

# Анализа микросателитских маркера *D18S70* и *D20S116* на ДНК изолованој из дентина: примена у форензичкој медицини

Драгана Пузовић<sup>1</sup>, Бранка Поповић<sup>2</sup>, Ивана Новаковић<sup>3</sup>, Јелена Милашин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт за судску медицину, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

<sup>2</sup>Институт за хуману генетику, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

<sup>3</sup>Институт за хуману генетику, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија

## КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Генетичке анализе хиперваријабилних генских локуса из групе микросателита изолованих из различитог биолошког материјала људског ткива налазе своју практичну примену у форензичкој пракси у сврху идентификације, утврђивања спорног родитељства и сродничких односа.

**Циљ рада** Циљ рада је био да се испита учесталост алела микросателитских генских локуса *D18S70* и *D20S116* и утврди да ли се у нашој популацији налазе у Харди-Вајнберговој (*Hardy-Weinberg*) равнотежи. Такође су испитивани форензички параметри за наведене генетичке маркере: моћ дискриминације (*PD*), моћ искључења (*PE*), маркер информативности локуса, значајан маркер очинства и вероватноћа поклапања генотипова.

**Методе рада** У истраживању је као биолошки материјал људског порекла коришћено 70 екстрахованих зуба. Изолација ДНК из чврстог зубног ткива обављана је органском методом, након чега је утврђен протокол за *PCR* амплификацију испитиваних генских локуса. Производи *PCR* амплификације анализирани су вертикалном електрофорезом на дванаестопроцентном полиакриламидном гелу бојеном етидијум-бромидом, после чега су анализирани генотипови. Статистичка обрада наведених форензичких параметара вршена је применом програма *Cervus*.

**Резултати** Учесталости појединих алела и генотипова за анализираних генских локуса статистички су обрађене и утврђено је да се налазе у Харди-Вајнберговој равнотежи. Маркер *D18S70* имао је шест алела, а *D20S116* осам алела. *PD* и *PE* за *D18S70* били су 0,92, односно 0,41, а за *D20S116* 0,95, односно 0,48.

**Закључак** *STR* локуси *D18S70* и *D20S116* су се показали врло информативним маркерима. С обзиром на број и учесталост алела, као и вредности кључних форензичких параметара, ови микросателити су погодни за употребу у форензичке сврхе у нашој популацији, односно могуће их је применити у откривању и анализи спорног родитељства.

**Кључне речи:** *STR* полиморфизми; *D18S70*; *D20S116*; форензичка медицина

## УВОД

Резултати недавно завршеног истраживања структуре људског генома показују да геном човека чини око три милијарде базних парова у око 30.000 гена по хаплоидном сету. Иако одређују сва наследна својства једног организма, гени чине свега 10-15% од укупног генома. Преостали, већи део хуманог генома (анонимна ДНК) није генетички активан, тј. не кодира протеине и РНК молекуле. Иако биолошки значај анонимне ДНК у највећој мери није разјашњен, може се рећи да представља наследни материјал подобан за генетичке анализе у форензичке сврхе [1].

У оквиру некодирајућих региона молекула ДНК, 75% представљају јединствене секвенце, док преосталих 25% чине секвенце које се понављају (репетитивне секвенце) [2, 3]. Делови ДНК с репетитивним секвенцама одређени су различитим бројем понављајућих јединица, а одликује их висок степен варијабилности између несродних особа. Прецизније речено, постоје у великом броју алелских облика и као такви врло су информативни за процес идентификације, утврђивање спорног родитељства и сродничких односа [4].

Различити број поновака у овим деловима ДНК означава се као полиморфизам броја узастопних поновака (енгл. *variable number of tandem repeats* –

*VNTR*) [5]. У зависности од дужине секвенце која се понавља, разликују се минисателитски и микросателитски маркер *VNTR*. Код минисателитских маркера дужина репетитивне секвенце је 10-100 базних парова, док је код микросателитских маркера, названих још и кратке тандемске репетитивне секвенце или *STR* (енгл. *short tandem repeats*) локуси, број репетитивних јединица између два и шест парова нуклеотида.

На основу резултата истраживања структуре људског генома процењено је да се било које две особе разликују просечно у сваком 1000. нуклеотиду, тј. укупно у по око три милиона нуклеотида, из чега проистиче да сваки припадник људске врсте има јединствену генетичку грађу (изузетак су једнојајчани близанци). Идентификација се заснива на тим разликама, тј. на утврђивању присуства одређених алела на појединим генским локусима. За утврђивање идентитета непознатих живих особа и непознатих лешева најинформативнији су генски локуси који, популационо гледано, постоје у највећем броју алелских облика, тј. који су најваријабилнији [6].

Енглески генетичар Алек Џефрис (*Alec Jeffreys*) први је још 1984. године у форензичке сврхе применио анализу наведених варијација у наследном материјалу особа. Дошао је на идеју да се генетске варијабле могу ефикасно и с апсолутном сигур-

ношћу користити за идентификацију људи. Да би што боље илустровао индивидуалну специфичност геномског отиска (тзв. ДНК фингерпринт), употребио је математички модел, доказујући немогућност биолошког понављања законом вероватноће. Истакао је да је вероватноћа да се иста генетска обележја понове код две особе које нису у сродничкој вези ( $4 \times 10^{-30}$ ). Међутим, ако је реч о особама које су у сродничкој вези (однос сродства у првом степену), онда је, с обзиром на то да се минисателитски региони наслеђују по Менделовим правилима, та вероватноћа  $3 \times 10^{-14}$ , што, као и у претходном случају, превазилази укупан број становника на Земљи. Самим тим искључена је могућност понављања истоветних наследних обележја, тј. може се говорити о индивидуалном генском отиску (ДНК фингерпринту) [7].

Управо на овим чињеницама темељи се увођење методе ДНК типизације из различитог биолошког материјала људског порекла (крв, пљувачка, сперма, длаке, зуби, кости) у форензичку праксу. Будућност анализе наследног материјала за потребе форензичке медицине значајно је одредило и откриће реакције ланчаног умножавања ДНК (енгл. *polymerase chain reaction* – PCR), којом се омогућава једноставно и брзо откривање различитости у наследном материјалу особа. Поменуто метода за добијање индивидуално специфичног отиска наследног материјала подразумева утврђивање присуства одређених алела на појединим генским локусима. Осим наведеног, да би STR локус био информативан за судскомедицинску праксу, мора да се у испитиваној популацији налази у Харди-Вајнберговој равнотежи. Генетичке анализе STR генских локуса који одступају од овог принципа, без обзира на њихову хиперваријабилност, не могу наћи своју примену у форензичкој медицини.

## ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да се утврди информативности генских локуса *D18S70* (111-126 bp) и *D20S116* (107-117 bp) из групе STR генетичких маркера за потребе форензичке медицине. Испитивана је њихова варијабилност, тј. у колико су алелских варијанти заступљени у нашој популацији, као и то да ли се налазе у Харди-Вајнберговој равнотежи. Циљ је такође био да се утврди вредност кључних форензичких параметара, као што су моћ дискриминације (PD) и моћ искључења (PE).

## МЕТОДЕ РАДА

У истраживању је као биолошки материјал људског порекла коришћено 70 екстрахованих зуба од несродних особа. Изолација геномске ДНК из чврстог зубног ткива (дентина) обављана је методом органске екстракције. PCR за амплификацију генског локуса *D18S70* извођена је у збирном волумену од 25  $\mu$ l: 14,5  $\mu$ l дестиловане воде, 4  $\mu$ l 25 mM *MgCl*<sub>2</sub>, 2,5  $\mu$ l 10 пута PCR пуфера

(без *MgCl*<sub>2</sub>), 1  $\mu$ l 10 mM *dNTP*, по 0,5  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l прајмера *RW* и *FW*, 0,1  $\mu$ l *Taq* полимеразе (1 U) и 2  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l геномске ДНК. Температурни профил PCR поступка за наведени генски локус подразумевао је следеће: корак почетне денатурације три минута на 94°C, 40 циклуса денатурације током 45 секунди на 94°C, хибридизације прајмера 45 секунди на 52°C и елонгације прајмера током 45 секунди на 72°C. Фаза финалне екстензије трајала је пет минута на 72°C. Након тога реакциона смеша је инкубирана на собној температури током 30 минута.

PCR протокол за амплификацију локуса *D20S116* подразумевао је извођење PCR у збирном волумену од 25  $\mu$ l: 15,5  $\mu$ l дестиловане воде, 3  $\mu$ l 25 mM *MgCl*<sub>2</sub>, 2,5  $\mu$ l 10 пута PCR пуфера (без *MgCl*<sub>2</sub>), 1  $\mu$ l 10 mM *dNTP*, по 0,5  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l прајмера *RW* и *FW*, 0,1  $\mu$ l *Taq* полимеразе (1 U) и 2  $\mu$ l 100 ng/ $\mu$ l геномске ДНК. Температурни профил PCR поступка подразумевао је следеће фазе: иницијалну денатурацију у трајању од три минута на 94°C, 35 циклуса денатурације током 45 секунди на 94°C, хибридизације прајмера током 45 секунди на 52°C и екстензије у трајању од 45 секунди на 72°C. Корак финалне екстензије трајао је пет минута на 72°C, након чега је реакциона смеша инкубирана на собној температури током 30 минута.

Успешност PCR амплификације наведених генских локуса проверавана је електрофорезом на осмопостотном полиакриламидном гелу у благо алкалном пуферу-1xTBE (*Tris-borat*, *EDTA pH 8,0*) на 200 V током 20-30 минута уз одговарајући ДНК стандард. Прецизно утврђивање дужине амплификованих фрагмената постигано је раздвајањем производа PCR електрофорезом на високопроцентном (12%) полиакриламидном гелу димензија 20x30 cm, у благо алкалном пуферу – 1xTBE (*Tris-borat*, *EDTA pH 8,0*) на 700 V у трајању од четири часа и накнадним бојењем етидијум-бромидом. Након бојења етидијум-бромидом и UV просветљавањем, вршена је анализа генотипова на појединим локусима, при чему су различити алелски облици маркера обележавани бројевима.

## РЕЗУЛТАТИ

Истраживања варијабилности анализираних генских локуса показали су да се у нашој популацији генетички маркер *D18S70* јавља у шест алелских облика. Алел 2 овог локуса чинио је 29% свих установљених алела. Забележена заступљеност осталих алела (1, 3, 4, 5 и 6) била је 4-23%, што говори у прилог високом степену варијабилности наведеног генетичког маркера. За локус *D20S116* утврђено је осам алела. Најчешћи алелски облик 3 чинило је 26% свих алела. Алелски облици 1, 2, 4, 5, 6, 7 и 8 били су заступљени у нашој популацији између 3% и 20%, што овај локус такође чини врло информативним. Резултати учесталости алела испитиваних генских локуса *D18S70* и *D20S116* приказани су у табелама 1 и 2. Статистичка обрада добијених резултата вршена је применом Фишеровог (*Fisher*) егзактног теста, који се примењује и на малом броју узорака.

**Табела 1.** Учесталост алела локуса *D18S70*  
**Table 1.** Frequency of alleles on locus *D18S70*

Алел Allele	Број особа Number of individuals	Хомозигот Homozygous	Хетерозигот Heterozygous	$\Sigma$	%
1	23	5	18	28	20.0
2	33	8	25	41	29.3
3	27	5	22	32	22.9
4	18	1	17	19	13.6
5	15	-	15	15	10.7
6	5	-	5	5	3.6

**Табела 2.** Учесталост алела локуса *D20S116*  
**Table 2.** Frequency of alleles on locus *D20S116*

Алел Allele	Број особа Number of individuals	Хомозигот Homozygous	Хетерозигот Heterozygous	$\Sigma$	%
1	23	5	18	28	20.0
2	19	4	15	23	16.4
3	31	6	25	37	26.4
4	19	-	19	19	13.6
5	14	3	11	17	12.1
6	7	1	6	8	5.7
7	4	-	4	4	2.9
8	4	-	4	4	2.9

Испитивани генски локуси у нашој популацији налазе се у Харди-Вајнберговој равнотежи, будући да је вредност Фишеровог егзактног теста за генски локус *D18S70* била је 0,2540, а за генетички маркер *D20S116* 0,5389.

Кључни форензички параметри моћ дискриминације (*PD*) и моћ искључења (*PE*) за *D18S70* били су 0,92, односно 0,41, док су за локус *D20S116* били 0,95, односно 0,480.

## ДИСКУСИЈА

*STR* локуси су за истраживаче који се баве форензичком медицином најзанимљивији део наследног материјала. Поред чињенице да су значајно заступљени у људском геному (у стручној литератури описано је неколико десетина хиљада *STR* генских локуса), ови генетички маркери постоје у великом броју алелских облика. Прецизније речено, *STR* генски локуси одређени су различитим бројем репетитивних секвенци услед чега показују висок степен варијабилности између несродних особа. Због наведеног *STR* локуси се сматрају врло информативним генетичким маркерима за потребе свакодневне судскомедицинске праксе ради идентификације особа, утврђивања спорног родитељства и сродничких односа. Свакако да су најинформативнији најваријабилнији генски локуси, тј. локуси који постоје у највећем броју алелских облика.

Није неуобичајено да две особе имају исту алелску варијанту на посматраном *STR* локусу, па чак и да се поклапају на два или три *STR* локуса. Међутим, вероватноћа да постоје две особе с идентичним алелским варијантама на, рецимо, 15 *STR* локуса за кавказоидно становништво је, према наводима Шпрехера (*Sprecher*), 1 према  $1,83 \times 10^{17}$ . То практично значи да би људска популација морала да има 18.300.000.000.000 индивидуа да би задовољила математички модел у којем би такво поклапање било вероватно [4]. Да би се постигла апсолутна сигурност у идентификацији, потребно је анализирати неколико генских локуса који постоје у великом броју алелских облика.

У нашем раду оптимизирани су услови за изолацију ДНК из чврстог зубног ткива (дентина), биолошког материјала посебно занимљивог са становишта судске медицине. Резултати добијени овим истраживањем показали су да је дентин веома погодан за изолацију ДНК молекула и генетичку анализу у судскомедицинске сврхе чак и после смрти особе. То је веома значајно, посебно онда када је, због промена леша, као што су труљење и распадање, дошло до деградације ДНК молекула у меким ткивима и, сходно томе, немогућности његове екстракције и генетичке анализе. Такође је урађена оптимизација услова амплификације два микросателитска локуса. Статистичка обрада експерименталних резултата учесталости алела за анализирание генске локусе (помоћу компјутерског програма *Cervus*) показала је да су фреквенције алела и генотипова у Харди-Вајнберговој равнотежи, да су маркери високоинформативни и да се могу користити код идентификације лица и у експертизи спорног родитељства.

## ЗАКЉУЧАК

Резултати су показали да су испитивани *STR* генски локуси *D18S70* и *D20S116* хиперваријабилни, тј. да се у нашој популацији појављују у више алелских облика. С обзиром на своју хиперполиморфност и високу информативност, као и чињеницу да се налазе у Харди-Вајнберговој равнотежи, веома су значајни с форензичког аспекта у процесу идентификације особа, утврђивања спорног родитељства и сродничких односа уопште. С обзиром на велики број *STR* локуса у људском геному, потребно је вршити генотипизацију и других хиперваријабилних генетичких маркера, како би се проширила база ДНК података за припаднике наше популације.

## LITERATURA

1. Primorac D, Anđelinović Š, Čule J, Definis-Gojanović M, Gornik I, Lauc G, et al. Primjena analize DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Nakladni zavod Matice Hrvatske; 2001.
2. Reynolds R, Sensabaugh G, Blake E. Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the polymerase chain reaction. *Anal Chem.* 1991;63:2-15.
3. Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schum JW. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *BioTechniques.* 1996;20:266-76.
4. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature.* 1985;318:577-9.
5. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cell. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:10953-71.
6. Marjanović D, Milosavljević M. Usporedna vrednost konvencionalnih metoda i DNK analize u rešavanju najtežih krivičnih dela. *Exp Forensis.* 2003;1(1):245-55.
7. Milosavljević M. Osnovi forenzičke biologije. Sarajevo: Udruženje građana "Obrazovanje gradi Bosnu i Hercegovinu"; 2000.

## Analysis of Microsatellite Markers D18S70 and D20S116 in DNA Isolated from Dentin: Use in Forensic Medicine

Dragana Puzović<sup>1</sup>, Branka Popović<sup>2</sup>, Ivana Novaković<sup>3</sup>, Jelena Milašin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Forensic Medicine, School of Dentistry, University of Belgrade, Beograd, Serbia;

<sup>2</sup>Institute of Human Genetics, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

<sup>3</sup>Institute of Human Genetics, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

### SUMMARY

**Introduction** Short tandem repeats and more specifically microsatellites represent a powerful tool in forensic medicine. In the past years, they have been extensively used in human identification and paternity testing.

**Objective** The aim of the present study was to analyze two microsatellite markers in the Serbian population, i.e. to determine the number of alleles and the relevant forensic parameters.

**Methods** DNA was isolated from teeth samples using standard proteinase K digestion and phenol/chloroform alcohol extraction. PCR products were analyzed on polyacrilamide gels and visualized by AgNO<sub>3</sub> staining. Forensic parameters were calculated using the Cervus software.

**Results** The loci D18S70 and D20S116 were analyzed on a

sample of 70 unrelated, healthy adult individuals from Serbia. The number of alleles was determined and Hardy Weinberg equilibrium was confirmed for both loci. D18S70 and D20S116 demonstrated 6 and 8 alleles, respectively. The power of discrimination (PD) and the power of exclusion (PE) for the tested STR loci, D18S70 and D20S116 were 0.92 (PD), 0.41 (PE) and 0.95 (PD), 0.480 (PE), respectively.

**Conclusion** According to the presented data, D18S70 and D20S116 are most informative markers. Based on allelic frequencies and statistical parameters for forensic testing, it may be suggested that these two microsatellites represent useful markers for individual identification and parentage analysis in the Serbian population.

**Keywords:** STR loci; D18S70; D20S116; forensic medicine