznym (niezbalansowanie pików), wypadnięciu właściwego (*drop-out*) lub wstawieniu innego przypadkowego allelu (*drop-in*).

W trakcie prowadzonych badań walidacyjnych powinien zostać wyznaczony próg stochastyczny definiowany jako wysokość sygnału (w RFU) pochodzącego z matrycowego DNA poddawanego amplifikacji, poniżej którego obserwuje się brak zbalansowania alleli na rekomendowanym poziomie w locus heterozygotycznym, tj. wzrost dysproporcji w wysokościach pików wśród alleli siostrzanych. Analiza wyników poniżej tego progu powinna być przeprowadzona z zachowaniem szczególnej ostrożności. Należy również rozważyć, czy takie wyniki są na tyle wiarygodne, żeby zakwalifikować je do analizy statystycznej.

Nadmierna amplifikacja

Nadmierna amplifikacja ma miejsce, kiedy do reakcji PCR doda się zbyt dużą ilość matrycowego DNA lub jeżeli przeprowadzi się za dużo cykli PCR. Próbkę uważa się za nadmiernie amplifikowaną, jeżeli wysokości alleli produktów są średnio większe niż 8000 RFU. Trafna kwantyfikacja i metodologia reakcji PCR powinny zapobiec amplifikacji nadmiernej ilości DNA. Z nadmiernie amplifikowanymi próbkami wiąże się zbyt duża liczba pików artefaktowych, duże piki *n*, a także częste występowanie zakłóceń w tle i podciąganie w innych kolorach (zjawisko *pull-up*). Nadmierna ilość DNA może doprowadzić do powstania alleli o spłaszczonym wierzchołku. Sygnał jest tak intensywny, że wykracza poza skalę. Piki mają morfologię z odciętymi wierzchołkami, co oznacza, że wielkość piku nie odpowiada jego punktowi centralnemu (ryc. 7).

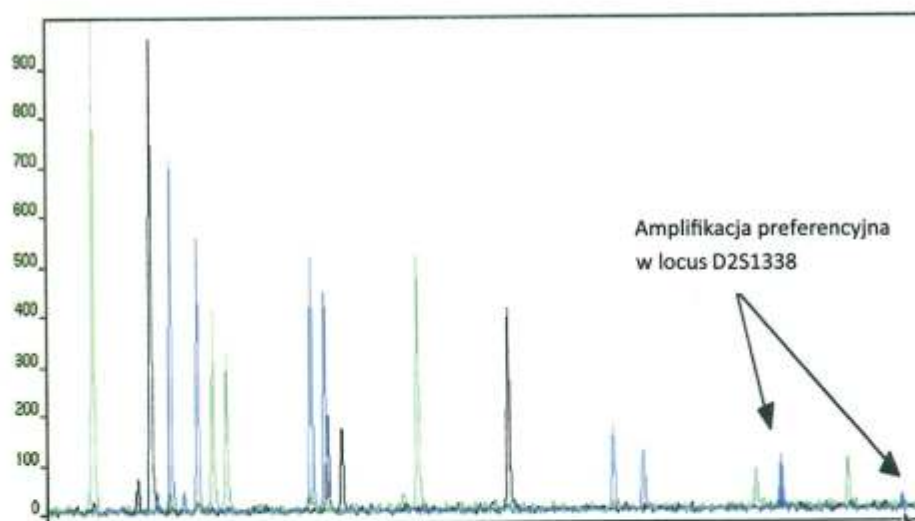
Jeżeli pik daje nadmiernie amplifikowany sygnał, program może podać błędną informację na temat wysokości piku i pola powierzchni.

Nakładanie się alleli

Poszczególne allele oznaczone różnymi barwnikami mają takie same rozmiary w parach zasad, dlatego należy dokonać rozróżnienia między allelami i podciągnięciem kolorów (zjawisko *pull-up*) (ryc. 8).

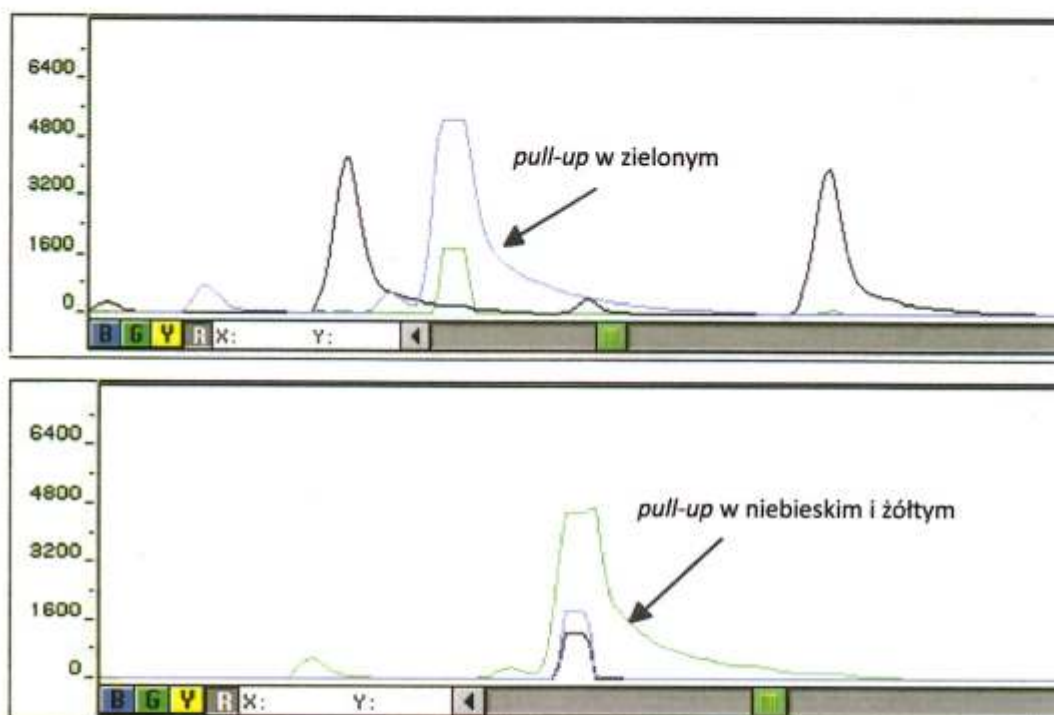
Nadmiernie amplifikowane próbki i złe matryce mogą przysparzać problemów interpretacyjnych z powodu nakładania się alleli.

Aby ułatwić rozróżnienie między prawdziwym pikiem alleli i podciągnięciem kolorów (*pull-up*), należy sprawdzić:



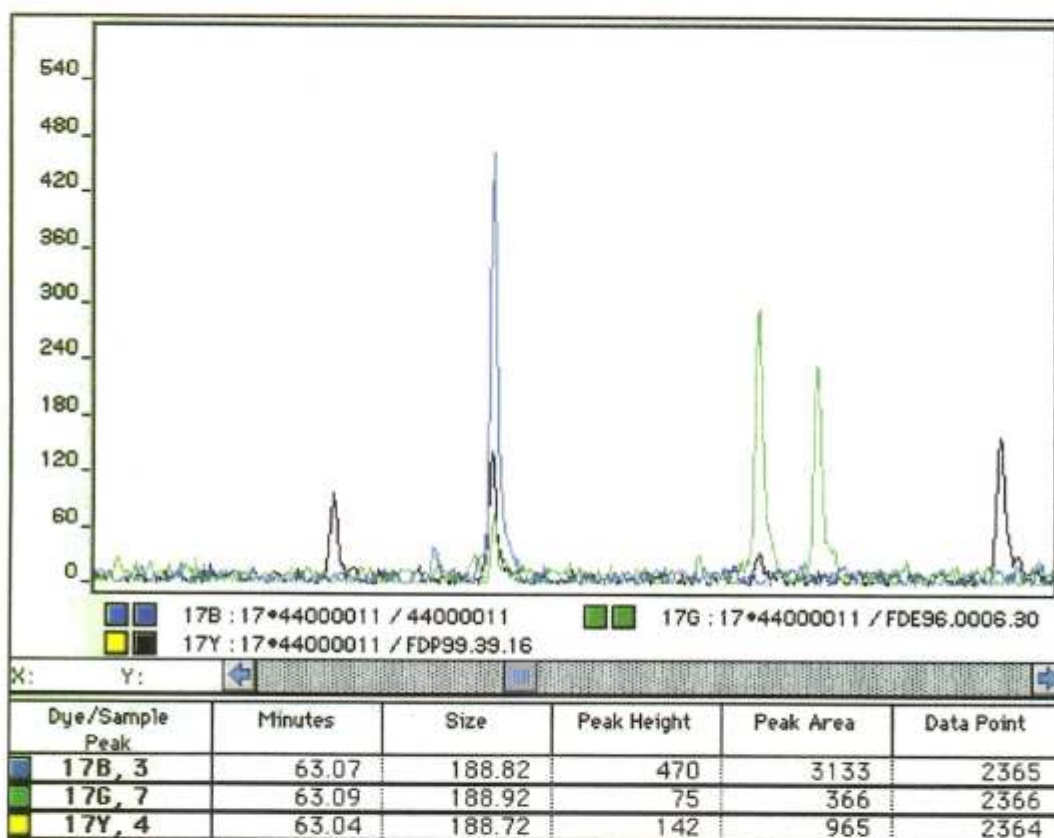
Ryc. 6. Typowy zdegradowany profil z preferencyjną amplifikacją locus D2S1338

Fig. 6. Typical degraded profile with D2S1338 preferential amplification



Ryc. 7. Elektroforegramy przedstawiające allel o spłaszczonym wierzchołku w loci D3S1358 i D8S1179

Fig. 7. Electrophoregrams with flat allele in D3S1358 and D8S1179



Ryc. 8. Elektroforegram przedstawiający pik 19 w locus VWA nakładający się z allelem 9.3 w locus TH01

Fig. 8. Electrophoregram with peak 19 in VWA locus which overlaps 9.3 allele in TH01

- wydajność amplifikacji – czy zastosowano dobry plik matrycy, ponieważ podciąganie zazwyczaj nie występuje w próbkach, które nie są nadmiernie amplifikowane;
- jakość matrycy – jeżeli plik matrycy jest zły, nawet próbki o niskiej wydajności amplifikacji będą wykazywały podciągnięcie;
- liczbę skanów pików – piki podciągnięte zazwyczaj ± 5 skanów od prawdziwego pików;
- kolejność barwników w widmie – różnica barw zazwyczaj oznacza, że podciąganie będzie zachodziło w określonej kolejności, czyli niebieski podciąga zielony barwnik, a dopiero potem żółty. Dlatego zazwyczaj nie widuje się żółtego podciągnięcia pod niebieskim, jeżeli nie zaobserwowano jednocześnie zielonego pików;
- heterozygotyczność – podciąganie zazwyczaj występuje w obu allelach w locus heterozygotycznym;
- morfologię pików – typowy podciągnięty pik nie ma morfologii pików allele. Zazwyczaj jest to zaokrąglony pojedynczy pik niepoprzedzony pikami n i bez stuttera. Jednakże w wypadku bardzo nadmiernie amplifikowanych próbek stuttery i piki n alleli mogą same powodować podciągnięcie, przez co piki podciągnięte mogą wyglądać tak, jakby miały morfologię alleli.

Mutacje obszarów przyłączania primerów

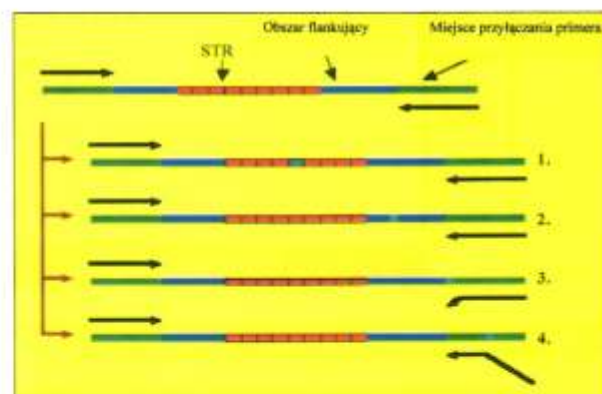
Mutacje obszarów przyłączania primerów w DNA matrycowym mają niekorzystny wpływ na wydajność reakcji PCR. Mutacja w jednej z 20–30 zasad w obszarze przyłączania spowoduje, że primer przyłącza się mniej wydajnie niż do allele niezmutowanego lub nie przyłącza się wcale (allel zerowy). Częściowe przyłączenie da amplifikację preferencyjną na korzyść allele niezmutowanego. Pik zmutowanego allele może mieć pole od 0 do 100% pola pików niezmutowanego. Problem można rozwiązać przez zastosowanie systemu do profilowania DNA wykorzystującego inne obszary przyłączania primerów.

W różnych regionach namnażanych fragmentów DNA mutacje punktowe mogą różnie się objawiać w obrazie elektroforetycznym:

- punktowa mutacja w regionie STR DNA docelowego nie ma wpływu na wydajność amplifikacji;
- punktowa mutacja w regionie flankującym docelowego DNA nie ma wpływu na wydajność amplifikacji;
- punktowa mutacja występująca w obszarze przyłączania primeru, komplementarnym do końca 3' primeru uniemożliwi etap wydłużania i powstanie allele zerowy;
- punktowa mutacja występująca w obszarze przyłączania primeru spowoduje mniejszą wydajność przyłączania – dany allele będzie miał mniejsze pole pod pikiem (ryc. 9).

W różnych regionach namnażanych fragmentów DNA delecje (wypadnięcia) mogą się różnie objawiać w obrazie elektroforetycznym:

- całkowita delecja locus spowoduje niewykrycie żadnego pików z powodu utraty regionu docelowego DNA;
- delecja obszaru przyłączania primeru uniemożliwi przyłączenie primeru i wydłużanie, przez co wystąpi brak pików;
- częściowa delecja obszaru przyłączania primeru spowoduje mniejszą wydajność przyłączania i dla danego allele pole pod pikiem będzie zredukowane;
- częściowa delecja obszaru przyłączania, łącznie z delecją obszaru komplementarnego do końca 3' primeru uniemożliwi etap wydłużania i powstanie allele zerowy;
- wewnętrzna delecja w obszarze STR spowoduje powstanie pików o niższej masie cząsteczkowej (ryc. 10).



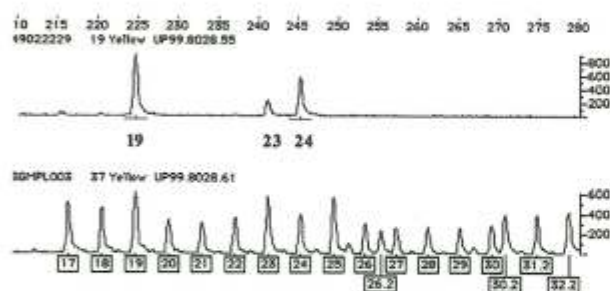
Ryc. 9. Możliwe lokalizacje punktowej mutacji w profilu STR DNA
Fig. 9. Possible sites of point mutation in STR DNA profile



Ryc. 10. Możliwe lokalizacje delecji w profilu STR DNA
Fig. 10. Possible deletion sites in STR DNA profiles

Mutacje somatyczne

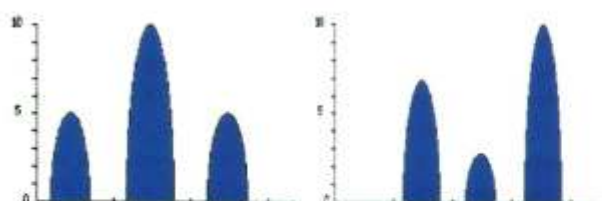
Mutacja DNA może wystąpić w czasie stadiów rozwojowych danej tkanki, tworząc w tkance populację komórek zawierającą zmutowany allele. Zazwyczaj jeden allele mutuje o jedną jednostkę powtórzenia (ryc. 11). Komórki w całej tkance będą zawierały jeden niezmutowany allele i drugi allele w formie zmutowanej albo niezmutowanej. Ten typ mutacji określa się jako mutację somatyczną. Mutacja somatyczna może wystąpić tylko w jednej tkance, przez co różne tkanki będą miały różny skład alleli.



Ryc. 11. Elektroforegram przedstawiający mutację somatyczną w locus FGA
Fig. 11. Electrophoregram with somatic mutation in FGA locus

Mutacje somatyczne mogą objawiać się jako:

- Pik allele, któremu jako niezmutowanemu allelowi towarzyszą dwa mniejsze piki. Zazwyczaj suma pól pod małymi pikami jest równa polu piku niezmutowanego. Ta forma mutacji somatycznej jest wynikiem mutacji jednego allele z locus heterozygotycznego, który jest widoczny w formie dwóch pików różnej wielkości, przez co otrzymuje się trzy piki o różnych rozmiarach (ryc. 12).



Ryc. 12. Diagram przedstawiający mutację somatyczną z rozróżnialnym pikiem niezmutowanym
Fig. 12. Diagram representing somatic mutation with discernible non-mutated peak

- Dwa piki allele o podobnych polach, które można określić jako allele niezmutowane z trzecim, małym pikiem. Ta forma mutacji somatycznej jest wynikiem mutacji jednego allele z locus heterozygotycznego, przez co powstają dwa piki allele różnej wielkości, są więc trzy piki (ryc. 13).



Ryc. 13. Diagramy ukazujące mutację somatyczną z nierozróżnialnym pikiem niezmutowanym
Fig. 13. Diagram representing somatic mutation with indiscernible non-mutated peak

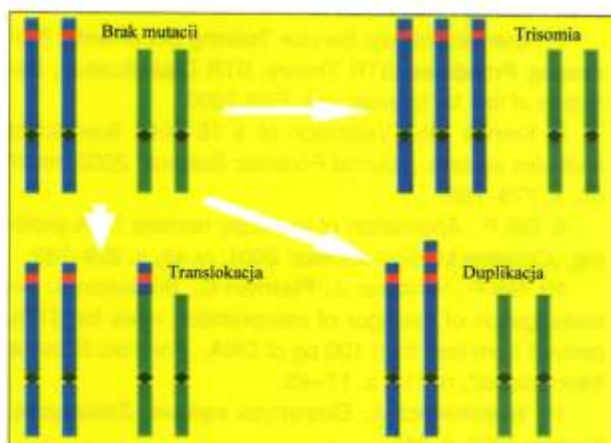
- Dwa piki allele, które wykazują brak równowagi. Ta forma mutacji somatycznej jest wynikiem mutacji jednego allele z locus homozygotycznego, przez co powstają dwa piki różnej wielkości i w locus widać dwa piki (ryc. 14).



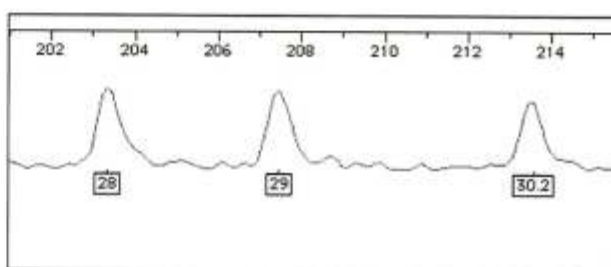
Ryc. 14. Diagramy ukazujące mutację somatyczną locus homozygotycznego
Fig. 14. Diagrams representing somatic mutation of homozygous locus

Trisomie, translokacje, duplikacje

Trisomie allele, translokacje i duplikacje wywołują zwielokrotnienie sygnałów i objawiają się jako trzy piki o podobnych rozmiarach albo jako dwa piki o proporcji rozmiarów 2 : 1 (ryc. 15). Ponieważ wszystkie trzy mutacje objawiają się tak samo, nie można ich rozróżnić (ryc. 16).



Ryc. 15. Diagram przedstawiający trisomię, translokację i duplikację
Fig. 15. Diagram representing trisomy, translocation and duplication



Ryc. 16. Elektroforegram przedstawiający możliwą trisomię, translokację i duplikację w locus D21
Fig. 16. Electrophoregram representing possible trisomy, translocation and duplication in D21

Mieszaniny DNA

Analiza mieszanin DNA w ostatnich latach stała się bardzo istotna i obejmuje obszerne zagadnienie, które z tego względu zostanie przedstawione w odrębnym artykule.

BIBLIOGRAFIA

1. Brągoszewska A., Zbieć-Piekarska R.: Wskazówki do walidacji wewnętrznej multipleksowych zestawów STR, „Problemy Kryminalistyki” 2012, nr 276, s. 32–38.
2. Budowle B. i in.: Low copy number – consideration and caution, Supplied for Promega Corporation.
3. Butler J.M.: Forensic DNA Typing, 2th Edition, Elsevier Academic Press 2005.
4. Clayton i in.: A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling, „Journal Forensic Science” 2004, nr 49 (6), s. 1207–1214.
5. Clayton i in.: Primer binding site mutations affecting the typing of STR loci contained within the AMPFIS-TR SGM Plus Kit, „Forensic Science International” 2004, nr 139 (2–3), s. 255–259.
6. ENFSI DNA Working Group, Recommended Minimum Criteria of the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, 2010.
7. Forensic Science Service Training Documents: Processing Procedures, STR Theory: STR Classification, Selection of loci for forensic use, FSS 2000.
8. Krenke i in.: Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system, „Journal Forensic Science” 2002, nr 47 (4), s. 773–785.
9. Gill P.: Application of low copy number DNA profiling, „Croatian Medical Journal” 2001, nr 42, s. 229–232.
10. Gill P., Whitaker J., Flaxman C., Buckleton J.: An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, „Forensic Science International”, nr 112, s. 17–40.
11. Wójcikiewicz J.: Ekspertyza sądowa, Zakamycze, Kraków 2002, s. 348.

Streszczenie

Obecnie niezwykle ważna jest standaryzacja postępowania w interpretacji wyników badań genetycznych, która powinna uwzględniać jednolite reguły obowiązujące podczas analizy profili DNA. Narzędziami służącymi do tego są wytyczne i normy formułowane przez środowiska naukowe opisujące możliwie dokładnie istotne czynniki wpływające na wyniki badań genetycznych.

Dlatego też w artykule przedstawiono najczęściej pojawiające się zjawiska genetyczne (piki n i $n + 1$, amplifikację preferencyjną, stuttery, degradację DNA, efekt stochastyczny, nadmierną amplifikację, nakładanie się alleli, mutacje obszaru wiązania primerów, mutacje somatyczne, trisomie, translokacje i duplikacje), z jakimi mają do czynienia eksperci podczas kryminalistycznej analizy profili STR.

Słowa kluczowe: multipleksowe systemy STR, artefakty reakcji PCR, profilowanie DNA

Summary

Presently, the standisation of operating procedures in interpretation of DNA analytical results is extremely important and it shall include a uniform set of principles to be followed during the analysis of DNA profiles. The tools utilized to this end involve guidelines and standards formulated by scientists who precisely describe essential factors influencing DNA analytical results.

Therefore, the paper presents the most often DNA phenomena (n and $n + 1$ peaks, preferential amplification, stutters, DNA degradation, stochastic effect, excessive amplification, alleles overlap, primer binding sites mutation, somatic mutation, trisomy, translocation and duplication) to be encountered by experts during forensic analysis of STR profiles.

Keywords: multiplex STR systems, PCR reaction artifacts, DNA profiling