

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

MONIKA PAWLAK

Nr albumu: 71021358

BADANIA IDENTYFIKACYJNE

Praca licencjacka
napisana pod kierunkiem
dr hab. n. med. Renaty Jacewicz
Pracownia Genetyki Sądowej
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej

Łódź 2012

SPIS TREŚCI

WSTĘP.....	3
ROZDZIAŁ 1. Dowód w badaniach identyfikacyjnych przed erą badań DNA.....	5
1.1. Badania polimorfizmu antygenów erytrocytów.....	5
1.2. Badania polimorfizmu białek surowicy krwi.....	7
1.3. Badania polimorfizmu enzymów krwi	9
ROZDZIAŁ 2. Genetyczny dowód w badaniach identyfikacyjnych....	12
2.1. Źródła materiałów w analizie DNA.....	12
2.2. Metody analizy DNA.....	14
2.2.1. Metoda RFLP.....	14
2.2.2. Metoda PCR.....	15
2.2.3. PCR typu multipleks, czyli PCR kompleksowa.....	17
2.2.4. Real – time PCR	19
2.2.5. Sekwencjonowanie DNA.....	27
ROZDZIAŁ 3. Wartość dowodowa analizy DNA w badaniach identyfikacyjnych.....	30
3.1. Parametry przydatności do badań identyfikacyjnych.....	30
3.2. Zasada opiniowania badań z zakresu identyfikacji osobniczej.....	31
ROZDZIAŁ 4. Bazy danych oraz nowoczesne programy do ich obsługi.....	34
4.1 Bazy danych oraz ich standaryzacja.....	34
4.2 Nowoczesne oprogramowania jako narzędzie w analizach identyfikacyjnych.....	37
PODSUMOWANIE.....	40
BIBLIOGRAFIA.....	41
SPIS RYCIN.....	44

Wstęp

Techniki genetycznej identyfikacji człowieka stosowane przez organy ścigania oraz wymiar sprawiedliwości to jedno z największych osiągnięć nauk sądowych XIX w. Po raz pierwszy zastosowano je w Anglii w 1985r. w postępowaniu imigracyjnym, a rok później wykorzystano w sprawie karnej. W 1992r. badania DNA zostały uznane przez Komitet Badań Naukowych USA za niezwykle cenne narzędzie w identyfikacji osób (np. identyfikacji zaginionych dzieci czy dochodzeniu rodzicielstwa lub pokrewieństwa), zwłok oraz ludzkich szczątków. W 2002r. Sąd Najwyższy Rzeczypospolitej Polskiej uznał wysoką wartość poznawczą oraz dowodową dowodu z badań genetycznych [2,19].

Testy DNA opierające się na analizie markerów znajdujących się w różnych miejscach genomu charakteryzuje bardzo wysoka różnorodność – polimorfizm. Uzyskany profil DNA złożony z kilkunastu wyznaczonych markerów jest niepowtarzalnym zapisem każdej osoby za wyjątkiem bliźniąt jednojajowych.

Analiza polimorfizmu DNA stanowi aktualnie najdoskonalszą i najbardziej obiektywną metodę zdobywania materiałów dowodowych, co zostało docenione przez Unię Europejską. W Rekomendacji Rady Europy (R1/92) zawarto dyrektywę, by „badania DNA wykonywane były w każdym możliwym przypadku, bez względu na wagę popełnionego czynu”. Zgodnie z tą Rekomendacją, analiza DNA „jest skomplikowanym procesem naukowym, który może być prowadzony jedynie w laboratoriach mających odpowiednie wyposażenie i doświadczenie, a wykonujący je eksperci powinni posiadać wysoki stopień wiedzy zawodowej i praktycznej”.

Zapewnienie najwyższego poziomu badań stanowi najistotniejszą kwestię w analizach genetyczno-sądowych. Atestacja laboratoriów pozwala

na podjęcie wspólnej strategii, standaryzację metod, nazewnictwa, a także ustalenie norm oraz prawidłowości genotypowania i wnioskowania.

Szybki rozwój badań DNA związany jest głównie z zastosowaniem coraz to większej liczby markerów przy równoczesnym zautomatyzowaniu procesu analizy. Skrócenie czasu wykonania, obniżenie kosztów oraz wykorzystanie baz danych i nowoczesnych oprogramowań statystycznych spowodowało, iż stały się one jednym z najskuteczniejszych narzędzi w identyfikacji osobniczej.

Rozdział 1

Dowód w badaniach identyfikacyjnych przed erą badań DNA.

1.1 Badania polimorfizmu antygenów erytrocytów.

Rok 1901 stanowił przełom w medycynie, kiedy to Karl Landstainer odkrył dwa podstawowe antygeny grupowe krwi A i B. Dało to początek szybkiemu rozwojowi krwiodawstwa i transfuzjologii. Dalsze badania przyniosły nowe odkrycia i tak, aktualnie można wyróżnić sześć grup krwi: A₁, A₂, B, A₁B, A₂B i 0. Klasyfikacja ta została oparta na obecności określonych substancji grupowych na powierzchni erytrocytów.

Każda z czerwonych krwinek posiada substancję grupową H o różnym nasileniu. W największym stężeniu występuje ona u osób z grupą 0 [16]. Osoby z grupą A posiadają na powierzchni erytrocytów antygen grupowy A, a w surowicy przeciwciała, tzw. izoaglutyniny anti-B, natomiast osoby z grupą B – antygen grupowy B i izoaglutyniny anti-A. Charakterystykę obecności poszczególnych antygenów oraz izoaglutynin w zależności od grupy krwi przedstawia rycina 1.

Grupa krwi	Antygen na erytrocytach	Izoaglutyniny w surowicy krwi	Częstość w populacji polskiej (%)
A ₁	A (H)	anty-B	33,83
A ₂	A, H	anty-B	6,39
B	B (H)	anty-A	19,08
A ₁ B	A i B (H)	brak	6,79
A ₂ B	A, B i H	brak	1,58
0	H	anty-A i anty-B	32,33

Ryc. 1. Charakterystyka podstawowych grup krwi układu ABO [16].

Przynależność grupową w układzie ABO w świeżej krwi określano metodą bezpośrednią. Wykorzystując zjawisko aglutynacji ujawniano obecność określonego antygeny na powierzchni erytrocytów oraz określonego przeciwciała w surowicy. W tym celu wyodrębnione krwinki osoby badanej mieszano z izoaglutyniną anty-A oraz niezależnie z izoaglutyniną anty-B. Wystąpienie aglutynacji krwinek z surowicą o właściwościach anty-A lub anty-B wykazywało na obecność odpowiednio antygeny grupowego A lub B.

Rozróżnienie podgrup A₁ i A₂ było możliwe za pomocą lektyn, białek o charakterze glikoprotein, posiadających zdolność aglutynowania krwinek określonej podgrupy.

Oznaczenie erytrocytów w plamach krwi ograniczało się natomiast do badań metodami pośrednimi. Stosowano głównie metodę zahamowania aglutynacji oraz metodę absorpcji - elucji. Pierwsza z nich zwana metodą Holzera polegała na traktowaniu fragmentu zaplamienia przeciwciałami anty-A i anty-B o znanym stężeniu. Oszacowanie obniżenia miana określonych przeciwciał po okresie inkubacji świadczyło o obecności odpowiedniego antygeny. Czulszą od tej metody była technika absorpcji - elucji opierająca się na fakcie, iż antygeny obecne w plamach krwi wiążą się z odpowiednimi przeciwciałami. Następnie powstały kompleks ulega

rozbiciu w podwyższonej temperaturze i daje w efekcie końcowym aglutynację wzorcowych krwinek.

Do wykrywania izoaglutynin obecnych w płamach krwi stosowano tzw. metodę Lattes'a z zastosowaniem krwinek wzorcowych. I tak, gdy aglutynacji ulegały krwinki wzorcowe grupy A – to badany materiał zawierał przeciwciała anty-A, a jeśli krwinki wzorcowe grupy B - to badany materiał zawierał przeciwciała anty-B. Jako kontrolę stosowano krwinki grupy AB, gdyż nie zawierają one antygenów grupowych A i B. Wadą tej metody była konieczność użycia dużej ilości materiału [16].

Antygeny grupowe ABO, podobnie jak inne systemy grupowe, takie jak MN, Rh, Kell, Duffy, Kidd, były bardzo rzadko stosowane w badaniach identyfikacyjnych, gdyż posiadają krótką trwałość. Ich oznaczanie możliwe jest tylko w dobrze zachowanych śladach, które nie podlegały wpływowi niszczących warunków środowiska.

Po raz pierwszy badania antygenów grupowych układu ABO zostały wykorzystane w zakresie badań identyfikacyjnych w 1924r., natomiast w Polsce pierwszą analizę przeprowadził Jan Olbrycht w 1926r.

1.2 Badania polimorfizmu białek surowicy krwi.

W zakresie badań identyfikacyjnych zaczęto wprowadzać kolejno polimorficzne układy grupowych białek surowicy, do których zaliczamy m. in.:

- układ grupowy GM,
- układ grupowy haptoglobiny (HP),
- układ grupowy plazminogenu (PLG),
- układ grupowy transferyny,
- czynnik XIII B.

Układ grupowy GM określa polimorfizm w obrębie immunoglobulin klasy IgG. Cecha GM zaliczana jest najbardziej stabilnych białek obecnych

w suchych plamach krwi [4]. Można wyróżnić około 20 antygenów w zakresie układu G1M numerowanych kolejno liczbami arabskimi. Wśród nich do najczęściej oznaczanych należały: G1M1, G1M2 i G1M3. Obecność najczęściej badanej cechy G1M1 zapisywano zwyczajowo G1M(+1), a jej brak G1M(-1). Oznaczenie przeprowadzano metodą zahamowania aglutynacji. Aby uniknąć błędów w oznaczeniu konieczne było każdorazowe wykonanie kontroli pozytywnej i negatywnej oraz kontroli w postaci niezaplamionego podłoża [20].

Wykrycie antygeny w obrębie układu GM możliwe było po dwóch, a czasem nawet po 10-15 latach od powstania plam. Ze względu na znacznie mniejsze zawartości IgG w nasieniu, w wymazach z dróg rodnych i w ślinie, czas po upływie którego oznaczano w tych materiałach przynależność w układzie GM był krótszy niż w przypadku plam krwi. Zawilgocenie plamy miało niszczący wpływ na cechę G1M1. Przykładowo plamy posiadające tę cechę, przechowywane w wilgoci, już po 5 tygodniach dawały wynik fałszywie negatywny [4].

Haptoglobiny są białkiem, którego biologiczna rola polega na eliminacji z osocza wolnej hemoglobiny. Wyróżnia się dwa allele 1 i 2 dające trzy fenotypy: HP 1-1, 2-1, 2-2 oraz szereg wariantów, z których najczęściej występującym w populacji jest HP 2-1M. Ze względu na trudności związane z maskowaniem HP przez znaczne ilości wolnej hemoglobiny oraz problemy interpretacyjne w długo przechowywanych plamach bardzo rzadko były one przedmiotem analizy w badaniach z zakresu identyfikacji osobniczej [16].

Polimorfizm plazminogenu charakteryzowały dwa podstawowe allele: PLG*A i PLG*B ujawniane w plamach krwi metodą IEF maksymalnie do 5 miesięcy od ich naniesienia [16].

Polimorfizm transferyn, czyli białka tworzącego kompleks z jonami żelaza obecnymi w osoczu oznaczano w plamach krwi nie starszych niż 12 miesięcy. Do jego wykrycia stosowało się metodę immunoelektroforezy

(IEF), która pozwalała na ujawnienie trzech alleli: TF*C, TF*D, TF*B oraz trzech podtypów allela TF*C: TF*C1, C2 i C3 [4].

Polimorfizm czynnika XIII_B analizowano metodą immunoelektroforezy w oparciu o ujawnianie trzech możliwych wariantów allelicznych: XIII_B*1, XIII_B*2 oraz XIII_B*3. Z uwagi na niską trwałość można było go wykryć w okresie zaledwie półtora miesiąca od momentu naniesienia na podłoże [16].

1.3 Badania polimorfizmu enzymów krwi.

Enzymy są najmniej trwałymi składnikami krwi w porównaniu z antygenami erytrocytów i białek surowicy, tym niemniej przed erą badań DNA w analizach identyfikacyjnych wykonywano oznaczenia m. in. polimorfizmu następujących układów enzymatycznych:

- układu grupowego fosfoglukomutazy (PGM),
- układu grupowego kwaśnej fosfatazy krwinkowej (ACP),
- układu grupowego esterazy D (ESD),
- układu grupowego glioksalazy I (GLO I),
- układu grupowego kinazy adenylanowej (AK).

Polimorfizm fosfoglukomutazy, jako najstabilniejszego układu enzymatycznego krwi można oznaczyć w plamach krwi przechowywanych w standardowych warunkach przez około 6 miesięcy. Niesprzyjające warunki środowiska, tj. wysoka wilgotność lub temperatura znacząco skracały jego wykrywalność. W przypadku starych, zdegradowanych plam często powstawały dodatkowe niespecyficzne frakcje, co mogło prowadzić do błędnej interpretacji fenotypu [16]. W rozdziale za pomocą elektroforezy konwencjonalnej ujawniano trzy fenotypy: homozygotyczny PGM 1-1 bądź PGM 2-2, czy też heterozygotyczny PGM 2-1. Rozdział z zastosowaniem izoelektroogniskowania (IEF) rozszerzał możliwość oznaczenia polimorfizmu PGM do dziesięciu fenotypów: 1A1A, 1A1B,

1B1B, 2A2A, 2A1A, 2A1B, 2A2B, 2B2B, 2B1A, 2B1B [16].

W układzie grupowym ACP fenotypy dziedziczyły się według modelu kodominującego warunkującego wystąpienie jednego z sześciu fenotypów: AA, BB, CC, BA, CA, CB. Oznaczenie polimorfizmu kwaśnej fosfatazy krwinkowej było utrudnione podczas badania starych materiałów. Rozróżnienie fenotypów AA, CA i BA sprawiało trudności już po okresie 8 tygodni, natomiast pozostałe typowano w maksymalnie dwunastotygodniowych plamach [8].

W porównaniu do poprzednich układów, układ grupowy esterazy D charakteryzował się niewielką przydatnością do badań ze względu na niestabilność i niski stopień polimorfizmu. Trwałość tego enzymu wahała się od 4 do 8 tygodni. W przypadku starych plam dochodziło do pojawiania się dodatkowych frakcji oraz zmian w ich wzajemnej intensywności, co mogło utrudniać interpretację fenotypu [4].

Polimorfizm glioksalazy I był trudny do oznaczania nie tylko w plamach krwi, ale również w nasieniu ze względu na niską aktywność enzymu. W układzie tym oznaczano dwa allele: GLO I*1 oraz GLO I*2 dające trzy fenotypy: 1-1, 2-1, 2-2 [9].

Polimorfizm kinazy adenylanowej można było oznaczać przez około rok w plamach krwi przechowywanych w temperaturze pokojowej. Ze względu na niski współczynnik dyskryminacji oraz występujący w prawie 92% populacji fenotyp 1-1, układ ten był rzadko stosowany do indywidualizacji plam krwi [16].

Polimorfizm innych układów enzymatycznych poza opisanymi powyżej oznaczano sporadycznie w badaniach identyfikacyjnych ze względu na trudności techniczne przy fenotypowaniu, konieczność użycia dużej ilości materiału badawczego oraz znaczny nakład pracy i kosztów analizy.

Mimo stałego poszerzania zakresu analiz, układy antygenów erytrocytów, białek surowicy i enzymów krwi były niewystarczające do rozstrzygnięcia pochodzenia śladów biologicznych takich jak: plamy krwi, śliny, nasienia, włosy, fragmenty tkanek miękkich i kości. Stosunkowo krótka trwałość opisanych układów grupowych oraz niski stopień ich polimorfizmu nie pozwalały na rozwikłanie wielu spraw z zakresu identyfikacji osobniczej. Dlatego też wraz z rozwojem badań genetycznych stopniowo odstępowano od tego typu analiz.

Rozdział 2

Genetyczny dowód w badaniach identyfikacyjnych.

2.1 Źródła materiałów w analizie DNA.

Miano śladu biologicznego przypisuje się substancjom organicznym, które można znaleźć na przedmiotach lub na ludzkim ciele podczas oględzin kryminalistycznych lub sądowo-lekarskich. Do śladów biologicznych zaliczane są płyny ustrojowe, wydaliny, wydzieliny, a także fragmenty tkanek. Materiałem, który można wykorzystać jako źródło profilu genetycznego osoby może być krew, ślina, sperma, włosy, zęby, kości, tkanki miękkie oraz wszystkie inne wydzieliny, wydaliny ludzkie i materiały [12].

Istnieją prawne uregulowania dotyczące pobierania materiału do badań od podejrzanych, oskarżonych oraz osób, co do których zachodzi podejrzenie popełnienia przestępstwa. Zgodnie z art. 74 Kodeksu Postępowania Karnego, po nowelizacji z 2003r. oraz art. 15 Ustawy o Policji, po zmianach z 2004r. dopuszczone jest pobranie włosów, krwi, wymazów ze śluzówki policzków lub innych wydzielin od każdego, bez względu na wyrażenie zgody „w celu ograniczenia kręgu osób podejrzanych lub ustalenia wartości dowodowej ujawnionych śladów” [21, 22, 23, 24].

Teoretycznie wszystkie komórki tworzące jeden organizm, powstałe w wyniku podziałów jednej zygoty, posiadają identyczny profil DNA. Dlatego też można porównywać profil ujawniony w plamie krwi czy włosie, zabezpieczonych na miejscu przestępstwa z profilem oznaczonym w materiale porównawczym stanowiącym np. wymaz z jamy ustnej.

Tym niemniej, w wyjątkowych sytuacjach, gdy badana osoba poddana została przeszczepowi szpiku, profil DNA oznaczony w krwi będzie różnił się od profilu oznaczonego w innych tkankach tej osoby [7, 10]. Biorąc powyższe pod uwagę wymaz komórek nabłonka z jamy ustnej wydaje się najbardziej bezpiecznym źródłem DNA. Ponadto stanowi on w chwili obecnej najszybszą i najmniej inwazyjną procedurę pobrania materiału do badań genetycznych.

Prawidłowe zabezpieczenie śladów biologicznych na miejscu przestępstwa eliminuje możliwość popełnienia zbrodni doskonałej. Nawet materiał pozostawiony w śladowej ilości przez sprawcę, jak np. ślad kontaktowy zawierający kilka komórek, często wystarcza do określenia osobniczo niepowtarzalnego profilu DNA. Wprowadzony do policyjnej bazy danych jest następnie porównany z istniejącymi w niej profilami.

Podczas podstawowych czynności takich jak: oddychanie, mówienie, jedzenie, picie, składniki śliny przenoszą się na powierzchnię różnych przedmiotów stanowiąc idealne źródło profilu genetycznego osoby, która je pozostawiła. Zaliczamy do nich np. ślad śliny na szklance, butelce, ustniku papierosa czy też w miejscu zaklejenia koperty.

Włosy oraz paznokcie są wytworami naskórka i cechują się wysoką zdolnością regeneracyjną. To ważne źródło DNA w genetyce sądowej. Podobnie jak wymaz bądź wyskrobina spod paznokci, włosy są często wykorzystywane w celach identyfikacji osobniczej, gdyż mogą być pomocne w ustaleniu profilu DNA przestępcy lub ofiary.

Ślady pochodzące z miejsca, gdzie popełniono przestępstwo na tle seksualnym, stanowią odrębną grupę zabezpieczanego materiału. Pomocne jest tu użycie lamp UV oraz systemu ALS Bluemaxx, gdzie wykorzystuje się wzbudzenie świecenia białek wchodzących w skład nasienia.

W każdym przypadku podstawą analizy zabezpieczonego materiału jest wykorzystanie metody opartej na analizie DNA.

2.2 Metody analizy DNA.

Wprowadzenie do badań sądowych metod analizy genetycznej nastąpiło dzięki odkryciu w 1985r. prof. A.J. Jeffreys'a, który wykazał, iż możliwe jest wykonanie identyfikacji osobniczej poprzez analizę wysoce zmiennych regionów minisatelitarnego DNA [18]. Opracowana przez niego metoda analizy genetycznego odcisku palca, tzw. „DNA fingerprint”, została niemal natychmiast wykorzystana w laboratoriach sądowych na całym świecie.

Oznaczenie profilu DNA w aspekcie sądowym po raz pierwszy nastąpiło w 1986r. przez policję brytyjską w sprawie o gwałt i zabójstwo dwóch czternastoletnich dziewczynek. Zastosowanie nowej techniki pozwoliło na identyfikację sprawcy - Colina Pitchforka, który przeszedł do historii kryminalistyki jako pierwszy przestępca skazany na podstawie analizy DNA [3].

W 1989r. badanie genetyczne doprowadziło do pierwszego uniewinnienia. Skazany na podstawie relacji świadków za gwałt i porwanie Amerykanin Gary Dotson został oczyszczony z zarzutów. Stało się to możliwe po przeprowadzeniu dowodu z badań DNA w kilka lat po rozpoczęciu odbywania przez niego wyroku.

Współczesna identyfikacja osobnicza nie kończy się jedynie na rozpoznaniu ofiar przestępstw kryminalnych. Jest również wykorzystywana do identyfikacji szczątków z anonimowych grobów, ofiar zamachów czy też wszelkiego rodzaju katastrof.

2.2.1 Metoda RFLP.

Pierwszą techniką analizy DNA stosowaną w identyfikacji osobniczej była metoda RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism*) oznaczająca polimorfizm długości fragmentów

restrykcyjnych. Przeprowadzenie badań techniką RFLP wiązało się z potrzebą analizy znacznych ilości niezdegradowanego DNA, co było trudnym do spełnienia warunkiem jeżeli chodzi o analizę śladów biologicznych zabezpieczonych z miejsca przestępstwa. Pojawiały się również problemy z detekcją niespecyficznymi fragmentów restrykcyjnych. Wykorzystanie analizy RFLP ograniczało też zastosowanie analizy statystycznej w ocenie wartości dowodowej ekspertyzy. Nie pozwoliło na standaryzację badań, która umożliwiałaby porównywanie wyników między różnymi laboratoriami [3,18].

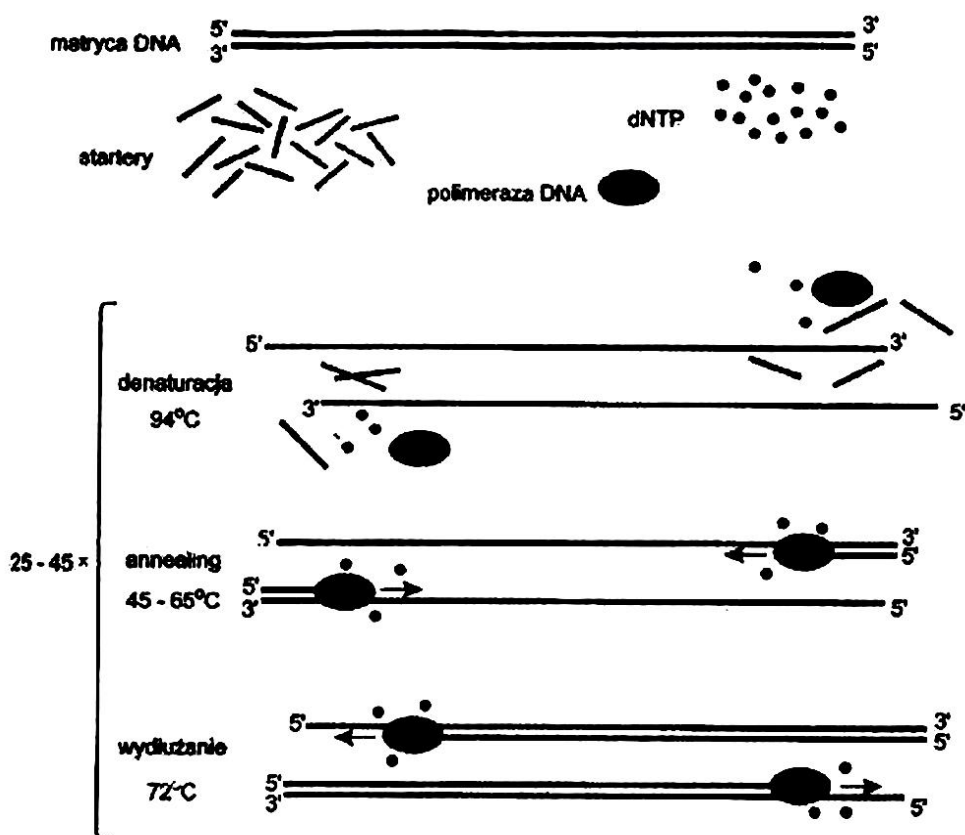
Wraz z rozwojem nauki rewolucyjnemu postępowi uległy techniki analizy DNA. Skrócił się czas oczekiwania na wynik analizy z kilku tygodni do paru godzin, gdyż jest ona obecnie wykonywana przez wysoko wyspecjalizowaną aparaturę. Nowoczesne metody stały się nie tylko mniej pracochłonne, ale również znacznie bardziej precyzyjne i informatywne.

2.2.2 Metoda PCR.

Współczesna genetyka sądowa bazuje na reakcji łańcuchowej polimerazy, tzw. PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Umożliwia ona amplifikację, czyli namnożenie wybranego fragmentu DNA. Została opracowana w 1987r. przez amerykańskiego biochemika K. B. Mullisa, który w 1993r. za to odkrycie został uhonorowany Nagrodą Nobla. Reakcję PCR tworzy wielokrotnie powtarzalny cykl trzech etapów zachodzących w różnych temperaturach. Pierwszy etap, czyli denaturacja polega na zerwaniu wiązań wodorowych i rozdzieleniu na dwie pojedyncze nici DNA i zachodzi pod wpływem temperatury bliskiej 100°C. Drugi etap to, tzw. *annealing*, czyli przyłączanie do nici DNA syntetycznych oligonukleotydów, tzw. starterów, które są komplementarne do początku i końca amplifikowanej sekwencji DNA. Faza ta zachodzi w najniższej

temperaturze. Wydłużanie, czyli właściwa synteza DNA to ostatni etap reakcji PCR. Podwyższenie temperatury do 72° stwarza optymalne warunki do przyłączenia się termostabilnego enzymu, polimerazy katalizującej syntezę nici komplementarnej do matrycowej. Trzy etapy reakcji PCR powtarzają się cyklicznie, a jako matryca są wykorzystywane wszystkie zsintetyzowane dotychczas cząsteczki [17]. Schemat reakcji PCR przedstawiono na rycinie 2.

Przyrost produktów amplifikacji następuje w postępie geometrycznym, tzn.: $1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 256$, itd. Dlatego też po 32 cyklach reakcji PCR zachodzącej ze 100% wydajnością uzyskujemy 1,07 miliarda kopii badanego regionu DNA.



Ryc. 2. Schemat reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*).

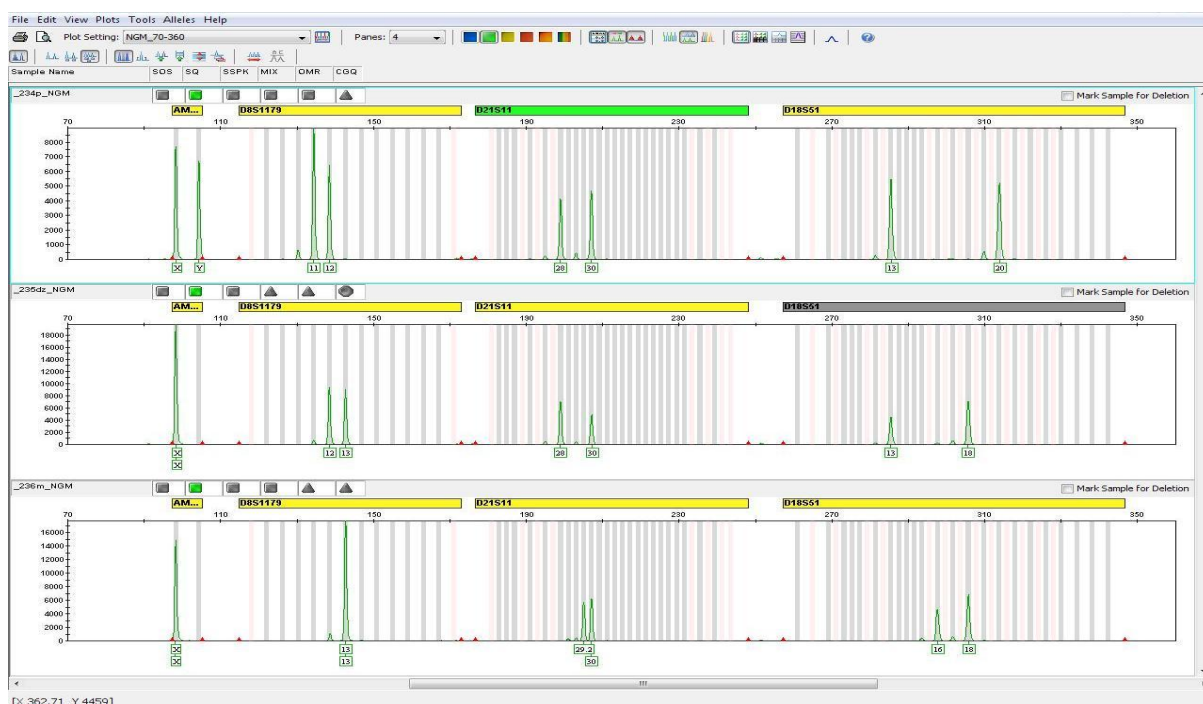
Nawet śladowe ilości materiału poddane namnożeniu mogą być źródłem niepowtarzalnego osobniczo profilu DNA. Ma to szczególne znaczenie w badaniach identyfikacyjnych, podczas których dysponujemy minimalną ilością DNA. Niesterylne warunki zabezpieczania i badania materiału mogą spowodować kontaminację obcym DNA, a w efekcie końcowym błędy w opiniowaniu. Tym niemniej zachowanie standardów badawczych i jałowych warunków analizy przeprowadzanej w atestowanym laboratorium przez wykwalifikowaną kadrę badawczą pozwala na uniknięcie tego typu niebezpieczeństw i czyni metodę PCR niezastąpioną w aspekcie analiz genetyczno – sądowych.

2.2.3 PCR typu multipleks, czyli PCR kompleksowa.

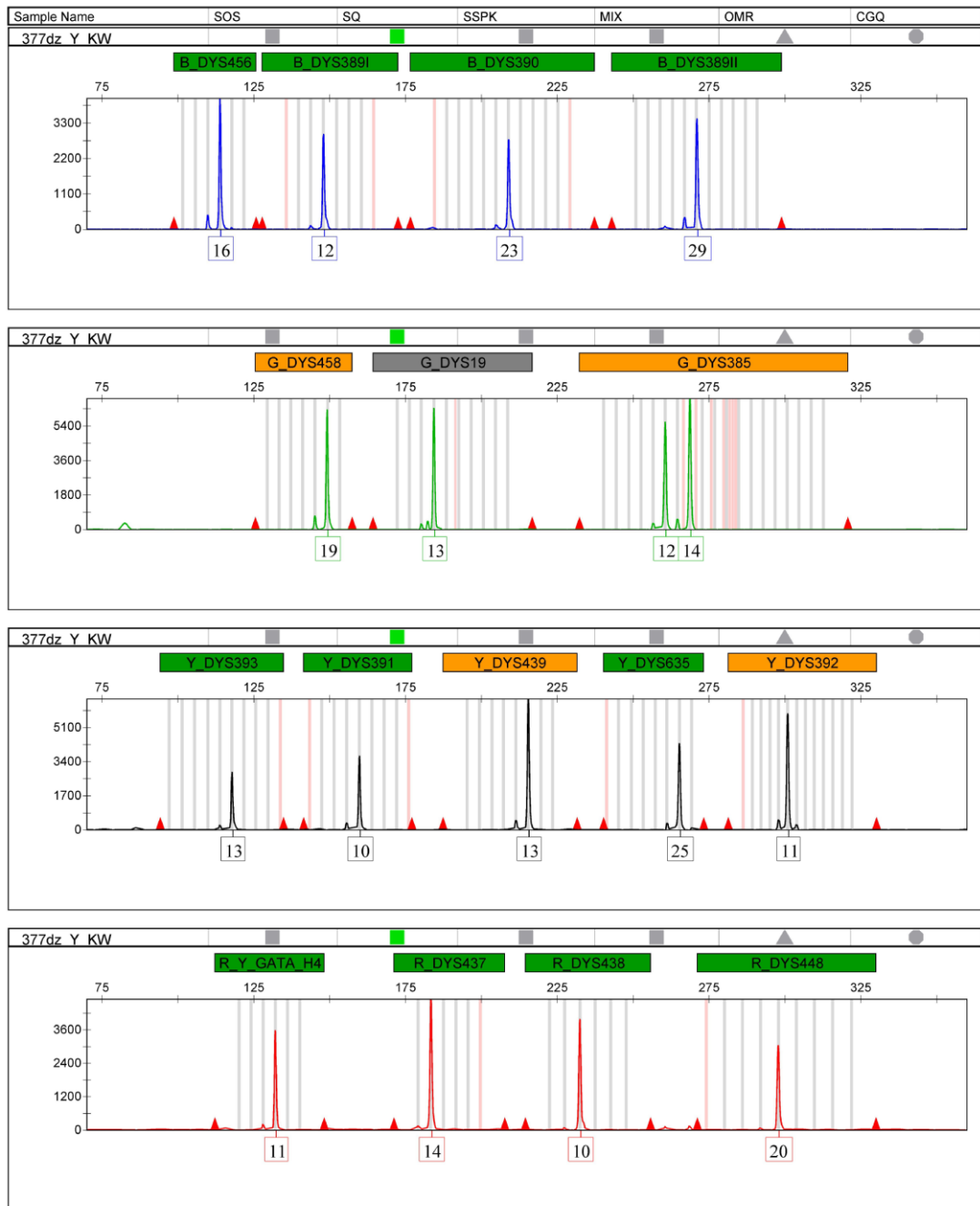
PCR typu multipleks to odmiana reakcji PCR, w której możliwe jest zamplifikowanie kilkunastu polimorficznych markerów w jednej mieszaninie reakcyjnej. Obniża to do minimum ilość matrycy potrzebnej do badań oraz skraca czas analizy do kilku godzin. Znaczące obniżenie kosztów przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej wartości dowodowej ekspertyzy to ważne czynniki przemawiające za stosowaniem tego typu reakcji. W pojedynczej reakcji multipleks PCR powiela się nawet kilkanaście loci mikrosatelitarnego DNA, tzw. STR, czyli regionów krótkich tandemowych powtórzeń (ang. *short tandem repeat*). W przypadku silnej degradacji próby namnaża się regiony miniSTR o skróconych sekwencjach starterów. Metodą multipleks PCR bada się markery położone zarówno na chromosomach autosomalnych jak i na chromosomach płci X i Y. Przykładowy wynik badania loci autosomalnych STR oraz locus amelogeniny znakowanych zielonym barwnikiem fluorescencyjnym przedstawiono na rycinie 3.

W sytuacji kiedy ślad jest mieszaniną materiału pochodzącego od kobiety i mężczyzny wykorzystuje się specyficzną amplifikację markerów

umiejscowionych na chromosomie Y. Markery te przekazywane są w formie pojedynczego zestawu cech – haplotypu Y, dlatego też dają identyczny profil u mężczyzn wywodzących się z tej samej linii, np. u ojca i syna czy też u braci. Specyficzna amplifikacja tych markerów zachodząca wyłącznie w obecności męskiego DNA czyni je niezwykle ważnym w analizie materiałów pochodzących z przestępstw na tle seksualnym. Przykładowy wynik analizy w oparciu o markery Y-STR przedstawiono na rycinie 4.



Ryc. 3. Przykładowy wynik badania autosomalnych loci STR i locus amelogeny znakowanych zielonym barwnikiem fluorescencyjnym w reakcji multiplex PCR.



Ryc. 4. Przykładowy wynik badania loci Y-STR z wykorzystaniem znakowania czterema barwnikami fluorescencyjnymi.

2.2.4 Real – time PCR.

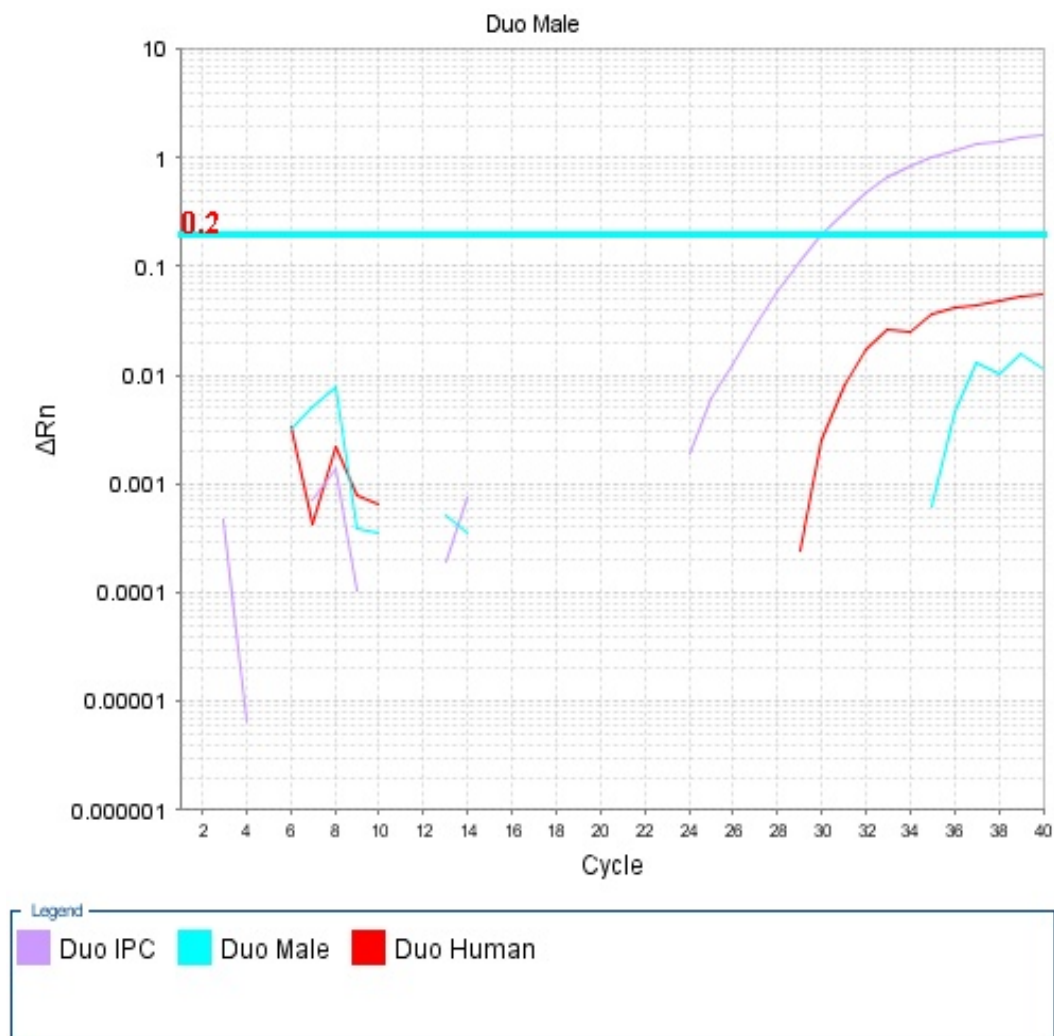
Real-time PCR, czyli reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, pozwala na monitorowanie przyrostu liczby kopii analizowanej sekwencji w trakcie trwania reakcji. Wykorzystuje się tutaj znakowanie starterów, a w efekcie końcowym produktów PCR barwnikami fluorescencyjnymi, tzw. fluorochromami. Fluorochromy są wzbudzone

światłem o określonej długości fali, a wyemitowana przez nie energia jest wykrywana i mierzona w amplifikatorze wyposażonym w system optycznej detekcji. Do aktywowania fluorochromów używa się diody elektroluminescencyjnej, lasera lub lampy. Detektory posiadają filtry, w obrębie których następuje rozdzielanie różnych długości fali poszczególnych barwników. Produkty reakcji real – time PCR wykazują różny poziom fluorescencji w zależności od stężenia wyjściowego DNA. Im wyższe jest stężenie i im więcej powstaje określonej sekwencji DNA, tym silniejsza jest fluorescencja [3].

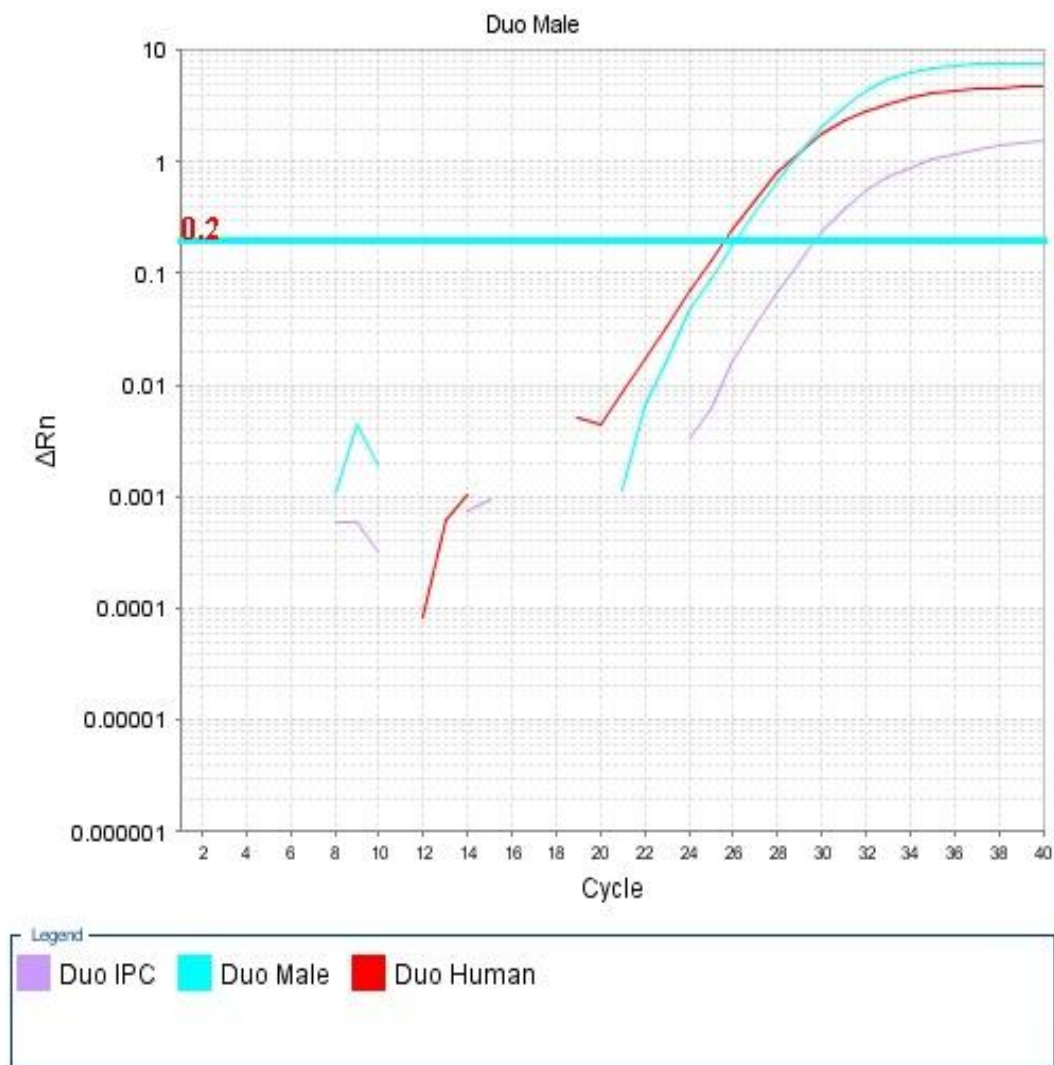
W reakcji real-time PCR można stosować barwniki inkorporujące niespecyficzną podwójną nić DNA, jak np. Sybir green. Obecnie w najczulszym wariantcie tej reakcji wykorzystuje się detekcję sondą TaqMan specyficzną dla określonej sekwencji. Jest tu wykorzystany rezonansowy transfer energii fluorescencji przebiegający pomiędzy fluorescencyjnie wyznakowaną cząstką reporterową sondy oraz nieznakowaną cząstką wygaszacza. Emitowana przez reporter w stanie spoczynku fluorescencja jest wychwytywana przez wygaszacz, który znajduje się w jej bliskim położeniu i zamieniana w energię ciepłą. Obecność badanej sekwencji DNA skutkuje przyłączeniem sondy, co z kolei prowadzi do zajęcia replikacji badanej sekwencji DNA. Polimeraza w czasie reakcji PCR pełni jednocześnie funkcję 5'endonukleazy. Powoduje ona hydrolizę sondy, co skutkuje oddaleniem reportera od wygaszacza i w efekcie końcowym swobodną emisją sygnału fluorescencyjnego. Wielkość sygnału jest wprost proporcjonalna do ilości zhydrolizowanej sondy, a tym samym do ilości powstałego produktu PCR. W fazie logarytmicznego wzrostu amplifikacja DNA zachodzi z wysoką i stałą wydajnością sięgającą 100%, co oznacza, że przy każdym kolejnym cyklu następuje podwojenie produktu amplifikacji [18].

Sondy TaqMan są wykorzystywane do detekcji polimorfizmu w obrębie markerów SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), tzw.

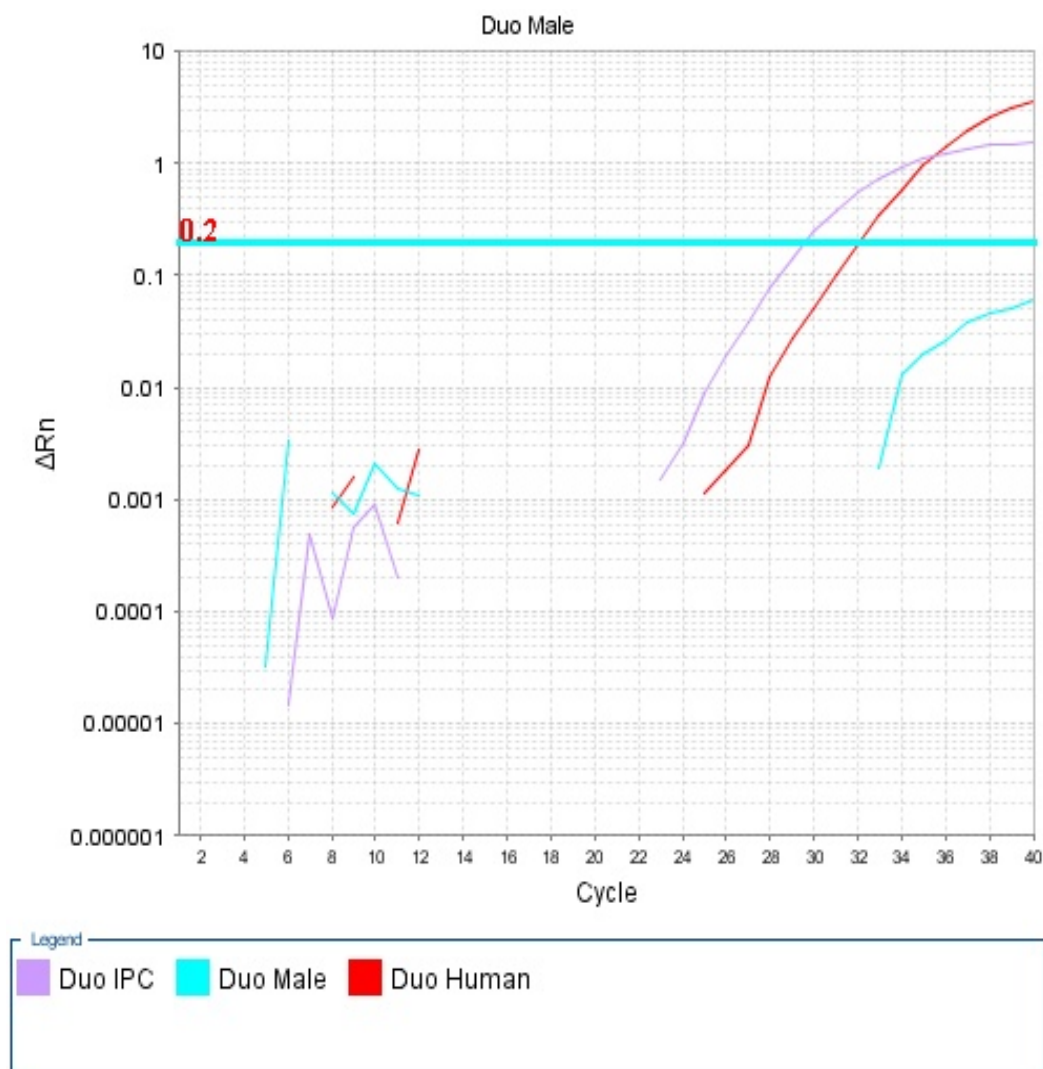
polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, które stanowią mutacje punktowe występujące w populacji z częstością minimum 1%. Przy użyciu znakowanych różnymi barwnikami sond TaqMan w jednej reakcji PCR wykrywa się sekwencję SRY (ang. *sex determining region Y*), która determinuje płęć męską, sekwencję w obrębie autosomalnego DNA oraz inhibitory reakcji PCR. Pozwala to na przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej genomowego DNA pochodzącego od człowieka oraz ujawnienie i określenie stężenia męskiego DNA. Reakcja real-time PCR jest na tyle czuła i precyzyjna, iż pozwala na wykrycie pojedynczych męskich komórek występujących nawet wśród 1 000 000 żeńskich [17]. Ryciny 5, 6, 7, 8 i 9 przedstawiają przykładowe wykresy reakcji real-time PCR przeprowadzonej w oparciu o System 7500 i oprogramowanie SDS HID v. 1.1. dedykowane do analizy DNA w aspekcie identyfikacji osobniczej, znajdujące się w Pracowni Genetyki Sądowej w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (rycina 10).



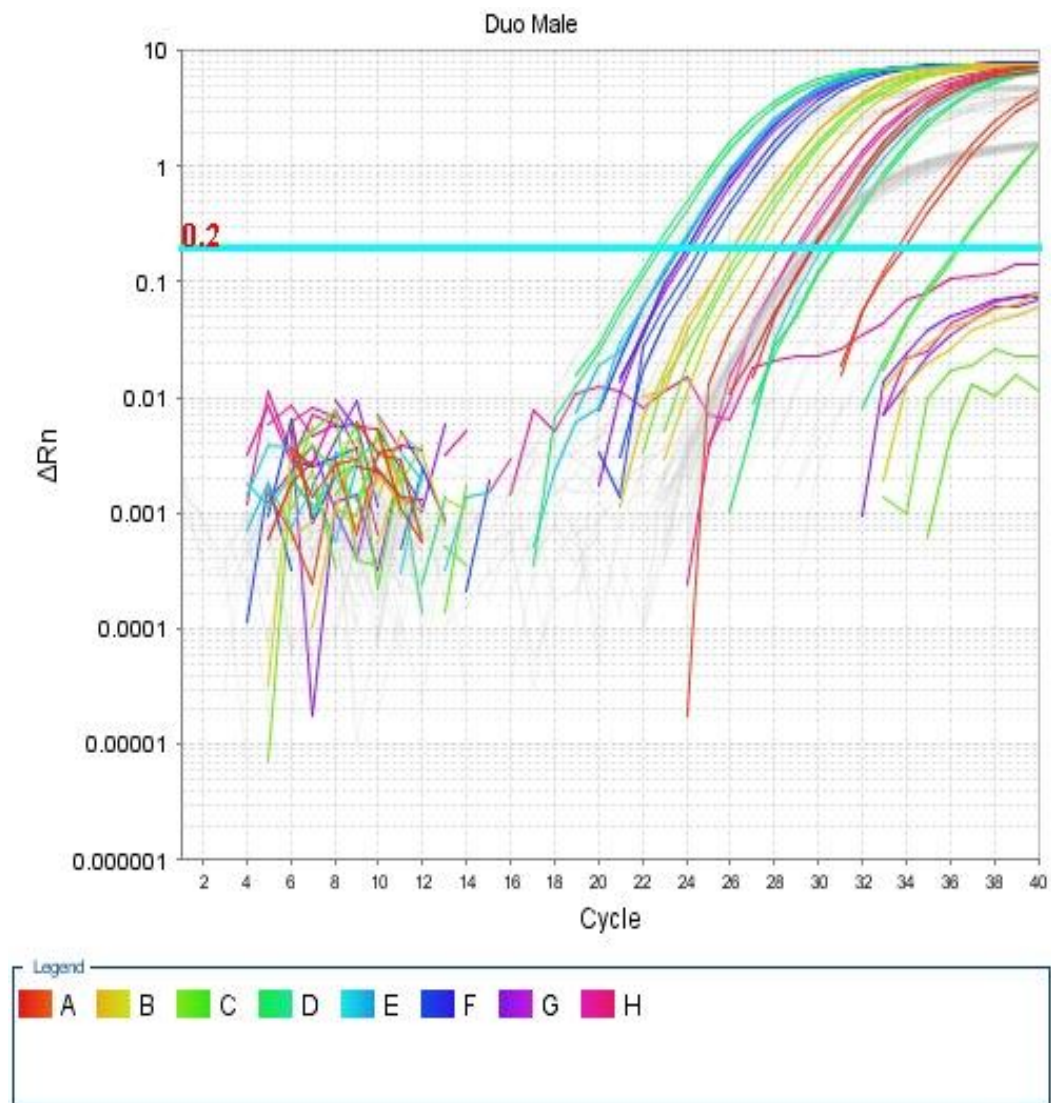
Ryc. 5. Wykres reakcji real – time PCR dla kontroli ujemnej, w której nie ujawniono DNA. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka. (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).



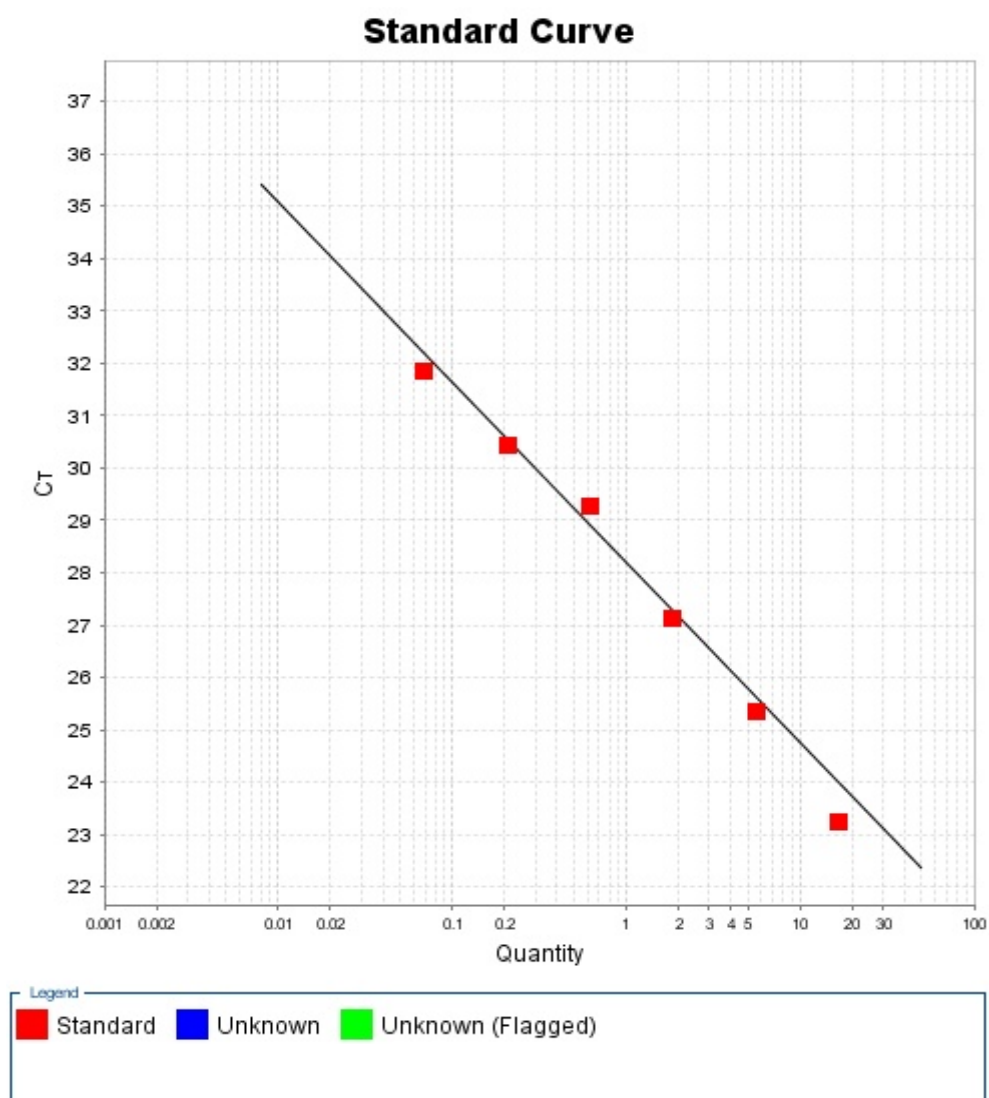
Ryc. 6. Wykres reakcji real – time PCR uzyskany w oparciu o analizę próby zawierającej męski materiał genetyczny. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).



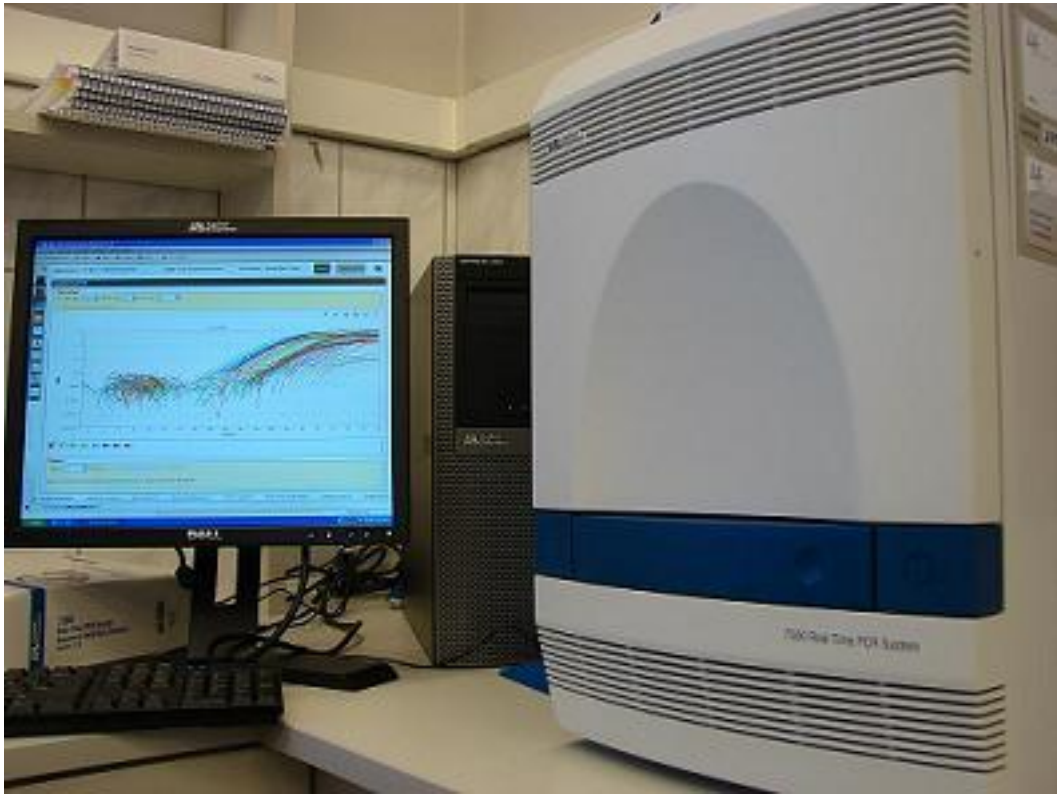
Ryc. 7. Wykres reakcji real – time PCR uzyskany w oparciu o analizę próby zawierającej wyłącznie żeński materiał genetyczny. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka. (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).



Ryc. 8. Wykres zbiorczy reakcji real – time PCR uzyskany dla analizowanych prób DNA. Poszczególnymi kolorami oznaczono DNA pochodzące z badanych materiałów.



Ryc. 9. Krzywa wzorcowa uzyskana w oparciu o reakcję real-time PCR standardów DNA, służąca do oceny stężenia badanych prób.



Ryc. 10. 7500 Real – Time PCR System, dedykowany do analizy DNA w aspekcie identyfikacji osobniczej, znajdujący się w Pracowni Genetyki Sądowej w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

2.2.5 Sekwencjonowanie DNA.

W przypadku braku możliwości wyizolowania genomowego DNA stosuje się analizę mitochondrialnego DNA (mtDNA) z wykorzystaniem reakcji sekwencjonowania, czyli określania kolejności ułożenia zasad w nici DNA. Wyizolowany mtDNA amplifikuje się z użyciem starterów specyficznych dla regionów HV1, HV2, rzadko HV3, rozmieszczonych wewnątrz pętli D, tzw. regionu kontrolnego. Produkty amplifikacji poddaje się sekwencjonowaniu, a następnie rozdzałowi elektroforetycznemu, w wyniku czego otrzymujemy elektroforegram, na bazie którego program komputerowy oznacza ułożenie kolejnych nukleotydów w badanym fragmencie nici DNA, znakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Z punktu widzenia badań identyfikacyjnych zalety

analizy mtDNA związane są z dużą liczbą kopii w komórce, wyższą odpornością na degradację w porównaniu z jądrowym DNA oraz obecnością w trzonie włosa, gdzie nie występuje jądrowe DNA.

Dziedziczenie w obrębie mitochondrialnego DNA różni się od dziedziczenia w obrębie genomowego DNA, w którym poza markerami chromosomu Y i X u płci męskiej ujawniamy genotypy złożone z dwóch cech – jednej pochodzącej od ojca i drugiej pochodzącej od matki. W mitochondrialnym DNA ujawniamy haplotypy w obrębie badanej sekwencji mtDNA pochodzące wyłącznie od matki. Analiza mtDNA dla potrzeb sądowych opiera się na porównaniu uzyskanego haplotypu śladu z haplotypem określonej osoby i ustaleniu, czy osoba ta może być źródłem badanego śladu, czy też należy wykluczyć taką hipotezę. Kluczowym etapem analizy jest odniesienie uzyskanej sekwencji do Sekwencji Referencyjnej z Cambridge tzw. CRS (ang. *Cambridge Reference Sequence*). Stanowi ona standard, z którym zestawiane są wszystkie nowo zsekwencjonowane haplotypy [6].

Technika analizy mtDNA okazała się przydatna przy identyfikacji materiałów pochodzących ze starych szczątków czy odłamków kości. Pozwoliła m. in. na stwierdzenie autentyczności szczątków Cara Mikołaja II ekshumowanych w 1998r. W oparciu o analizę mtDNA przeprowadzono również identyfikację szczątków gen. Władysława Sikorskiego, który zginął w 1943r. w katastrofie lotniczej nad Gibraltarem. Z ekshumowanych w 2008r. materiałów, tj. fragmentu kości udowej oraz zęba przeprowadzono analizę sekwencji regionów HV1 i HV2 mtDNA, które porównano z analogicznymi sekwencjami mtDNA Ewy Wojtasik, biologicznej krewnej generała w linii matczynej [11].

Określenie przynależności gatunkowej jest możliwe dzięki konserwatywnej sekwencji nukleotydów genu kodującego cytochrom B w obrębie mtDNA. Para specyficznych gatunkowo starterów komplementarnych do regionów otaczających tę sekwencję pozwala na

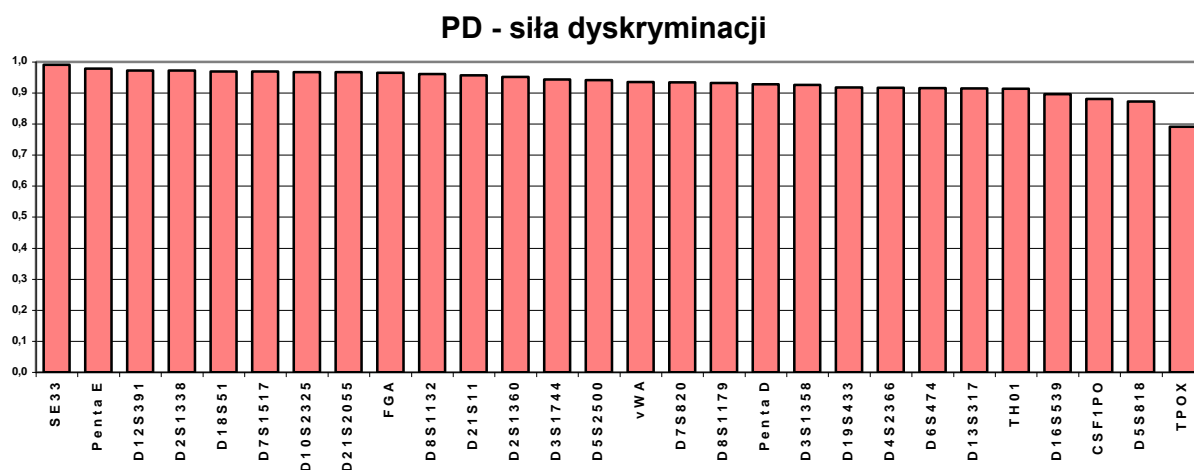
przeprowadzenie specyficznej amplifikacji mtDNA w obrębie różnych gatunków zwierząt. Metoda ta pozwala na wykazanie, czy np. używane w chińskiej medycynie rogi nosorożca czy kości tygrysa są autentyczne. W zakresie genetyki sądowej pozwala przykładowo na rozróżnienie, czy ślad zabezpieczony na miejscu zdarzenia pochodzi od człowieka czy też od zwierzęcia.

Rozdział 3

Wartość dowodowa analizy DNA w badaniach identyfikacyjnych.

3.1 Parametry przydatności do badań identyfikacyjnych.

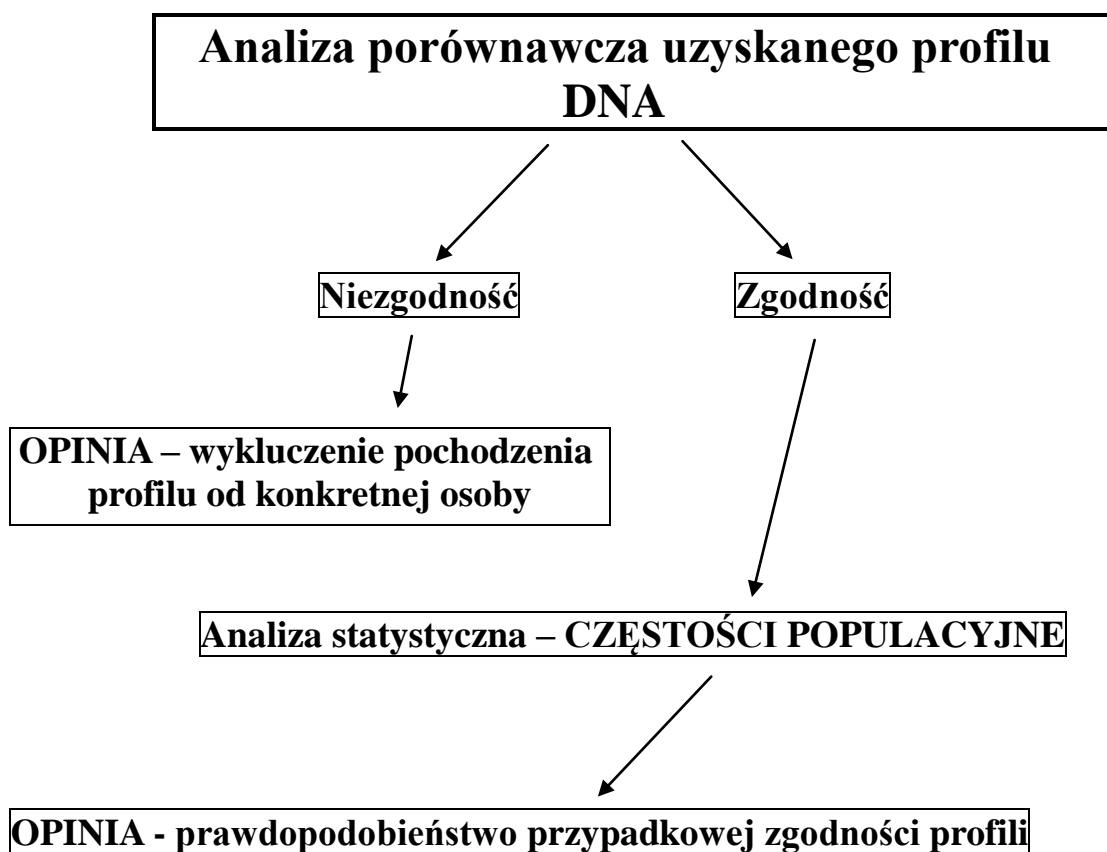
Użycie odpowiednio dobranego zestawu markerów daje możliwość rozróżnienia śladów biologicznych pochodzących od różnych osób. Przydatność markera bądź ekspertyzy do analizy określa siła dyskryminacji – PD (ang. *power of discrimination*), inaczej zwana szansą zróżnicowania osób. Jest to prawdopodobieństwo, iż dwie losowo wybrane osoby z populacji będą posiadały odmienny zestaw cech. Siła dyskryminacji jest tym wyższa, im bardziej polimorficzne są układy. Na rycinie 11 przedstawiono siłę dyskryminacji dla poszczególnych markerów DNA typu STR stosowanych w badaniach identyfikacyjnych.



Ryc. 11. Siła dyskryminacji poszczególnych markerów typu STR wykorzystywanych w identyfikacji osobniczej.

3.2 Zasada opiniowania badań z zakresu identyfikacji osobniczej.

Aby ustalić czy przykładowo plama krwi ujawniona na miejscu przestępstwa pochodzi od konkretnego podejrzanego, należy porównać jego profil z profilem DNA tej plamy. Jeżeli profile są odmienne w treści opinii podajemy, iż należy wykluczyć pochodzenie badanego śladu od tego podejrzanego. Jeżeli profile są jednakowe, tzn. posiadają identyczne allele we wszystkich badanych loci, wówczas można przypuszczać, że pochodzą one od jednej, konkretnej osoby. Możliwe jest jednak, iż dwie lub więcej niespokrewnionych ze sobą osób w populacji posiada identyczny profil genetyczny zupełnie przypadkowo. Prawdopodobieństwo takiego zdarzenia określane jest jako prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności (ang. *random match probability*). Jest ono szacowane każdorazowo dla danego profilu genetycznego na podstawie częstości populacyjnych alleli w konkretnym regionie. Przykładowo dla multipleksu złożonego z 15 loci prawdopodobieństwo przypadkowego wystąpienia jednakowego profilu u dwóch niespokrewnionych osób w populacji ma wartość rzędu 1×10^{-21} . Oznacza to, iż konkretny profil genetyczny pojawi się średnio raz na 1 000 000 000 000 000 000 000 osób, czyli przekroczy to kilkanaście razy rząd wielkości charakteryzujący liczbę ludzi żyjących na Ziemi. Dlatego też zgodność profili w odpowiednio szerokim zakresie markerów DNA w praktyce oznacza, że pochodzą one od jednej konkretnej osoby, pod warunkiem, że nie ma ona rodzeństwa monozygotycznego. Schemat opiniowania w badaniach identyfikacyjnych przedstawiono na rycinie 12.



Ryc. 12. Schemat opiniowania w badaniach identyfikacyjnych.

Do oceny częstości występowania genotypów i profili DNA w populacji wykorzystuje się prawo równowagi Hardy’ego i Weinberga - HWE (ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*). Prawo to opisuje stan dynamicznej równowagi. Mówi ono, że częstość występowania alleli w populacji jest stała i nie zmienia się z pokolenia na pokolenie. Taka sytuacja ma miejsce wtedy, kiedy nie występują mutacje, nie działa dobór naturalny ani dryf genetyczny, nie zachodzi migracja, a populacja jest dostatecznie duża [5].

Ryciny 13, 14 i 15 przedstawiają sposób przeprowadzenia oceny wartości dowodowej badania identyfikacyjnego. Na rycinie 13 zestawiono wzory na obliczenie częstości występowania określonego genotypu w populacji, co ma miejsce w pierwszym etapie analizy statystycznej. W następnym etapie mnożymy przez siebie częstości genotypowe uzyskane dla poszczególnych niesprzężonych ze sobą markerów, co w efekcie

końcowym daje częstość populacyjną profilu DNA (rycina 14). Ostatnim etapem analizy statystycznej jest obliczenie prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności profili DNA z wykorzystaniem wzoru na odwrotność częstości, który przedstawia rycina 15.

$$\begin{aligned} AA &= f(a)^2 \\ \text{Populacja} \rightarrow \underline{\text{HWE}} \rightarrow BB &= f(b)^2 \\ AB &= 2f(a) \times f(b) \end{aligned}$$

Ryc. 13. Wzory na obliczenie częstości genotypowej homozygot (AA, BB) oraz heterozygoty (AB) na podstawie częstości występowania poszczególnych alleli w populacji, gdzie $f(a)$ – częstość występowania allela A, $f(b)$ – częstość występowania allela B.

$$f(\text{profilu}) = f(\text{marker}_1) \times f(\text{marker}_2) \times f(\text{marker}_3) \times f(\text{marker}_n)$$

Ryc. 14. Wzór na obliczenie częstości (f) profilu wielolokusowego będącego iloczynem częstości genotypowej poszczególnych markerów DNA, gdzie n oznacza kolejny marker.

$$1/f(\text{profilu}) = \text{prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności}$$

Ryc. 15. Wzór na obliczenie prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności będący odwrotnością częstości populacyjnej profilu (f).

W ten oto sposób wnioskujemy, że analizowany genotyp pojawi się statystycznie średnio raz na określoną liczbę osób (n) co oznacza, iż można oczekiwać, że powtórzy się on w grupie stanowiącej dwukrotność tej liczby osób ($2n$) w populacji.

Rozdział 4

Bazy danych DNA oraz nowoczesne programy do ich obsługi.

4.1 Bazy danych oraz ich standaryzacja.

Obecne badania identyfikacyjne przeprowadzane są głównie z wykorzystaniem markerów typu STR, czyli krótkich sekwencji tandemowych powtórzeń. Wielkość cząsteczki oscyluje tu w przedziale 100 do 450 par zasad, natomiast motyw repetytywny, posiadający od 2 do 6 nukleotydów, powtarza się w wyznaczonym miejscu genomu, tzw. locus zmienną ilość razy dając od kilku do kilkudziesięciu wariantów – alleli [3].

Na potrzeby organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości na całym świecie stworzone zostały jednolite standardy analizy markerów STR oraz komputerowe bazy danych. Bazy profili DNA w znacznym stopniu ułatwiają identyfikację przestępców oraz nieznanymi zwłok ludzkich.

Bardzo istotną kwestią jest unifikacja standardów badawczych tak, aby możliwa była wymiana informacji między różnymi ośrodkami badawczymi. Po raz pierwszy rejestrację profili DNA o zasięgu ogólnokrajowym stworzono w 1995 r. w Wielkiej Brytanii. Jest to tzw. baza NDNAD (ang. *The UK National Criminal Intelligence DNA Database*). W Stanach Zjednoczonych narodowy rejestr powstał trzy lata później. Natomiast w 1997 r. Rada Unii Europejskiej zaprosiła państwa członkowskie do utworzenia krajowych baz profili genetycznych.

Podstawą baz danych jest 7 loci STR, tzw. loci ENFSI: D3S1358, vWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, FGA. ENFSI (ang. *European Network of Forensic Science Institutes*) oznacza Europejską Sieć Laboratoriów Nauk Sądowych, której celem jest opracowywanie standardów badań genetycznych oraz zapewnienie optymalnych warunków

ich rozwoju, jak również efektywne popularyzowanie nauk sądowych w całej Europie [13].

Na terenie Stanów Zjednoczonych bazy danych DNA funkcjonują w oparciu o utworzony w 1993 r. system CODIS (*Combined DNA Index System*), czyli 7 loci STR z zakresu ENFSI, 6 loci dodatkowych oraz locus genu amelogeniny pozwalający na określenie płci. CODIS jest standardem opracowanym przez FBI, służącym przede wszystkim do gromadzenia i komputerowego porównywania profili DNA. Jest strukturą elastyczną, umożliwiającą tworzenie sieci międzynarodowej, a tym samym spełniającą wymagania wymiany danych DNA w ramach współpracy międzynarodowej. Narodowe bazy danych skonstruowane w oparciu o zakresy ENFSI lub CODIS ulegają często poszerzeniu o dodatkowe markery. Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Komendy Głównej Policji wybrało przykładowo jako podstawę powstającej w naszym kraju bazy danych DNA zestaw SGM Plus obejmujący 7 loci ENFSI oraz dodatkowo 4 inne loci, w tym locus amelogeniny [12].

W polskiej bazie danych DNA gromadzi się i przetwarza profile:

- osób wymienionych w art. 74 i 192a Kodeksie postępowania karnego, tj. oskarżonych, podejrzanych, osób podejrzanych oraz innych osób, co do których brak było przesłanek do usunięcia z akt sprawy i zniszczenia pobranego od nich lub utrwalonego materiału dowodowego,
- osób o nieustalonej tożsamości oraz osób usiłujących ukryć swoją tożsamość,
- zwłok ludzkich o nieustalonej tożsamości,
- śladów nieznanymi sprawcami przestępstw, na przykład śladów znalezionych na miejscu przestępstwa, gdy ich pochodzenia nie można przypisać do konkretnej osoby [22].

Wraz z wprowadzeniem nowych multipleksowych zestawów w zakresie markerów STR ulegają poszerzeniu zakresy oznaczeń

wprowadzanych do baz danych, co skutkuje zwiększeniem siły dowodowej analizy z zakresu identyfikacji osobniczej.

Rycina 16 przedstawia zestawy multipleksowych markerów aktualnie badanych w analizach z zakresu genetyki sądowej.

Zestaw multipleks PCR	SGM Plus	SEfiler Plus	Sinofiler	Identifiler	PowerPlex ES	PowerPlex 16	NGM SElect	Humantype Chimera
Marker DNA								
D3S1358	+	+	+	+	+	+	+	
vWA	+	+	+	+	+	+	+	
D8S1179	+	+	+	+	+	+	+	
D21S11	+	+	+	+	+	+	+	
D18S51	+	+	+	+	+	+	+	+
TH01	+	+	+	+	+	+	+	
FGA	+	+	+	+	+	+	+	
CSF1PO			+	+		+		
D5S818			+	+		+		
D7S820			+	+		+		
D13S317			+	+		+		
TPOX		+		+		+		
D16S539	+	+	+	+		+	+	
D2S1338	+	+	+	+			+	
D19S433	+	+	+	+			+	
SE33		+			+		+	+
Penta E						+		
Penta D						+		
D10S2325								+
D22S1045							+	
D2S441							+	
D1S1656							+	
D12S391							+	
D10S1248							+	
D4S2366								+
D6S474								+
D8S1132								+
D12S391			+					+
D2S1360								+
D3S1744								+
D5S2500								+
D7S1517								+
D21S2055								+
D6S1043			+					+

Ryc. 16. Zestawienie autosomalnych loci typu STR przy użyciu najczęściej wykorzystywanych multipleksowych zestawów. Zielonym kolorem zaznaczono zestaw loci **ENFSI**, niebieskim kolorem dodatkowe loci systemu **CODIS**. Innymi kolorami oznaczono pozostałe loci tetranukleotydowe, za wyjątkiem trzech **pentanukleotydowych** oznaczonych na czerwono i jednego trójnukleotydowego D22S1045 [7].

Oprócz unifikacji zakresów badawczych istotną kwestią jest prawidłowość oznaczeń, która jest weryfikowana w ramach programów atestacyjnych. W Polsce standardy badań w zakresie genetyki sądowej definiuje Komisja Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, która przeprowadza atestację co 2 lata. Aktualna lista placówek, które spełniają wymagane standardy widnieje na oficjalnej stronie internetowej Komisji [15]. Międzynarodową standaryzację jakości badań zapewnia m. in. atest GEDNAP (ang. *German DNA Profiling Group*), tj. atest w zakresie śladów biologicznych Niemieckiej Grupy do Spraw Profilowania [14].

4.2 Nowoczesne oprogramowania jako narzędzie w analizach identyfikacyjnych.

Postęp w zakresie badań DNA przyczynił się do stworzenia programów komputerowych, które znacznie ułatwiły pracę biegłego genetyka. Obecnie najczęściej wykorzystywanym w zakresie genetyki sądowej w Polsce jest program DNASat, którego pierwsza wersja powstała w 2005r. Jest on niemal corocznie unowocześniany, a ostatnia jego wersja z 2010r. zawiera szerokie spektrum narzędzi obliczeniowych [1]. Oprogramowanie DNASat ma zastosowanie do szeroko pojętej obsługi bazy danych i ich archiwizacji oraz w obliczeniach biostatystycznych. Wszystkie składowe bazy mogą być dowolnie modyfikowane lub usuwane. Całą bazę można przeszukiwać według oznaczonych pól zawierających np. imię, nazwisko, numer sprawy, itp.

Po wprowadzeniu profilu DNA oznaczonego u konkretnej osoby lub w badanym śladzie biologicznym, w oparciu o oprogramowanie DNASat obliczamy jego częstość populacyjną, a następnie prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności. Otrzymany wynik zobrazowany na rycinie 17 świadczy, iż dany profil pojawi się w populacji z częstością $4,56 \times 10^{-20}$.

Prawdopodobieństwo jego przypadkowej zgodności wynosi 1 na $2,19 \times 10^{19}$ osób, tzn., że powtórzy się w populacji ok. $4,38 \times 10^{19}$ osób. Wartość ta przekracza liczbę ludzi żyjących na Ziemi ($6,8 \times 10^9$) ok. 10 000 000 000 razy. Oprogramowanie DNASat jest również pomocne w identyfikacji ofiar katastrof masowych czy zamachów terrorystycznych. Umożliwia przeszukiwanie baz danych profili DNA osób pod kątem ich pokrewieństwa, co obrazuje rycina 18.

DNASat 2.1

Dane populacyjne Baza genotypów Obliczenia Obliczenia grupowe Zleceniodawcy Ustawienia Info Zakończ

Ślady

Wybierz próbkę F_{ST} 0.00000 CP 0.00000

Numer: 1 Nazwisko: PODEJRZANY Imię: Sygnatura:

Układ	Allel 1	p(Allel 1)	Allel 2	p(Allel 2)	f	p(X X)
D8S1179	13	0.304	15	0.103	0.062624	0.062624
D21S11	28	0.183	28	0.183	0.033489	0.033489
D7S820	10	0.273	11	0.205	0.111725	0.111725
CSF1PO	10	0.291	12	0.313	0.182479	0.182479
D3S1358	15	0.236	18	0.152	0.071896	0.071896
TH01	8	0.104	9.3	0.305	0.063440	0.063440
D13S317	11	0.375	13	0.090	0.067410	0.067410
D16S539	10	0.046	12	0.332	0.030830	0.030830
D2S1338	23	0.104	24	0.114	0.023826	0.023826
D19S433	13	0.216	15	0.197	0.085085	0.085085
vWA	16	0.181	20	0.015	0.005430	0.005430
TPDX	8	0.569	10	0.057	0.064809	0.064809
D18S51	17	0.144	17	0.144	0.020880	0.020880
D5S818	11	0.328	12	0.359	0.235473	0.235473
FGA	23	0.121	24	0.132	0.032076	0.032076

$f_{TOTAL} < 0.00000000000000000001 = 1 / 2.193E019 = 4.56E-020$
 $p(X|X)_{TOTAL} < 0.00000000000000000001 = 1 / 2.193E019 = 4.56E-020$

Oblicz Zapisz do XLS Drukuj Zamknij

Ryc. 17. Przykład obliczeń wykonanych w programie DNA Stat v. 2.1 z wykorzystaniem funkcji obliczeń częstości profilu DNA i prawdopodobieństwa jego przypadkowej zgodności w populacji.

DNASat 2.1

Dane populacyjne Baza genotypów Obliczenia Obliczenia grupowe Zleceniodawcy Ustawienia Info Zakończ

Rodzic - dziecko

Wybierz rodzica/dziecko P apriori 0,50000 null 0,00000

Rodzic Numer: 11 Nazwisko: DZIECKO I Imię: Sygnatura:

Numer	Nazwisko	Imię	Sygnatura	PI	W
12	MĘŻCZYŃNA I			92 324,126406133247700000	0,999989168712365428
155				0,000045173405695657	0,000045171365151253
199				0,000006029510227570	0,000006029473872796
90				0,000005006368609163	0,000005006343545562
102				0,000000562560890893	0,000000562560574419
92				0,000000119894548801	0,000000119894534426
55				0,000000063123128120	0,000000063123124135
165				0,000000021021349769	0,000000021021349327
71				0,000000004598181502	0,000000004598181481
67				0,000000001286734508	0,000000001286734507
48				0,000000000875288391	0,000000000875288390
24				0,000000000305233796	0,000000000305233796
79				0,000000000261784877	0,000000000261784877
181				0,000000000185347497	0,000000000185347497
136				0,000000000057300705	0,000000000057300705
184				0,000000000037953711	0,000000000037953711
53				0,000000000020394988	0,000000000020394988

Oblicz Zapisz do LS Zamknij

Ryc. 18. Przykład obliczeń wykonanych w programie DNA Stat v. 2.1 z wykorzystaniem funkcji przeszukiwania bazy danych profili DNA.

Podsumowanie

Przed erą nadań DNA identyfikację osobniczą przeprowadzano z zastosowaniem analizy w obrębie układów grupowych erytrocytów, enzymów krwi oraz białek surowicy. Wyniki tych badań nie pozwalały na jednoznaczną identyfikację osoby, gdyż opierały się na detekcji fenotypu i posiadały niską siłę dyskryminacji. O ich niskiej przydatności decydowała również szybka degradacja pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska.

Wprowadzenie analizy DNA do nauk medyczno – sądowych w połowie lat osiemdziesiątych zadecydowało o jakościowym przełomie. Odtąd nastąpił szybki postęp w zakresie technik i metod badawczych. Aktualna analiza z zakresu genetyki sądowej stanowi jedno z podstawowych narzędzi w egzekwowaniu prawa. Ekstremalnie wysoki polimorfizm pozwala na jednoznaczną identyfikację osoby na podstawie pozostawionego przez nią śladu biologicznego.

Bardzo ważnym aspektem badań DNA jest ich standaryzacja, wykorzystanie nowoczesnych narzędzi obliczeniowych oraz przeprowadzanie ich w atestowanych laboratoriach przez wykwalifikowaną kadrę specjalistów z zakresu genetyki sądowej.

Bibliografia

1. Berent J.: DNAStat wersja 2.1 – program do obsługi bazy danych profili genetycznych oraz do obliczeń biostatystycznych. Arch. Med. Sąd. i Krym. 2010, 60, 118-126
2. Berent J., Jacewicz R., Szram S.: Ewolucja poglądów Sądu Najwyższego dotyczących dowodu w badaniach DNA w sprawach dochodzenia ojcostwa. Arch. Med. Sąd. i Krym. 2002, 52, 3, 195-204.
3. Branicki W., Kupiec T., Wolańska-Nowak P.: Badania DNA dla celów sądowych. Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków 1998
4. Dobosz T.: Zarys hemogenetyki. Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław 1992
5. Drewa G.: Genetyka populacyjna. W: Podstawy genetyki dla studentów i lekarzy. Drewa G., Ferenc T. (red.) Urban&Partner, Wrocław 2005, 517-628
6. Gawęda-Walerych K., Sołtyśzewski I.: Zastosowanie analizy mitochondrialnego DNA w badaniach kryminalistycznych-perspektywy. Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie, Kraków 2005, 248
7. Jacewicz R.: Badanie polimorfizmu DNA u osób po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy w aspekcie jego konsekwencji dla analiz z zakresu genetyki sądowej. Pracownia Genetyki Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź 2009
8. Jacewicz R.: Polimorfizm kwaśnej fosfatazy (ACP1) w populacji regionu łódzkiego (Polska centralna). Arch. Med. Sąd Krym. 1995, 45, 51-54

9. Jacewicz R.: Polimorfizm PGM1, GLO i ESD w populacji regionu łódzkiego. Arch. Med. Sąd. Krym. 1997, 47, 193-196
10. Jacewicz R., Lewandowski K., Rupa-Matysek J., Jędrzejczyk M., Brzeziński P. M., Dobosz T., Jonkisz A., Szram S., Komarnicki M., Berent J.: Donor-driven DNA in hair follicles of recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2010, 45, 1638-1644
11. Kupiec T., Branicki W.: Badania genetyczne domniemanych szczątków generała Władysława Sikorskiego. Instytut Ekspertyz Sądowych, Kraków 2009, 59, 9-14
12. Młodziejowski B., Sołtyśzewski I.: Ślady biologiczne. W: Ślady kryminalistyczne. Ujawnianie, zabezpieczanie, wykorzystanie. Goc M., Moszczyński I. (red.) Centrum Doradztwa i Informacji Difin, Warszawa 2007, pp. 125-186
13. Oficjalna strona internetowa Europejskiej Sieci Laboratoriów Nauk Sądowych, http://www.enfsi.eu/get_doc.php?uid=80
14. Oficjalna strona internetowa Niemieckiej Grupy do Spraw Profilowań Śladów Biologicznych <http://gednap.org/>
15. Oficjalna strona internetowa Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, <http://ptmsik.pl/wadze/komisja-genetyki-sadowej.html>
16. Pawłowski R.: Medyczno-sądowe badanie śladów biologicznych. Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie, Kraków 1997
17. Pujal J. M., Gallardo D.: PCR-based methodology for molecular microchimerism detection and quantification. Exp. Biol. Med. 2008, 233, 1161-1170
18. Słomski S.: Analiza DNA teoria i praktyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008

19. Sołtyszewski I., Filewicz A.: Bazy danych DNA w Europie – rozwiązania legislacyjne. Wydawnictwo Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP, Warszawa 2003
20. Turowska B., Kołodziej J.: Cechy Gm(1) i Gm(2) w ludzkim nasieniu i w plamach nasienia. Arch. Med. Sąd. Krym. 1981, 31, 255-258
21. Ustawa z dnia 10 stycznia 2003r. o zmianie ustawy - Kodeks postępowania karnego, ustawy – Przepisy wprowadzające Kodeks postępowania karnego, ustawy o świadku koronnym oraz ustawy o ochronie informacji niejawnych. Dz.U.2003.17.555
22. Ustawa z dnia 17 grudnia 2004r. o zmianie ustawy o Policji oraz ustawy - Kodeks postępowania karnego. Dz.U.2005.10.70
23. Ustawa z dnia 6 czerwca 1997r. Kodeks postępowania karnego. Dz.U.97.89.555 z późniejszymi zmianami
24. Ustawa z dnia 6 kwietnia 1990r. o Policji. Dz.U.2007.43.277 (tekst jednolity) z późniejszymi zmianami

Spis rycin

- Rycina 1. Charakterystyka podstawowych grup krwi układu ABO.....6
- Rycina 2. Schemat reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*).....16
- Rycina 3. Przykładowy wynik badania autosomalnych loci STR i locus amelogeniny znakowanych zielonym barwnikiem fluorescencyjnym w reakcji multipleks PCR.....18
- Rycina 4. Przykładowy wynik badania loci Y-STR z wykorzystaniem znakowania czterema barwnikami fluorescencyjnymi.....19
- Rycina 5. Wykres reakcji real – time PCR dla kontroli ujemnej, w której nie ujawniono DNA. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka. (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).....22
- Rycina 6. Wykres reakcji real – time PCR uzyskany w oparciu o analizę próby zawierającej męski materiał genetyczny. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).....23
- Rycina 7. Wykres reakcji real – time PCR uzyskany w oparciu o analizę próby zawierającej wyłącznie żeński materiał genetyczny. Kolor fioletowy – kontrola reakcji PCR, kolor niebieski – męski materiał genetyczny, kolor

czerwony – materiał genetyczny pochodzący od człowieka. (7500 Real – Time PCR System, oprogramowanie SDS HID v 1.1).....	24
Rycina 8. Wykres zbiorczy reakcji real – time PCR uzyskany dla analizowanych prób DNA. Poszczególnymi kolorami oznaczono DNA pochodzące z badanych materiałów.....	25
Rycina 9. Krzywa wzorcowa uzyskana w oparciu o reakcję real-time PCR standardów DNA, służąca do oceny stężenia badanych prób.....	26
Rycina 10. 7500 Real – Time PCR System, dedykowany do analizy DNA w aspekcie identyfikacji osobniczej, znajdujący się w Pracowni Genetyki Sądowej w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.....	27
Rycina 11. Siła dyskryminacji poszczególnych markerów typu STR wykorzystywanych w identyfikacji osobniczej.....	30
Rycina 12. Schemat opiniowania w badaniach identyfikacyjnych.....	32
Rycina 13. Wzory na obliczenie częstości genotypowej homozygot (AA, BB) oraz heterozygoty (AB) na podstawie częstości występowania poszczególnych alleli w populacji, gdzie $f(a)$ – częstość występowania allela A, $f(b)$ – częstość występowania allela B.....	33
Rycina 14. Wzór na obliczenie częstości (f) profilu wielolokusowego będącego iloczynem częstości genotypowej poszczególnych markerów DNA, gdzie n oznacza kolejny marker.....	33
Rycina 15. Wzór na obliczenie prawdopodobieństwa przypadkowej	

zgodności będący odwrotnością częstości populacyjnej profilu (f).....33

Rycina 16. Zestawienie autosomalnych loci typu STR przy użyciu najczęściej wykorzystywanych multipleksowych zestawów. Zielonym kolorem zaznaczono zestaw loci ENFSI, niebieskim kolorem dodatkowe loci systemu CODIS. Innymi kolorami oznaczono pozostałe loci tetranukleotydowe, za wyjątkiem trzech pentanukleotydowych oznaczonych na czerwono i jednego trójnukleotydowego D22S1045 [7].....36

Rycina 17. Przykład obliczeń wykonanych w programie DNA Stat v. 2.1 z wykorzystaniem funkcji obliczeń częstości profilu DNA i prawdopodobieństwa jego przypadkowej zgodności w populacji.....38

Rycina 18. Przykład obliczeń wykonanych w programie DNA Stat v. 2.1 z wykorzystaniem funkcji przeszukiwania bazy danych profili DNA.....39