Analiza 10 loci zestawu SGM Plus w próbce populacyjnej Małopolski

W badaniach genetycznych na potrzeby organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości istotne znaczenie ma uzyskanie maksymalnej informacji o dawcy śladu biologicznego z niewielkiej ilości zabezpieczonego materiału dowodowego. Reakcja multiplex PCR umożliwia jednoczesne oznaczenie od kilku do kilkunastu alleli w badanej próbce. Znakowanie fluorescencyjne z wielokrotną detekcją umożliwia oznaczenie loci, których allele mieszczą się w tych samych przedziałach wielkości [6]. Zastosowanie zautomatyzowanej analizy produktów PCR pozwala na osiągnięcie wysokiej wydajności analizowanych próbek DNA [13]. Reakcje multipleksowe i automatyczna analiza produktów PCR skracają czas badań i obniżają koszty ich przeprowadzenia. Problemem jest optymalizacja parametrów amplifikacji w celu uzyskania maksymalnej ilości specyficznej sekwencji DNA przy jednoczesnym zminimalizowaniu niespecyficznych produktów reakcji PCR. Szczególnie ważne jest, aby startery dla jednego locus nie tworzyły kompleksów ze starterami dla innych locus całkowicie blokując reakcje amplifikacji. Powyższa sytuacja może powodować wypadanie (dropout) alleli niektórych STR loci. Prowadzić to może do błędnej interpretacji otrzymanych wyników badań [6, 18]. Należy podkreślić, że mimo tych mankamentów multiplex PCR jest rutynowo stosowany w laboratoriach genetycznych zajmujących się badaniami śladów biologicznych do celów identyfikacji osobniczej [11]. Dekaplex AGH Plus jest powszechnie stosowany ze względu na zrównoważenie proporcji starterów, co ogranicza możliwość popełnienia wyżej wymienionych błędów. Niniejsza praca przedstawia wyniki badań częstości alleli 10 loci typu STR przy zastosowaniu zestawu AmpFISTR SGM Plus System firmy Applied Biosystems w próbce populacji Małopolski.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano 163 próbki krwi pobrane na EDTA od niespokrewnionych osób obojga płci z terenu Małopolski i nadesłane jako materiał porównawczy do ekspertyz kryminalistycznych zleconych do wykonania w pracowni biologicznej Laboratorium Kryminalistycznego KWP w Krakowie.

DNA izolowano dwiema metodami: przy użyciu Chelex'u [19] lub ekstrakcji fenolowo-chloroformowej [20]. Jakość i ilość DNA oceniano spektrofotometrycznie. Reakcje multipleks PCR przy użyciu termocyklera „GenAmp PCR System 9600" i zestawu AmpFISTR SGM Plus (Applera, USA) prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Zastosowany dekapleks zawiera odczynniki potrzebne do amplifikacji następujących loci: D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA i amelogeniny. Wielkość produktów reakcji PCR badano metodą elektroforezy w denaturujących żelach poliakrylamidowych na aparacie ABI 377. Ocenę położenia i wielkości fragmentów badanego DNA oraz określenia alleli występujących w badanych loci analizowano porównując z zestawem standardów „AmpF STR SGM Plus Allelic Ladder" za pomocą programu komputerowego GeneScan Analysis v. 3.1.2 i Genotyper 2.5 [1]. Badania przeprowadzono w obecności kontroli dodatniej (DNA o znanym fenotypie) i kontroli ujemnej (próba odczynnikowa) otrzymując prawidłowe dla nich wyniki.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej: zgodność z prawem Hardy-Weinberga badano stosując test dokładny Guo i Thomsona [4] przy użyciu oprogramowania Arlequin v. 1.1 [14], stopień zróżnicowania genowego obliczano według Nei [10], współczynnik informacji o polimorfizmie (Polymorphism Information Content, PIC) według Botsteina i wsp. [2], typowy indeks ojcostwa (Typical Paternity Index, TPI) według Brennera i Morrisa [3], prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (Matching Probability, MP) i siłę dyskryminacji (Discrimination Power, DP) według Jonesa [7]. W obliczeniach parametrów przydatności w badaniach medyczno-sądowych wykorzystano arkusz kalkulacyjny PowerStats v1.2 (Promega Corp.) [16]. Porównania międzypopulacyjne wykonano z użyciem testu RxC (G. Carmody, Ottawa, Kanada).

Wyniki i dyskusja

Rozkłady częstości alleli 10 loci STR w próbce populacji Małpolski przedstawiono w tabeli 1. Liczba oznaczonych alleli w poszczególnych loci była różna. Największą liczbę alleli wykazano w locus FGA (15 alleli), najmniejszą w loci VWA i TH01 (7 alleli). W locus D18S51 i D19S433 wykazano po 14 alleli. Uzyskane wyniki różnią się od otrzymanych przez Turowską i wsp. [17] oraz Kozioła i wsp. [8]. W locus D3S1358, D16S51 i FGA obserwowano większą liczbę rzadziej

Tabela 1

Częstości alleli 10 loci w populacji Małopolski

Allelic frequency of 10 loci in population of Małopolska region

Allele	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
6									0,221	
7									0,123	
8			0,021		0,015				0,089	
9			0,098		-				0,236	
9.3			-		-				0,316	
10			0,034		0,049		0,009	0,003	0,006	
11	0,003		0,295		0,083		0,003	0,006	0,009	
12	-		0,307		0,157		0,092	0,080		
12.2	-		-		-		-	0,003		
13	0,006		0,199		0,384		0,098	0,280		
13.2	-		-		-		-	-		
14	0,145	0,117	0,043		0,202		0,169	0,294		0,00
14.2	-	-	-		-		-	0,012		
15	0,288	0,067	0,003		0,098		0,135	0,164		-
15.2	-	-			-		-	0,049		-
16	0,222	0,175		0,034	0,003		0,169	0,067		-
16.2	-	-		-	-		-	0,021		-
17	0,176	0,273		0,248	0,009		0,126	0,003		-
17.2	-	-		-			-	0,009		-
18	0,157	0,245		0,104			0,110	-		0,015
18,2	-							0,009		-
19	0,003	0,117		0,135			0,043			0,071
20		0,006		0,132			0,028			0,132
20.2				-			-			-
21				0,031			0,012			0,218
21.2				-			-			0,003
22				0,018			0,003			0,193
22.2				-			-			0,015
23				0,083			0,003			0,120
23.2				-			-			0,006
24				0,089			-			0,101
24.2				-			-			0,003
25				0,095			-			0,080
26				0,031			-			0,034
27						0,031	-			0,006
28						0,199	-			-
28.2						0,025	-			
29						0,227	-			-
29.2						0,009	-			-
30						0,187	-			-
30.2						0,058	-			-
31						0,077	-			-
31.2						0,058	-			-
32						0,031	-			-
32.2						0,061	-			-
33						0,003	-			-
33.2						0,031	-			-
34.2						0,003				-

pojawiających się alleli (z częstością 0,003). W populacji Polski Północnej podobne wyniki uzyskała Szczerkowska i wsp [15]. Dla wszystkich loci stwierdzono zgodność z prawem Hardy-Weinberga. Porównanie homogenności rozkładów alleli przy użyciu tabeli kontyngencji RxC wykazało istotne statystycznie różnice ($p< 0,05$) między populacją Małopolski a populacją Polski Południowo-Wschodniej w układzie D3S1358, populacją Podlasia w układach FGA i D21S11, populacją Polski Centralnej w układach FGA i D19S433 (tabela 2).

Obliczone wartości PD zawierają się w zakresie od 0,89 (TH021) do 0,966 (D18S51), a MP w zakresie od

Tabela 2

Porównanie homogenności rozkładów allel[illegible] SGM Plus

Comparison of homogenity of allelic distributions in SGM Plus loci

	Młp. x P-W [8]				Młp. x P [12]				Młp. x PC [9]			
	χ^2	P1	G statistic	P2	χ^2	P1	G statistic	P2	χ^2	P1	G statistic	P2
D3S1358	10,9185	0,0380 ±0,0060	10,9274	0,0440 ±0,0065	5,1147	0,4170 ±0,0156	5,4429	0,3840 ±0,0154	6,2406	0,2710 ±0,0141	6,3633	0,2900 ±0,0143
VWA	3,2149	0,7870 ±0,0129	3,4607	0,7800 ±0,0131	12,8306	0,650 ±0,0078	13,8967	0,550 ±0,0072	2,6352	0,8660 ±0,0108	2,4823	0,9100 ±0,0090
D16S539	12,0500	0,0910 ±0,0009	13,6575	0,660 ±0,0079	12,7882	0,0820 ±0,0087	12,5446	0,1090 ±0,0099	6,8983	0,4570 ±0,0158	6,7031	0,5280 ±0,0158
D19S433	Brak danych	Brak danych	Brak danych	Brak danych	15,7274	0,3970 ±0,0155	18,7439	0,3160 ±0,0147	28,5954	0,090 ±0,0030	28,4964	0,0190 ±0,0043
D18S51	13,2936	0,3670 ±0,0152	12,1377	0,4970 ±0,0158	8,9427	0,7348 ±0,0148	9,1629	0,7440 ±0,0138	11,800	0,5386 ±0,0158	12,2125	0,5660 ±0,0157
FGA	18,5216	0,0430 ±0,0064	16,9253	0,0930 ±0,0092	27,9024	0,0020 ±0,0014	31,3562	0,0020 ±0,0014	19,4069	0,0370 ±0,0060	20,4351	0,0390 ±0,0061
D2S1338	Brak danych	Brak danych	Brak danych	Brak danych	12,0096	0,2910 ±0,0144	11,3892	0,3440 ±0,0150	8,0279	0,6170 ±0,0154	7,9794	0,6360 ±0,0152
D18S1179	4,2741	0,9060 ±0,0042	5,0670	0,8440 ±0,0115	10,5372	0,3010 ±0,0145	11,5724	0,2750 ±0,0141	1,9760	0,9930 ±0,0026	1,9708	0,9930 ±0,0026
D21S11	8,2448	0,7610 ±0,0135	8,4148	0,800 ±0,0126	43,1913	0,0000 ±0,0010	38,3923	0,0000 ±0,0014	11,6256	0,4670 ±0,0150	11,7954	0,5510 ±0,0157
TH01	8,8585	0,2050 ±0,0128	5,1391	0,5100 ±0,0158	6,0911	0,4370 ±0,0157	5,2487	0,5570 ±0,0157	4,7251	0,6080 ±0,0154	3,8841	0,7550 ±0,0154

Młp. – Małopolska, PP-W – Polska Południowo-Wschodnia, P – Podlasie, PC – Polska Centralna, 2 – test chi-kwadrat, G – G-statystyka, P– prawdopodobieństwo

Tabela 3

Statystyczne parametry przydatności 10 loci zestawu SGM Plus do badań kryminalistycznych i medyczno-sądowych

Statistical feasibility parameters of 10 SGM Plus loci to forensic and medicolegal examinations

	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
He	0,7945	0,8045	0,8672	0,8672	0,7700	0,8441	0,8786	0,8066	0,7730	0,8646
Ho	0,7730	0,7975	0,8650	0,8650	0,7852	0,8282	0,8527	0,7975	0,8036	0,8774
PIC	0,76	0,77	0,73	0,85	0,74	0,85	0,034	0,77	0,74	0,84
PD	0,922	0,930	0,910	0,959	0,915	0,959	0,966	0,927	0,890	0,960
TPI	2,19	2,40	1,90	4,08	2,40	4,08	3,26	2,47	3,13	3,70
PE	0,547	0,583	0,486	0,749	0,583	0,749	0,688	0,594	0,676	0,725
MP	0,078	0,070	0,090	0,041	0,085	0,041	0,034	0,073	0,110	0,040
P	0,,6056	0,7640	0,4912	0,4984	0,7375	0,6475	0,1412	0,2678	[illegible]	0,1346

Objaśnienia: He (heteryzygotyczność oczekiwana), Ho (heterozygotyczność obserwowana), PIC (wskaźnik informatywności polimorfizmie), PD (siła dyskryminacji), TPI (typowy indeks ojcostwa), PE (siła wykluczania), MP (prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności), P (prawdopodobieństwo: exact test).

0,034 (D18S51) do 0,090 (D16S539) – tabela 3. Pozostałe parametry statystyczne (PIC, TPI, PE, P) wskazują również na wysoką przydatność tego zestawu w badaniach na potrzeby organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości.

Wnioski

1. Obserwowany rozkład częstości genotypów analizowanych loci populacji Małopolski jest zgodny z prawem Hardy-Weinberga.
2. Obliczone parametry statystyczne wskazują na dużą przydatność zestawu SGM Plus w badaniach kryminalistycznych.

Ewa Sadowska
Marek Lech
Ireneusz Sołtyszewski

BIBLIOGRAFIA

1. **Bar W., Brinkman B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W., Olaisen B.:** DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the IFSH regarding the use of short tandem repeat systems, „ International Journal of Legal Medicine" 1997, 110, s. 175–176.

2. **Botstein D, White R., L., Skolnick M, Davies RW.:** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, „Am Journal Human Genetics" 1980; 32: 314–331.

3. **Brenner C, Morris J., W.:** Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes validation and other studies. Proceedings from International Symposium of Human Identification. Promega Corporation Madison WI 1989, 21–53.

4. **Guo SW., Thomson EA.:** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles, „Biometrics" 1992; 48: 361–72.

5. **Hammond H.A., Jin L., Zhong Y., Caskey C.T., Chakraborty R.:** Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications, „Am Journal Human Genetics" 1994; 55: 175–89. 11.

6. **Holt C.L., Stauffer C., Wallin J. M., Lazaruk K.D., Nguyen T., Budowle B., Walsh P.S.:** Practical applications of genotypic surveys for forensic STR testing, „Forensic Science International" 2000, 112, 91–109.

7. **Jones D.A.:** Blood samples: probabilities of discrimination, „Journal of Forensic Science Society" 1972; 12: 355–359.

8. **Kozioł P., Ciesielka M., Mądro R., Krajka A.:** Genetic data of 19 STR loci in south-east Poland, „Forensic Science International" 2004, 139, 89–92.

9. **Kuźniar P., Sołtyszewski I., Płoski R.:** Population genetics of 10 STR loci in a population of Central Poland, „Forensic Science International" 2002, 130, 55–57.

10. **Nei K.M.:** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, „Genetics" 1978; 89: 583–590.

11. **Parson W, Steinlechner M:** Efficient DNA database laboratory strategy for high throughput STR typing of reference samples, „Forensic Sci Int" 2001; 22: 1–6.

12. **Pepiński W., Janica J., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A., Sołtyszewski I.:** Population genetics of 15 STR loci in the population of Podlasie (NE Poland), „Forensic Science International" 2001, 124, 226–227.

13. **Ricci U., Sani I., Guarducci S. et al:** Infrared fluorescent automated detection of thirteen short tandem repeat polymorphisms and one gender-determining

system of the CODIS core system, „Electrophoresis" 2000; 21: 3564–70.

14. **Schneider S., Kueffer JM., Roessli D., Excoffier L.:** Arlequin (ver. 1.0) a software environment for the analysis of population genetics data. Genetics and Biometry Lab, University of Geneva, Switzerland, 1997.

15. **Szczerkowska Z., Wysocka J., Cybulska L.:** Genetyczna zmienność w obrębie 14. loci typu VNTR w populacji Polski Północnej, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii" 2001, tom 51, nr 3, 227–2[illegible].

16. **Tereba A:** Tools for Analysis of Population Statistics. Profiles in DNA, 1999; 3 Promega Corporation (www.promega.com/geneticidtools/powerstats/).

17. **Turowska B., Sanak M., Opolska-Bogusz B.:** Wstępne badania populacji Polski Południowej w zakresie 10 STR loci z zestawu AmpFister SGM Plus, „Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii" 2001, LI, 93–96.

18. **Urquhart A., Oldroyd N.J., Kimpton C.P., Gill P.:** Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification, „Biotechniques" 1995; 18: 116–121.

19. **Walsh P.S., Metzer D.A. and Higuchi R.:** ChelexR100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, „Biotechniques" 1991, 10, 506–513.

20. **Wiegand P., Schurenkamp M., Schuttle U.:** DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis, „International Journal Legal of Medicine" 1992, 104, 359–360.

Przyczynek do rozpoznania cech produkcyjnych obuwia formowanego

Cechy fabryczne nowych spodów obuwia to obszar wiedzy traseologicznej, który dotychczas nie został należycie zbadany ani opisany. Jak dotąd, nikt na świecie nie podjął się próby kompleksowego opisania tych cech, ich sklasyfikowania, ustalenia etapów produkcyjnych, na których powstają. W dotychczasowych opracowaniach docierających do ekspertów traseologii znajdowały się jedynie wzmianki o tego typu cechach i konieczności podjęcia prób jednolitego ujęcia tematu. Były to doniesienia o zaledwie kilku wybranych cechach produkcyjnych. W Polsce do lat osiemdziesiątych badania porównawcze śladów obuwia koncentrowały się przede wszystkim na analizie użytkowych cech grupowych i indywidualnych. Sporadycznie wykorzystywano indywidualizujące cechy użytkowe, a jeszcze rzadziej – cechy produkcyjne. Powodem takiego stanu rzeczy była niewystarczająca wiedza ekspertów na temat metod produkcyjnych konkretnego typu obuwia, a tym samym cech identyfikacyjnych powstających w procesie produkcji.

Wiele cech produkcyjnych to cechy grupowe charakteryzujące wszystkie egzemplarze obuwia wytworzonego w tym samym rozmiarze, fasonie i kompozycji wzorniczej podeszwy. Znaczną część takich spodów charakteryzują zróżnicowania powstałe podczas kolejnych etapów procesu produkcyjnego. Przypadkowość niektórych cech może być tak duża, że obuwie nabiera indywidualnych cech jeszcze przed jego faktycznym użytkowaniem. Problem polega na znalezieniu takich cech, ich rozróżnieniu i określeniu wartości identyfikacyjnej. Bez odpowiedniej wiedzy na temat metod produkcji jest to niemożliwe.

Dlatego też elementem badań porównawczych wkomponowanym na stałe w „warsztat" eksperta powinna być analiza technologii produkcji i cech typowych dla poszczególnych metod, o ile oczywiście wartość informacyjna śladu na to pozwoli[1].

Niniejsza publikacja ma na celu przedstawienie aktualnie stosowanych w Polsce metod produkcji obuwia formowanego, prezentację wybranych cech produkcyjnych, powstałych na kolejnych etapach produkcji obuwia oraz określenie ich wartości identyfikacyjnych, a więc próbę klasyfikacji.

Treści merytoryczne dotyczą w pierwszej kolejności hasłowo podanych spraw ogólnych: między innymi powstawania projektu wzorniczego (i szkolnictwa w tym zakresie), tworzenia form i ochrony prawnej zaprojektowanej ornamentacji graficznej podeszwy, piractwa wzorniczego itp. W części szczegółowej skoncentrowano się na analizie kolejnych etapów produkcji, traktując je jako źródło cech dystynktywnych.

Opracowanie należy traktować jako wprowadzenie do skomplikowanej problematyki cech produkcyjnych i inspirację do dalszych poszukiwań potwierdzających założenie o unikalnym charakterze każdej nowej pary obuwia jeszcze przed nabyciem dodatkowych cech w trakcie użytkowania.

Rodzaje technik produkcyjnych

O podstawowych rodzajach wyrobu spodów w literaturze fachowej powiedziano już wiele. William J. Bodziak wyróżnia podeszwy, które przed uzyskaniem ostatecznego roz-