

Jadwiga Kabiesz, Kornelia Droździok

Przydatność oznaczeń polimorfizmu DNA w zakresie PM i DQA1 w śladach biologicznych

Use of DNA polymorphism in the range of PM and DQA1 in biological traces

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Śl. AM w Katowicach
p.o. Kierownik: prof. dr hab. H. Sybirska

W pracy przedstawiono trzy przypadki: w dwóch skąpy materiał dowodowy stanowiły włosy, w jednym tkanka ludzka i ślad krwi. Badanie polimorfizmu DNA w zakresie LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC i DQA1 umożliwiło identyfikację śladów i wydanie jednoznacznych opinii.

In this paper 3 cases have been described, the evidence was hair in 2 cases and a blood spot and human tissue in 1 case. Determination of DNA polymorphism in the range of LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC and DQA1 allowed to identify biological traces. DNA polymorphism was examined by amplification and hybridization with Perkin Elmers reagents. DNA amplified was hybridized with ASO in the reverse dot-blot test. Perkin Elmers thermocycler (GeneAmp system 2400) was used for DNA amplification.

WSTĘP

W ostatnich latach wykryto wiele polimorficznych loci, które można oznaczać za pomocą techniki PCR. Pozwala ona identyfikować ślady biologiczne wówczas, gdy niewielka ilość materiału biologicznego jest niewystarczająca do przeprowadzenia badań klasycznych (1, 4).

Do polimorficznych loci DNA należą: DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 i GC. Geny układu HLA DQA1 zlokalizowane są na krótszym ramieniu chromosomu 6 (2, 6).

POLYMAKER obejmuje 5 niezależnych markerów genetycznych położonych na różnych chromosomach: LDLR – chromosom 19, GYPA – chromosom 4, HBGG – chromosom 11, D7S8 – chromosom 7, GC – chromosom 4 – łącznie 12 alleli umożliwiających wystąpienie 78 genotypów (3, 5).

W locus DQA1 oznaczono 7 alleli: 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4.1 i 4.2 lub 4.3. Warunkuje to występowanie 28 genotypów (7, 8). Łącznie oba układy DQA1 i PM (19 alleli) dają możliwość identyfikacji 190 genotypów. Pozwala to w istotnym stopniu poszerzyć możliwości identyfikacyjne dotyczące różnicowania osobniczego, co ma bardzo istotne znaczenie również w badaniach śladów biologicznych.

MATERIAŁY I METODY

1. Przypadek I.

Do sprawy włamania dostarczono materiał dowodowy w postaci włosów przyklejonych do taśmy. Z sześciu cebulek włosowych wyizolowano DNA i oznaczono PM.

Materiał porównawczy stanowiły włosy pobrane od podejrzanego. Wcześniejsze badanie makro- i mikroskopowe wykonane w laboratorium terenowym policji wykazało duże podobieństwo włosów dowodowych do porównawczych pobranych od podejrzanego, jednak badanie to nie dało kategoriycznej odpowiedzi na podstawowe pytania prokuratora, co do cech identyfikacyjnych.

2. Przypadek II.

Materiałem dowodowym w sprawie zabójstwa kobiety, był tylko jeden włos zabezpieczony na łóżku obok denatki. Z notatki zamieszczonej w zleceniu wynikało, iż w zdarzeniu uczestniczyły cztery osoby – dwie pokrzywdzone: denatka i jej siostra oraz dwie osoby podejrzone.

Materiałem porównawczym były włosy pobrane od denatki, oraz od trzech osób biorących udział w zdarzeniu (podejrzaany 1 i podejrzaany 2 oraz siostra denatki – pokrzywdzona). Dowodowy włos długości 5 cm (oceniony przez nas makro- i mikroskopowo jako włos łonowy) nie nadawał się do oceny serologicznej ze względu na nieodpowiednią długość.

3. Przypadek III.

Dostarczony materiał dowodowy stanowiły znikomy ślad krwi na bibule oraz biaława zasuszona substancja (tkanka ludzka) zabezpieczone z wewnętrznej części prawych przednich drzwi samochodu. Sprawa dotyczyła wypadku drogowego, w którym uczestniczyły dwie osoby, z których jedna poniosła śmierć. Materiałem porównawczym były krew denata i drugiego uczestnika wypadku (opisana jako krew Z.O.). Badanie miało wyjaśnić od którego z uczestników

wypadku pochodziły ślady, zaś dodatkowo miało umożliwić udzielenie odpowiedzi na pytanie kto siedział na miejscu pasażera, a kto na miejscu kierowcy. W materiale dowodowym i porównawczym oznaczono jedynie PM.

Ślad krwi poddano badaniu na obecność barwnika hemowego krwi (metodą spektroskopową) oraz na obecność białka ludzkiego (metodą immunoprecypitacyjną). Białawą substancję (przypadek III) badano na obecność białka ludzkiego metodą immunoprecypitacyjną.

We wszystkich trzech ekspertyzach izolację DNA z włosów, tkanki oraz krwi przeprowadzono przy użyciu zestawu do izolacji firmy A&A Biotechnology. Badanie polimorfizmu DNA wykonano techniką amplifikacji i hybrydyzacji stosując zestaw odczynników firmy Perkin Elmer. Zampifikowane DNA hybrydyzowano z sondami oligonukleotydowymi (ASO) w teście reverse dot-blot. Do amplifikacji DNA użyto Termocycler firmy Perkin Elmer typu GeneAmp system 2400.

WYNIKI BADAŃ

Tabela I. Wyniki badań polimorfizmu DNA w zakresie PM dla przypadku I.

Table I. Examination results of DNA polymorphism in the PM range for case I.

Materiał badany Material examined	Locus LDLR	Locus GYPA	Locus HBGG	Locus D7S8	Locus GC
Włos dowodowy 1 Evidential hair 1	AB	AA	BB	AA	BC
Włos dowodowy 2 Evidential hair 2	AB	AA	BB	AA	BC
Włos dowodowy 3 Evidential hair 3	AB	AA	BB	AA	BC
Włos dowodowy 4 Evidential hair 4	AB	AA	BB	AA	BC
Włos dowodowy 5 Evidential hair 5	AB	AA	BB	AA	BC
Włos dowodowy 6 Evidential hair 6	AB	AA	BB	AA	BC
Włos porównawczy Comparative hair	AA	BB	AB	AB	AC

Tabela II. Wyniki badań polimorfizmu DNA w zakresie PM i DQA1 dla przypadku II.
Table II. Examination results of DNA polymorphism in the PM and DQA1 range for case II.

Materiał badany Material examined	Locus LDLR	Locus GYPA	Locus HBGG	Locus D7S8	Locus GC	Locus DQA1
Włos dowodowy Evidential hair	BB	AB	AA	AA	CC	1.2; 1.3
Włos porównawczy denatki Comparative hair of deceased	AB	AA	AB	AB	AC	1.1;4.2 lub 4.3
Włos porównawczy pokrzywdzonej Comparative hair of victim	BB	AA	AB	AB	BC	1.1;4.2 lub 4.3
Włos podejrzanego 1 Hair of the suspected 1	BB	AB	AA	AA	CC	1.2;1.3
Włos podejrzanego 2 Hair of the suspected 2	BB	AB	AB	AB	BC	1.2;4.1

Tabela III. Wyniki badań polimorfizmu DNA w zakresie PM dla przypadku III.
Table III. Examination results of DNA polymorphism in the PM range for case III.

Materiał badany Material examined	Locus LDLR	Locus GYPA	Locus HBGG	Locus D7S8	Locus GC
Tkanka Tissue	BB	AA	AB	AA	CC
Ślad krwi Blood trace	BB	AA	AB	AA	CC
Krew denata Blood of the deceased	BB	AA	AB	AA	CC
Krew Z.O. Blood Z.O.	AB	AB	BB	AB	AC

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W pierwszym przypadku analiza polimorfizmu DNA we wszystkich sześciu włosach dowodowych oznaczonych numerami 1, 2, 3, 4, 5 i 6 dała następujące wyniki: LDLR AB, GYPA AA, HBGG BB, D7S8 AA, GC BC, zaś we włosach porównawczych, pobranych od podejrzanego LDLR AA, GYPA BB, HBGG AB, D7S8 AB, GC AC. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na jednoznaczne stwierdzenie, iż włosy dowodowe nie mogą pochodzić od podejrzanego (tabela I).

W przypadku drugim przeprowadzone badania polimorfizmu DNA zabezpieczonego jedynego włosa dowodowego oraz włosów podejrzanego nr 1 w zakresie – LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC, DQA1 były identyczne (tabela II), co wskazywało że nie można wykluczyć, iż włos dowodowy pochodził od tegoż podejrzanego. Wyniki badań pozostałych włosów porównawczych – tj. włosów denatki, włosów pokrzywdzonej oraz podejrzanego nr 2 różniły się znacznie od wyników badań włosa dowodowego, co pozwalało na stwierdzenie, że włos dowodowy nie pochodził od denatki ani od drugiej osoby pokrzywdzonej (siostry), jak również od podejrzanego nr 2.

W przypadku trzecim zabezpieczone ślady z wewnętrznej strony prawych przednich drzwi samochodu, to jest zarówno ślad krwi, jak i ślad tkanki, oraz krew denata – w analizie polimorfizmu DNA dały następujące wyniki: LDLR BB, GYPA AA, HBGG AB, D7S8 AA, GC CC. Takie wyniki badań wskazywały, iż ślady te mogły pochodzić od denata. We krwi pobranej od Z.O. uzyskano następujący genotyp: LDLR AB, GYPA AB, HBGG BB, D7S8 AB i GC AC. Rezultat ten był różny we wszystkich badanych loci w obrębie POLYMARKERA, co pozwalało na stwierdzenie, iż ślady te na pewno nie pochodziły od Z.O. (tabela III).

Przytoczone powyżej opisy przypadków wskazują na dużą przydatność określania polimorfizmu DNA w różnych śladach biologicznych. Wyniki badań we wszystkich trzech przypadkach pozwoliły udzielić pełnej odpowiedzi na pytania prokuratora. Wykonanie analizy polimorfizmu DNA umożliwiło w pierwszym przypadku wykluczyć osobę podejrzaną. Osoba ta we wcześniejszych badaniach makro- i mikroskopowych z uwagi na duże podobieństwa włosów porównawczych i dowodowych nie została wykluczona.

W przypadkach gdy rodzaj zabezpieczonego materiału, a także jego ilość nie pozwala na identyfikację osobniczą metodami serologii klasycznej, określanie markerów genetycznych technikami PCR okazuje się bardzo przydatne, czy wręcz niezbędne.

PIŚMIENICTWO

1. Andersen L., Juhl M., Solheim T., Borrmann H.: Odontological identification of fire victims – potentialities and limitations. *Int. J. Legal Med.*, 1996, 108, 5, 280–282.
- 2. Dmochowska G.: Częstość alleli i genotypów HLA DQ alfa w badanej próbie populacji polskiej. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1994, 44, 4, 405–407.
- 3. Hausmann R., Hantschee M., Lotterle J.: Frequencies of the PCR-based genetic markers LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, and GC in a north Bavarian population. *Int.*

J. Legal Med., 1995, 107, 4, 227–228. –4. Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A.: 1988 DNA typing from single hairs. *Nature*, 332, 543–546. –5. Kloosterman A.D., Sijerps M., Wust D.: Dutch Caucasian population data on the loci LDRL, GYPA, HBG, D7S8, and GC. *Int. J. Legal Med.*, 1995, 108, 1, 36–38. –6. Tucholska A., Suszczewski W., Wujec J., Miąskiewicz H.: Analiza locus HLA DQ alpha w identyfikacji kryminalistycznych śladów biologicznych. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1994, 1, 117–119. –7. Tucholska-Lenart A., Miąskiewicz H., Suszczewski W., Wujec J.: Badania częstotliwości występowania genotypów HLA locus DQA1 w populacji warszawskiej. *Problemy Kryminalistyki*, 1994, 206, 14–16. –8. Turowska B., M. Sanak, L. Nowicka, B. Tarajko: Polimorfizm locus HLA DQA1 w populacji Polski Południowej. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1996, 46, 4, 261–268.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Śl. AM w Katowicach

40–752 Katowice

ul. Medyków 18