

C. Meissner, P. Bruse, E. Mueller, M. Oehmichen

Nowy czuły krótki pentapleks (ShoP) PCR do typowania zdegradowanego DNA

Forensic Science International 2007, t. 166, nr 2–3, s. 121

Wstęp

W ostatniej dekadzie typowanie DNA wysoce polimorficznych *loci* STR (krótkich powtórzeń tandemowych) stało się najpotężniejszym narzędziem rozróżniania osób, ponieważ *loci* te są stabilne nawet w tkankach, w których zaszedł rozkład. Dużo zastosowań, nawet w przypadkach, w których dysponowano bardzo niewielką ilością DNA, znalazła przede wszystkim jednoczesna amplifikacja wielu markerów STR w tej samej PCR. W tych multiplexowych analizach PCR barwniki fluorescencyjne zazwyczaj są przyłączone do primera forward różnych *loci*, aby umożliwić rozróżnienie fragmentów o podobnych rozmiarach. Rozwój elektroforezy kapilarnej umożliwia wykrywanie on-line tych oznaczonych ampikonów PCR i ma jednocześnie zaletę w postaci wysokiego przerobu, automatycznej obsługi i automatycznego zbierania danych. W wielu badaniach kryminalistycznych, w których wykorzystywany jest materiał genetyczny (pobrany ze szczątków szkieletowych pogrzebanych w ziemi, ciał, które uległy rozkładowi, tkanek zatopionych w parafinie albo włosów telogenowych), DNA jest wysoce zdegradowane z powodu jakości próbki albo warunków środowiskowych.

Stopień rozkładu DNA w znacznym stopniu zależy od własności geochemicznych gleby, wpływu otoczenia, populacji mikroorganizmów i temperatury. Szczególnie niekorzystny wpływ na powodzenie typowania DNA z kości albo zębów ma przede wszystkim wilgotne środowisko. Z drugiej strony, degradacja DNA jest wolniejsza w warunkach zmarzliny w regionach arktycznych, co umożliwia analizę szczątków nawet sprzed 50 000 lat. Historyczne DNA ekstrahowane z kości o wieku do 10 000 lat ma jednak średnią wielkość od 100 do 150 bp, a procesy oksydacyjne i hydrolytyczne sprawiają, że amplifikacja PCR i typowanie DNA są niezwykle trudne. W najgorszym razie DNA może być tak zdegradowane, że nie da się z niego otrzymać profili STR.

Przedstawiono wiele różnych metod poprawienia jakości profilowania zdegradowanego DNA. Badania te obejmują ewaluację różnych metod ekstrakcji, usuwania specyficznych inhibitorów PCR, a także oczyszczania ekstraktów, metodę nested PCR i typowania standaryzowanego zdegradowanego DNA. Ostatnio w literaturze przedmiotu pojawił się obszerny przegląd zastosowania ampikonów o zmniejszonych rozmiarach do wiarygodnego typowania zdegradowanego DNA. Te minipleksy PCR są rekomendowane w przypadkach, w których dochodzi do wypadania alleli i zmniejszenia czułości. Tego typu zjawiska są obserwowane szczególnie w zakresie dłuższych alleli. Jak dotąd kilka tych interesujących minipleksów PCR opisano (łącznie z badaniem włosów w fazie telogenu) na potrzeby wielu ekspertyz kryminalistycznych.

Wykorzystując doświadczenia związane z degradacją DNA zachodzącą nawet w ciągu długiego czasu, autorzy opracowali multipleks PCR, w którym żaden z wykrywalnych alleli nie ma więcej niż 150 bp długości. W artykule zaprezentowano metodę krótkiego pentapleksu PCR (ShoP-PCR), która umożliwia uzyskanie doskonałych wyników nawet w przypadkach, w których typowanie DNA nie powiodło się z użyciem zestawów dostępnych na rynku.

Materiały i metody

Opracowanie primerów

Sekwencje primerów opracowano za pomocą oprogramowania Primer3 i GeneFisher (http://bibiser.tech-fak.uni-bielefeld.de/cgi-in/gf_submit?mode=STAR-TUP&sample=dna). Primery forward zostały oznaczone barwnikami fluorescencyjnymi (tab. 1).

Amplifikacja PCR

Pentaplex zastosowano w mieszaninie reakcyjnej 10 µl zawierającej 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, po 200 µM każdego dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dUTP),

2,2 mM MgCl₂, 500 µg/ml albuminy surowicy wołowej, 1% Tween 20, po 200 nM z każdego primera amelogeniny, po 600 nM każdego z primerów D8S1179, po 1000 nM każdego z primerów vWA, po 75 nM każdego z primerów TH01, 150 nM każdego z primerów D3S1358, 1 U Platinum Taq DNA Polimerazy (Invitrogen, Karlsruhe, Niemcy), 0,1 U UNG (MBI Fermentas, Leon-Rot, Niemcy) i zmienne ilości matrycy DNA. Aby uniknąć kontaminacji, próbki produktów PCR wytrawiano enzymem UNG (Uracil-DNA Glikosylase) przed amplifikacją poprzez inkubację w temperaturze 70°C przez 5 min. Profil cykli ShoP-PCR w systemie PCR GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy) był następujący: 95°C przez 11 min (wstępna inkubacja), 96°C przez 2 min, a po niej 10 cykli denaturacji przez 30 s w 94°C, przyłączanie primerów przez 30 s w temp. 60°C i ich wydłużanie przez 45 s w temp. 70°C, a następnie przez 18–22 cykle denaturacji przez 30 s w temp. 90°C, przyłączanie primerów przez 30 s w temp. 60°C i wydłużanie primerów przez 45 s w temp. 70°C. Po tym następował etap ostatecznego wydłużania przez 90 min w temp. 60°C. Pod koniec reakcji PCR utrzymywano temperaturę 4°C. Prędkość zmiany temperatury (*ramping*) między przyłączaniem i wydłużaniem starannie ustawiono w przedziale między 0,3° a 0,5°C/s.

Wykrywanie sygnału

Od jednego do dwóch mikrosatelitów każdego produktu PCR mieszano z 0,5 µl standardu wewnętrznego GeneScan-400HD (ROX) i 14,5 µl dejonizowanego formamidu (Sigma, Tufkirchen, Niemcy). Mieszanina została poddana denaturacji w termocyklerze PCR przez 3 min w temp. 96°C. Po chłodzeniu na lodzie próbki nastrzykiwano elektrokinetycznie przez 5 s. Ujawnianie wykonywano na analizatorze 310 ABI Prism Genetic zgodnie z zaleceniami producenta (Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy). Wielkość fragmentów i ilość produktów PCR ustalono automatycznie, posługując się oprogramowaniem Gene Scan Analysis 3.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy).

Procedury walidacji

Specyficzność primerów

Wymazy z jamy ustnej pobrano od 200 niespokrewnionych, zdrowych ochotników. DNA natychmiast ekstrahowano z użyciem Cheleksu 100. Porównano 200 ludzkich profili DNA otrzymanych za pomocą ShoP-PCR z profilami tych samych osób otrzymanymi z zastosowaniem systemu SGM i PowerPlex 16.

Aby sprawdzić specyficzność metody dla materiału ludzkiego, pobrano DNA od różnych zwierząt (kot, pies,

świnia, koń, krowa, mysz, szczur, żaba, ryba, owca, zając, świnka morska, koza, jeleń, czarny jeleń, lis, gołąb i śledź) i wyizolowano trzy najbardziej spokrewnione naczelne (goryl, orangutan, szympan). Izolację DNA przeprowadzono za pomocą QIAmp, pakietu Mini DNA (Qiagen, Niemcy). Ekstrakty przechowywano w temperaturze -20°C. Aby udowodnić specyficzność wydłużania primerów dla człowieka, dodatkowo wykorzystano zestaw różnych ekstraktów DNA z bakterii i grzybów. Po jednym nanogramie DNA z każdego ekstraktu podano PCR zgodnie z powyższym opisem.

Czułość a mieszaniny DNA

Przygotowano dziesięć różnych rozcieńczeń ekstraktów DNA z krwi odpowiednio z ilością matrycy 100, 50, 25, 12,5 i 6,25 pg. Ilość DNA matrycowego w mieszaninie ustalono, stosując zestaw do kwantyfikacji PicoGreen dsDNA (MoBioTec, Goettingen, Niemcy) w systemie VersaFluor™ Fluorometer (Bio-Rad, Monachium, Niemcy) do ilości 0,025 ng, a następnie rozcieńczono do 0,0125 i 0,00625 ng. Przygotowano próbki mieszanin (1:0, 19:1, 9:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:9, 1:19 i 0:1) z dwóch różnych ekstraktów DNA z całkowitym wkładem DNA – 1 ng i przeprowadzono pomiar ilości zgodnie z powyższym opisem.

Test DNase I

Aby prześledzić, czy powiodło się typowanie zdegradowanego DNA, wykonano test DNase I. DNA o wysokiej masie cząsteczkowej ekstrahowano z wykorzystaniem zestawu MasterPure™ do puryfikacji DNA (Epicentre, Madison, WI, USA). Osiemdziesiąt mikrogramów ekstraktów trawiono za pomocą 8 U DNase I w 200 µl mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem pakietu DNA-free (Ambion, Huntingdon, W. Brytania). Następnie pobierano po 20 µl ekstraktu, odpowiednio po 0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 15 i 30 min, i zatrzymywano reakcję przez dodanie 4 µl odczynnika dezaktywującego (DNase Inactivation Reagent). Pobierano po 0,2 µl zdegradowanego DNA i poddawano PCR w objętości 10 µl – zgodnie z opisem zamieszczonym powyżej.

Badania kryminalistyczne

Zbadano osiem przykładowych próbek DNA niskiej jakości, wśród których był znaczek z listu w sprawie o szantaż, pieluszka, powłoczka zawinięta w plastikową torebkę i dywan ze sprawy związanej z napastowaniem na tle seksualnym, szczątki szkieletu pogrzebane w ziemi, zatopione w parafinie tkanki mózgowe dwóch ofiar morderstwa, jeden włos w fazie telogenu – dowód w sprawie napaści w supermarkecie oraz niedopałek

papierosa znaleziony na przystanku autobusowym i wykorzystany w sprawie dotyczącej identyfikacji.

Wyniki

W tworzeniu nowego systemu multipleksowego bardzo istotne znaczenie ma ustalenie solidnego i wiarygodnego systemu typowania DNA dla wszystkich rodzajów próbek. ShoP-PCR został opracowany tak, aby umożliwić amplifikację nawet znacznie zdegradowanego DNA. Ta multipleksowa metoda obejmuje *loci* amelogenu, TH01, VWA, D3S1358 i D8S1179. Długość alleli opisanych w literaturze nie przekracza 150 bp (allele wraz z przedziałami rozmiarów dla każdego *locus* wyszczególniono w tabeli 1).

Primery amelogenu są ukierunkowane na region inny niż para primerów powszechnie używanych przez kryminalistów. Otrzymane primery amelogenu różnią się o 1077 bp od regionu używanego w pakietach komercyjnych (pierwszy raz opisane przez H. Haasa-Rochholza i G. Weilera). Jak przedstawiono w tabeli 1, ten nowy docelowy region wykazuje różnicę 3 bp między allelem X i Y. Warunki PCR i koncentracje primerów uzyskanej mieszaniny reakcyjnej ShoP-PCR zostały starannie dopasowane, tak aby otrzymać optymalne wyniki. Ważnym krokiem było dostosowanie prędkości zmiany temperatury (*ramping*), nie tylko dla termocyklera GeneAmp 2400, lecz także dla innych termocyklerów (GeneAmp 9600, Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy; PCR Express, Thermo Electron/Hyaid,

Tabela 1

Opis, liczba powtórzeń składników drabiny alleli, przedział wielkości alleli i sekwencje primerów *loci* ShoP-PCR

System	GenBank ¹⁰ accession	Repeat numbers of allelic ladder components	Size range of allelic ladder components	Primers (5' → 3')	Labelled with
Amelogenin	M55418 and M55419	3 bp difference	X: 79 bp, Y: 82 bp	CCTTTGAAGTGGTACCAGAGCA (forward), GCATGCCTAATATTTTCAGGGAA (reverse)	HEX
D8S1179	GO8710	7–18	83–127 bp	TTTTTGTAATTCATGTGTACATTCG (forward), TCCTGTAGATTATTTTCACTGTGG (reverse)	6-FAM
VWA	M25858	10–22	93–141 bp	GAATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA (forward), GATGATAAATACATAGGATGGATGGA (reverse)	HEX
TH01	D00269	4–9, 9.3, 10–11, 13.3	68–107 bp	GCCTGTTCCCTCCCTTATTTCC (forward), AGGTCACAGGGAACACAGACTC (reverse)	NED
D3S1358	11449919	12–20	113–145 bp	ACTGCAGTCCAATCTGGGTGAC (forward), GAAATCAACAGAGGCTTGCATG (reverse)	NED

Sekwencje D8S1179 primera forward już były publikowane (M.D. Barber, B.H. Parkin: Sequence analysis and allelic designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179, „Int. J. Legal Med.” 1996, nr 109, s. 62–65).

Tabela 2

Wysokość pików podprążków (%) z uwzględnieniem standardowego błędu (S.E.)

Allele (n)	TH01 (n = 44)		D8S1179 (n = 107)		D3S1358 (n = 123)		VWA (n = 102)	
	Stutter (%)	S.E. (%)	Stutter (%)	S.E. (%)	Stutter (%)	S.E. (%)	Stutter (%)	S.E. (%)
6	3.64 (10)	2.20						
7	2.37 (4)	0.62						
8	4.82 (8)	2.54	3.65 (4)	1.77				
9	3.50 (11)	0.97						
9.3	4.03 (10)	2.79						
10	12.99 (1)		5.89 (16)	1.31				
11			6.22 (8)	2.12				
12			6.38 (16)	2.03				
13			7.08 (33)	2.39				
14			6.58 (14)	2.41	7.69 (17)	2.03	2.46 (11)	1.25
15			8.02 (13)	2.09	8.89 (35)	2.42	6.08 (16)	2.73
16			9.48 (3)	3.19	9.56 (24)	2.60	6.53 (22)	1.80
17					10.30 (24)	2.71	7.15 (25)	2.05
18					11.16 (20)	2.53	8.67 (17)	2.90
19					9.77 (3)	0.44	10.46 (9)	2.00
20							7.40 (2)	0.14

n to liczba zaobserwowanych i wykrywalnych pików stutter (pików podprążków) w allelach; wartości w nawiasach odpowiadają liczbie obserwacji dla każdego produktu

Dreieich, Niemcy) albo PowerPlex 16 System™ (Promega, Mannheim, Niemcy). Aby wykluczyć mutacje w obrębie sekwencji przyłączania się primera, zbadano 200 zdrowych osób z wykorzystaniem ShoP-PCR oraz zestawu SGMplus™ albo Powerplex 16 System. Oprócz przypadku, w którym allel 16 nie był wykrywalny w genotypie 16/17 locus VWA za pomocą systemu SGMplus™, nie zaobserwowano różnic między wynikami typowania z użyciem komercyjnie dostępnych zestawów albo ShoP-PCR. Częstotliwości dla 200 niespokrewnionych osób były zgodne z oczekiwaniami wynikającymi z zastosowania prawa Hardy'ego-Weinberga. Przy zastosowaniu 200 pg matrycy DNA cztery autosomalne *loci* wykazywały różnice w zakresie heterozygotycznego niezbalansowania. Wartość najniższą zaobserwowano dla układu TH01: $4,07 \pm 11,30\%$, zaś najwyższą dla D8S1179: $13,38 \pm 13,29\%$. D3S1358 wykazuje heterozygotyczne niezbalansowanie $9,35 \pm 9,40\%$, VWA $7,23 \pm 10,64\%$. Występowanie specyficznych dla alleli podprążków opisano w tabeli 2.

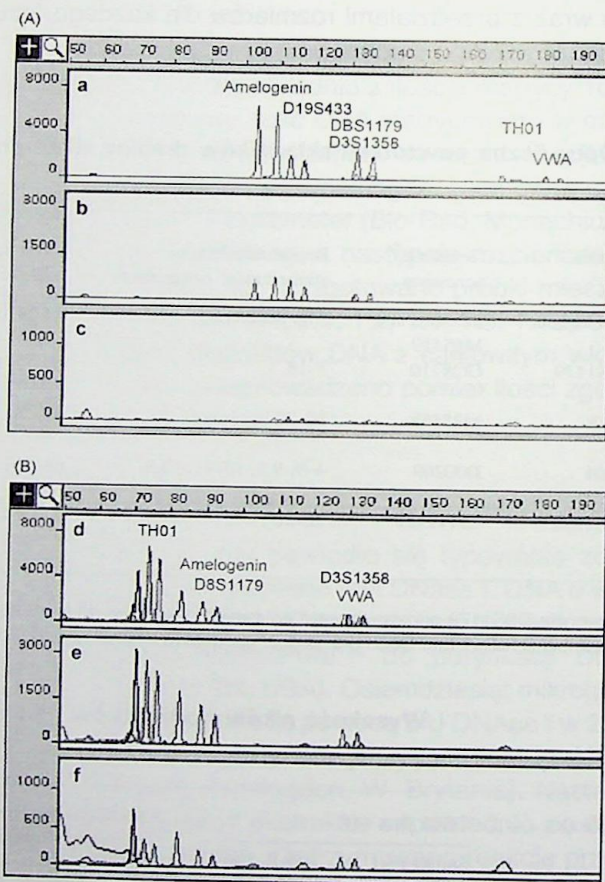
Podczas gdy wysokość pików podprążków dla *locus* TH01 jest podobna dla każdego allela bez względu na jego wielkość i wysokość pików dla VWA, a szczególnie dla D3S1358, to D8S1179 nie wykazuje żadnej tendencji.

Przy badaniu zestawu próbek DNA różnych zwierząt, bakterii i grzybów wykryto jedynie sygnały u orangutana i goryla. DNA szympansa dało profil z primerami amelogeniny, TH01, D3S1358 i VWA, choć specyficzne sygnały dla VWA były poza zakresem drabiny alleli dla człowieka (danych nie przedstawiono).

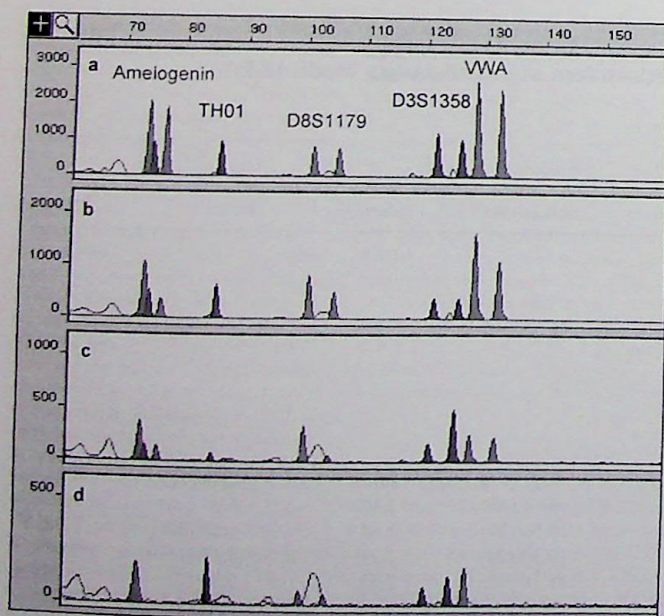
Zbadano różne koncentracje matrycy i ujawniono granicę wykrywalności 12,5 pg DNA matrycowego ekstrak-

wanego z tkanki post mortem niewykazującej żadnych oznak rozkładu. Jest to równie ilości mniej więcej dwóch komórek diploidalnych. Przy ilości 6,25 pg, jak się spodziewano, zaobserwowano wypadanie alleli (ryc. 1).

Domieszki 50 pg w całkowitej ilości 1000 pg DNA (1:19) były wyraźnie wykrywalne (danych nie przedstawiono). Kiedy wykonano test DNase I, otrzymano cały profil DNA po trawieniu trwającym 3 minuty (SGMplus™ wykazuje tylko sygnały dla *loci* amelogeniny, D3S1358 i D8S1179). Przy trawieniu trwającym 4 minuty wyraźnie widoczne były cztery z pięciu *loci* ShoP – w przeciwieństwie do SGMplus™, gdzie wykrywalne było tylko *locus* D19S433 (ryc. 2A i B).

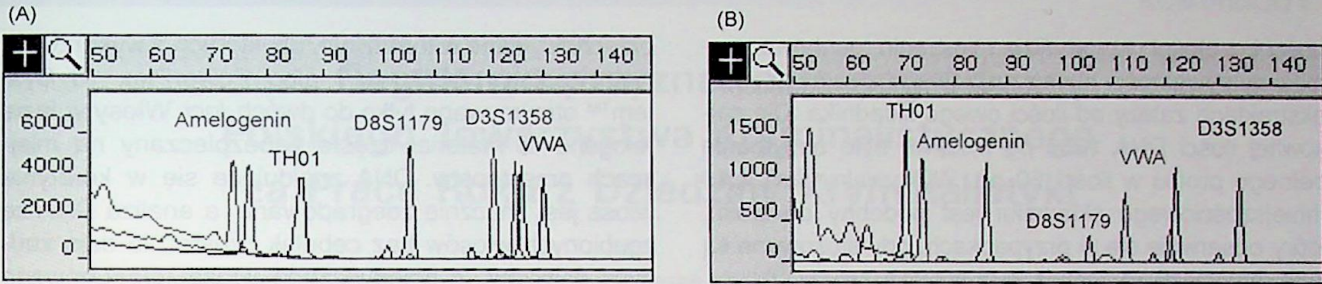


Ryc. 2. DNA sztucznie zdegradowane drogą trawienia DNase I przez 2 min (a i d), 3 min (b i e) i 4 min (c i f). Profile DNA otrzymane z użyciem zestawu SGMplus™ (A) i ShoP-PCR (B). Pełny profil pięciu *loci* ShoP otrzymano po 3 min, a cztery z pięciu *loci* były wyraźnie widoczne po 4 min.



Ryc. 1. Wyniki oznaczania DNA ShoP-PCR z wykorzystaniem 100 pg (a), 25 pg (c) i 12,5 pg (c) i 6,25 (d) DNA matrycowego. Zauważmy wypadanie alleli na dole (d) odpowiednio w *loci* amelogeniny, TH01 i VWA.

Jak przedstawia tabela 3, analiza ShoP-PCR w badaniach kryminalistycznych dla wszystkich ośmiu badanych próbek dała wynik lepszy niż zestawy komercyjne. Przykłady profili ShoP-PCR zaprezentowano dla powłoczki (ryc. 3A) i pieluszki (ryc. 3B) w sprawie napastowania na tle seksualnym. W pięciu z przypadków otrzymano wykrywalny pełny profil DNA dla *loci* ShoP, w przypadkach 6 i 8 cztery z pięciu *loci* były wyraźnie widoczne. Nawet dla próbki kości pogrzebanej w ziemi



Ryc. 3. Wynik oznaczania DNA z użyciem ShoP-PCR ze śladów z powłoczki (A) i pieluszki (B) w wypadku podejrzenia napastowania na tle seksualnym dziecka. Po zastosowaniu komercyjnych zestawów nie otrzymano żadnych sygnałów.

przez 7 lat otrzymano trzy pełne *loci*. Dla porównania – SGMplus™ i/ albo PowerPlex 16™ dało mniej albo wręcz nie dało wyników.

Dyskusja

Krótki pentapleks PCR obejmuje *loci* amelogeniny, TH01, VWA, D3S1358 i D8S1179. Został opracowany w celu umożliwienia typowania DNA nawet w przypadkach, w których DNA jest wysoce zdegradowane albo występuje w niewielkiej ilości. Ponieważ nawet z DNA o bardzo złej jakości otrzymuje się fragmenty o rozmiarach 100–150 bp, żaden z powszechnie spotykanych alleli w tych pięciu *loci* nie przekracza długości fragmentu 150 bp. W celu uniknięcia nakładania się alleli dwóch różnych *loci* oznaczonych tym samym barwnikiem fluorescencyjnym dobrano primery tak, aby między najmniejszym powszechnie spotykanym allelem jednego *locus* i największym drugiego występowała odległość co najmniej 10 bp. W niektórych próbkach stwierdzono obecność nietypowych pików, które wyglądają na szersze, więc łatwo je odróżnić od specyficznych, znakowanych barwnikiem fluoroscencyjnym produktów PCR. W innych przypadkach wykryto kilka pików albo kleksów barwnika. Pojawienie się artefaktów nie utrudniało jednak interpretacji wyników, ponieważ większość z tych pików wystąpiła poza długościami fragmentów właściwych alleli danego *locus* albo poniżej limitu wykrywalności 50 RFU. Przy projektowaniu primerów do amplifikacji PCR procedury dopasowania sekwencji alleli muszą wykluczać miejsca przyłączenia primerów, nieleżące poza obszarem zainteresowania. Polimorfizmy w regionach przyłączania primerów mogą prowadzić do pojawienia się alleli zerowych, co z kolei może sprawić, że pojawią się fałszywe homozygoty, tak jak opisano ostatnio dla locus D5S818, gdzie w allelu 10 występuje mutacja w miejscu przyłączania primera.

W PCR o krótkich docelowych amplikonach najbliższa pozycja primerów w stosunku do interesujących nas STR-ów nie zawsze jest tą wybraną, ponieważ regiony flankowania primerów często zawierają struktury albo sekwencje powtórzeń mogące utrudnić PCR po-

przez niedopuszczenie do przyłączania się primera albo powstania artefaktów PCR. Z tego powodu każdą z projektowanych reakcji PCR powinno się starannie przetestować w zakresie występowania artefaktów i wiarygodności w dużej grupie próbek DNA ludzkiego i zwierzęcego oraz śladów kryminalistycznych.

Zjawisko wypadania alleli w pięciu *loci* sprawdzono, porównując profile DNA 200 osób z wynikami dla dwóch dostępnych na rynku zestawów PowerPlex 16 System™ (Promega, Madison, USA) i SGMplus™ (Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy). We wszystkich przypadkach otrzymano identyczne profile i nie stwierdzono preferencyjnej amplifikacji, wypadania alleli ani *loci*. Utrata allela 16 zaobserwowana w *locus* VWA przy zastosowaniu zestawu SGMplus™ ma być wynikiem mutacji w obszarze przyłączania primera, tak jak zaobserwowano też dla allela 19, ponieważ profile PowerPlex 16 System™ i ShoP-PCR były identyczne. Specyficzność primerów testowano na próbce DNA zwierząt, bakterii i grzybów. Tylko dla DNA naczelnych otrzymano wykrywalne sygnały – częściowo allele poza drabiną – które już zaobserwowano w ramach innych badań ludzkich *loci* STR przy sprawdzaniu DNA naczelnych.

W eksperymentach z rozcieńczeniami wiarygodne wyniki otrzymywano dla co najmniej 12,5 pg ludzkiego DNA, aczkolwiek w niektórych przypadkach zaobserwowano niezbalansowaną heterozygotę. Wiadomo, że w warunkach, w których dostępna jest tylko niewielka ilość DNA, występuje tendencja do amplifikacji preferencyjnej. Należy mieć również na uwadze niezbalansowanie i wypadanie alleli. Krótkie fragmenty ShoP-PCR przyczyniły się do zwiększenia czułości ze względu na wyższą wydajność amplifikacji. Nawet przy ilości DNA 12,5 pg otrzymano pełny profil. Kiedy przeprowadzano PCR 6,25 pg DNA matrycowego, zaobserwowano wypadanie alleli, ponieważ spodziewano się efektów stochastycznych podczas przyłączania primerów i amplifikacji PCR. W innych multipleksowych reakcjach PCR zjawiska te są obserwowane przy badaniu ilości DNA 200 pg.

Inne istotne zagadnienie, któremu należało się przyjrzeć w procedurze walidacji, to kwestia wiarygod-

ności i czułości przy analizie mieszanin, ponieważ granica wykrywalności mniejszościowego składnika w ich ekstraktach zależy od ilości owego składnika. Dla całkowitej ilości DNA 1000 pg możliwe było otrzymanie pełnego profilu w ilości 50 pg. Wykrywalny limit 1:19 mniejszościowego składnika jest podobny do limitu, który obserwuje się w przypadkach, gdy stosowane są inne metody wykorzystujące multipleks.

Dzięki analizie zdegradowanego materiału ujawniła się najważniejsza zaleta opisanego systemu. Zdegradowane DNA przygotowano drogą trawienia DNase I w kontrolowanych warunkach. Nawet po trawieniu trwającym 4 minuty wyraźnie widoczne były cztery z pięciu *loci*. Nie jest zaskoczeniem, że najpierw zachodziło wypadanie alleli największego *locus*, D3S1358. Stwierdzono także brak wykrywalnego sygnału dla *locus* FGA, kiedy to wykorzystano zestaw do amplifikacji AmpFISTR™ Blue PCR i wykrywalne były dwa z trzech *loci*.

Omawiana metoda umożliwia typowanie zdegradowanego DNA ze względu na małe rozmiary docelowych fragmentów, ponieważ żaden z wykrywalnych alleli nie przekracza długości 150 bp. Wadą ShoP-PCR jest stosunkowo niewielka siła dyskryminacji – $1:3,16 \times 10^4$, ponieważ widoczne są tylko 4 autosomalne *loci*. Dla porównania, siły dyskryminacji dla systemu SGMplus™ ($1:3,3 \times 10^{12}$) i systemu PowerPlex 16 ($1:1,83 \times 10^{17}$) są o rząd wielkości wyższe. Tak więc zestawy komercyjne okazują się lepsze, kiedy dysponuje się wystarczającą ilością niezdegradowanego DNA.

przechowywane w formalinie, dla których z wykorzystaniem zestawu SGMplus™ albo PowerPlex 16 System™ otrzymywano tylko do dwóch *loci*. Włosy w fazie telogenu to materiał często zabezpieczany na miejscach przestępstw. DNA znajdujące się w keratynie włosa jest znacznie zdegradowane, a analiza DNA ze zgubionych włosów bez cebulek często nie daje żadnych wyników. Z pojedynczego włosa telegonowego zabezpieczonego na odzieży ofiary autorzy otrzymali pełny profil (tab. 3).

DNA ekstrahowane z ludzkich kości pogrzebanych w glebie albo znalezionych w wilgotnym środowisku jest zazwyczaj w dużym stopniu zdegradowane. Przy badaniu DNA ekstrahowanego z kości ofiar katastrof lotniczych zaobserwowano, że wypadanie alleli albo *loci* zachodzi wówczas, gdy allele są dłuższe niż 200 bp. Jak wykazano dla kości pogrzebanych w ziemi (przypadek 2), metoda ShoP-PCR daje dobre wyniki ze względu na niewielkie rozmiary docelowych fragmentów. Zabezpieczenie formaliną indukuje degradację DNA, nawet jeżeli proces utrwalania trwał tylko 3 godziny. Rutynowo czas działania formaliny to co najmniej 2 dni w zbuforowanej albo niezbuforowanej formalinie, przed zatopieniem w parafinie. Z tkanki przechowywanej przez 15 lat, utrwalonej formaliną i zatopionej w parafinie (przypadek 8), otrzymano pełny profil DNA, dlatego ta technika PCR jest użyteczna wtedy, gdy dostępny jest wyłącznie materiał zatopiony w formalinie, często przechowywany przez dziesiątki lat.

Wnioski

Omawiany system umożliwia skuteczne przeprowadzenie analizy DNA w przypadkach, w których dysponuje się ilością DNA większą niż 12,5 pg albo gdy materiał jest znacznie zdegradowany. ShoP-PCR jest bardzo użyteczny w typowaniu włosów w fazie telogenu, tkanki w znacznym stopniu rozkładu albo tkanki, która przez dłuższy czas była pod działaniem formaliny. Opracowanie nowych par primerów i ich połączenie w multipleksie PCR daje lepsze wyniki, kiedy zachodzi wypadanie alleli z powodu degradacji DNA albo mutacji

miejsc przyłączania primerów. Dla dobra badań kryminalistycznych warto dysponować wieloma różnymi *loci* multipleksowych miniSTR.

oprac. Ewa Nogacka

Tabela 3

Wyniki oznaczania DNA dla ośmiu różnych śladów kryminalistycznych

Próbka	Materiał	Wiek	ShoP	Systemy komercyjne
1.	Włosy w fazie telogenu	2 lata	5/5	0/5
2.	Kość	7 lat	3/5	0/5
3.	Powłoczka	2 lata	3/5	1/5
4.	Pieluszka	7 dni	5/5	0/5
5.	Dywan	nieznany	5/5	0/5
6.	Znaczek	6 miesięcy	4/5	0/5
7.	Niedopałek papierosa	nieznany	5/5	2/5
8.	Tkanka zatopiona w parafinie	15 lat	4/5	2/5

Ponieważ celem badań było zaprezentowanie PCR przydatnego dla zdegradowanego materiału w śladach kryminalistycznych, przetestowano ShoP-PCR na zestawie próbek kryminalistycznych, takich jak włosy w fazie telogenu, kości pogrzebane w ziemi albo tkanki