

**Michał Witt**Zakład Genetyki Człowieka PAN  
Poznań**Zastosowanie metod biologii  
molekularnej do badania  
wysuszonych plam krwi****1. Wstęp**

Badanie materiału biologicznego jako dowodu w śledztwie stało się zadaniem powszechnie stosowanym w laboratoriach policyjnych i medyczo-sądowych. Materiał ten może być analizowany przy użyciu różnych metod; wyniki takich badań w sposób zasadniczy ułatwiają, czy wręcz umożliwiają rozwiązanie problemu identyfikacji osobników. Jednakże materiał biologiczny zabezpieczony na miejscu przestępstwa, np. krew czy nasienie, dociera do laboratorium medyczo-sądowego z reguły w postaci plam, których stopień wysuszenia oraz wiek często znacznie limitują użycie do bardziej skomplikowanych analiz.

Ostatnio wysuszone plamy krwi zwróciły uwagę tak biologów molekularnych, jak i medyków sądowych zajmujących się badaniami molekularnymi. Wykazano, że plamy takie z powodzeniem mogą służyć jako źródło DNA, którego jakość oraz ilość pozwala nawet na analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (RFLP) poprzez standardową technikę Southerna (1). Metody te z dużym powodzeniem przeniesiono do laboratoriów medyczo-sądowych, gdzie stały się narzędziem umożliwiającym identyfikację materiału biologicznego oraz osobników (2,3,4,5,6).

Użycie wysuszonych na bibule plam krwi od dawna znalazło zastosowanie w screeningowych badaniach biochemicznych noworodków. Po raz pierwszy użyto tego materiału biologicznego do masowych badań zmierzających w kierunku fenyloketonurii w tzw. teście Guthriego (7), a następnie do diagnostyki wielu innych genetycznie uwarunkowanych bloków metabolicznych (8,9). Zalety tak przygotowanego materiału do badań w laboratorium diagnostycznym – to techniczna łatwość kolekcjonowania, transportu i przechowywania. Wysuszone plamy krwi nadają się do powszechnego użycia na masową skalę w przesiewowych testach i znacznego zautomatyzowania procedury diagnostycznej (8). W kilku pracowniach biologiczno-molekularnych użyto wysuszonych plam krwi do medycznych badań diagnostycznych na poziomie DNA, w wielu z nich posługując się techniką PCR, do diagnostyki anemii sierpowatej (10), mukowiscydozy (11), fenyloketonurii (12) oraz zaburzeń rozwoju cięlesno-płciowego (13).

**2. Przygotowanie materiału i ekstrakcja DNA**

Prezentowana metoda pozwala na szybką i stosunkowo prostą detekcję DNA części centromerowej chromosomu Y w genomowym DNA zawartym w wysuszonej plamie krwi. Około 50  $\mu$ l (lub mniej) krwi obwodowej, najlepiej pobranej na EDTA, wykraplano na bibulę Whatman 3MM i suszono na powietrzu. Po dowolnym czasie przechowywania w temperaturze pokojowej plamę moczono w małej objętości (2–3 ml) 0,85% roztworu NaCl przez kilka godzin, oddzielano od bibuły filtracyjnej i zwirowywano w mikrowirówce. Odsączony osad zawieszano w 50  $\mu$ l wody sterylnej i inkubowano w temp. 95–100°C przez ok. 10 min, w celu uwolnienia DNA. Tak uzyskany nie oczyszczony roztwór DNA używano jako matrycę do enzymatycznej amplifikacji (PCR).

### 3. Przebieg PCR

Do PCR używano dwie pary oligonukleotydowych primerów: Y1, Y2 – (specyficznych dla alfoidalnych sekwencji powtarzalnych centromeru chromosomu Y) oraz X1, X2 (specyficzne dla analogicznych sekwencji chromosomu X – kontrola). Wszystkie cztery oligomery zawierają po 20 nukleotydów, których sekwencja podana została wcześniej (13). Flankują one fragmenty wielkości: 170 par zasad (chromosom Y) i 130 par zasad (chromosom X).

Reakcję prowadzono w 100  $\mu$ l standardowej mieszaniny reakcyjnej *Cetus Corp.* przez 30 cykli, próbki inkubując przez 1 min w każdej z następujących temperatur: 55°C (hybrydyzacja), 72°C (synteza) i 94°C (denaturacja) przy użyciu 2,5 j. Taq polimerazy.

Dla aplikacji medyczno-sądowych istotne jest, że w metodzie tej użyć można również plamy krwi nie traktowanej antykoagulantem (np. ślady krwi zabezpieczone na miejscu przestępstwa). W takim przypadku plamy krwi poddawać można działaniu 2–3 ml 0,85% NaCl z dodatkiem 100 mg Proteinazy K (Boehringer Mannheim) przez ok. 5 godzin. Pozostałe etapy procedury są analogiczne jak już opisano.

Elektroforetyczną analizę produktów prowadzono w mini-żelu z 4% agarozy mieszanej (3% NuSieve agarose, 1% analytical grade agarose) w buforze TBE, w obecności bromku etydyny.

### 4. Wyniki amplifikacji

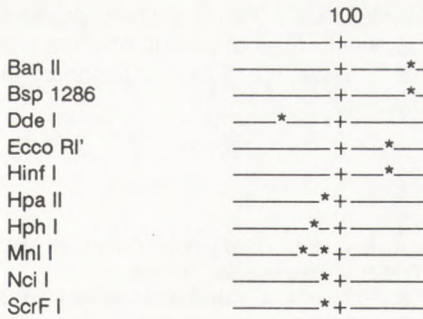
Jeżeli jako matrycy do PCR używano DNA z krwi mężczyzn, w wyniku reakcji prowadzonej w obecności pary primerów Y1, Y2 to zawsze uzyskiwano produkt o długości 170 par zasad (układ diagnostyczny). Na matrycy tego samego DNA, w obecności primerów X1, X2 uzyskiwano produkt o długości 130 par zasad (układ kontrolny). Natomiast wówczas, gdy do reakcji prowadzonej w identycznych warunkach jako matrycy używano DNA z krwi kobiet, w obecności primerów Y1, Y2 nie uzyskiwano żadnych produktów amplifikacji, a w przypadku obecności primerów X1, X2 zawsze amplifikacji podlegał fragment o długości 130 par zasad.

Opisane warunki reakcji zoptymalizowane zostały tak, by całkowicie zlikwidować tło niespecyficznej amplifikacji (6). Stwierdzono, że zarówno specyficzność jak i wydajność amplifikacji są niezależne od stężenia  $Mg^{2+}$  w zakresie 1–10 mM. To zaskakujące w pierwszej chwili spostrzeżenie, znalazło później również potwierdzenie w innych doniesieniach (14).

### 5. Charakterystyka produktu PCR oraz czułość metody

W celu bliższego scharakteryzowania produktu PCR uzyskiwanego na matrycy DNA otrzymanego z krwi mężczyzn, produkt reakcji wyizolowano z żelu i poddano analizie restrykcyjnej. Wielkość produktów trawienia enzymami *Ddel*, *Hinfl*, *HpaII*, *NciI*, *EcoRI* odpowiadała dokładnie produktom przewidywanym na podstawie analizy komputerowej miejsc restrykcyjnych w obrębie sekwencji produktu o długości 170 par zasad (rys. 1). Fakt ten potwierdził identyczność uzyskiwanego produktu jako amplifikowanego fragmentu chromosomu Y. Porównanie *consensus sequence* o długości 340 par zasad z obrębu sekwencji alfoidalnych chromosomu X i Y ujawniło ok. 70% homologii pomiędzy nimi (15). Jednakże dzięki lokalizacji primerów w regionach o minimalnej homologii pomiędzy X i Y test zawsze wykazywał pełną specyficzność.

W celu określenia granic czułości opracowanej metody, jako materiału wyjściowego używano również plamy odpowiadające mniejszej objętości krwi żyłnej niż standardowe 50  $\mu$ l. Dodać trzeba, że wysuszony na bibule odpowiednik 50  $\mu$ l krwi powszechnie używany jest w teście Guthriego. W naszych doświadczeniach używane były również plamy odpowiadające 25  $\mu$ l, 10  $\mu$ l i 5  $\mu$ l krwi żyłnej. Mniejszych plam już nie używano ze względu na trudności techniczne w ich przygotowaniu. Prawidłowe produkty PCR uzyskano ze wszystkich wyżej wymienionych plam, tak w reakcji z primerami specyficznymi dla chromosomu Y jak i X. Jedyna różnica polegała na tym, że w miarę malejącej objętości wyjściowej krwi, prążki produktów PCR były coraz bledsze.



Rys. 1. Mapa restrykcyjna sekwencji alfoidalnych chromosomu Y o długości 170 par zasad. Gwiazdkami oznaczono przybliżoną lokalizację miejsc restrykcyjnych.

Synteza obu produktów reakcji (170 bp i 130 bp) w jednej próbówce – w wyniku reakcji prowadzonej w opisanych warunkach w obecności obu par primerów oligonukleotydowych (X1, X2 oraz Y1, Y2) nie udało się. Uzyskiwano zawsze jedynie produkt kontrolny 130 bp, będący produktem amplifikacji fragmentu chromosomu X. Zmiany stosunku ilościowego primerów pary X i Y, na korzyść tych pierwszych, nie odniosły tutaj pozytywnego rezultatu. Synteza obu fragmentów w jednej próbówce możliwa była po obniżeniu temperatury hybrydyzacji do 37°C, jednakże odbywało się to każdorazowo kosztem specyficzności reakcji. Manifestowało się to znacznym wzrostem tła (6).

## 6. Podsumowanie

Opisana metoda detekcji DNA chromosomu Y, czyli identyfikacji płci, oparta na zasadzie enzymatycznej amplifikacji DNA jest kolejnym przykładem zastosowania metod biologii molekularnej w szeroko pojętej diagnostyce medycznej. Możliwość wykorzystania minimalnych ilości DNA zawartych w wysuszonych plamach krwi sprawia, że metoda ta wydaje się szczególnie wygodna do użycia w badaniach medyczno-sądowych. Opisane tutaj plamy krwi, wykraplanej na bibułę filtracyjną w laboratorium, traktować można jedynie jako model śladów biologicznych zabezpieczanych np. na miejscu przestępstwa. W praktyce klinicznej wysuszone plamy krwi, przygotowywane dla wszystkich noworodków i przechowywane w celu przeprowadzenia testu Guthriego, stanowią olbrzymie źródło DNA dla retrospektywnych badań molekularnych opartych na takiej samej zasadzie. Bez względu na to, czy DNA używany jako matryca w teście, izolowany był tradycyjną metodą fenolowo-chloroformową czy też uzyskiwany był na drodze opisanej prostej elucji z plam krwi, wzór produktów PCR nie różnił się i zawsze w sposób jednoznaczny wykazywał różnice specyficzne dla płci. Anuluje to konieczność pracochłonnego przygotowywania materiału do badań molekularnych i pozwala na użycie do tego celu DNA zupełnie nie oczyszczonego.

Znaczna czułość tej metody pozwala na użycie znikomych ilości wyjściowego materiału biologicznego – pozytywne rezultaty uzyskiwano używając plamy będącej odpowiednikiem zaledwie 5  $\mu$ l krwi żyłnej. Spodziewać się można, że nawet jeszcze mniejsze plamy mogłyby zostać użyte w tym teście. Ma to znaczenie nie tylko w badaniach medyczno-sądowych, gdzie możliwość użycia tak niewielkiej ilości materiału jest oczywistą zaletą, ale również w diagnostyce medycznej: w praktyce oznacza to, iż bazując tylko na jednej standardowej wysuszonej plamie krwi przeprowadzić można by około dziesięciu niezależnych badań. Znaczna czułość PCR jest dobrze udokumentowana i pozwala na użycie jako materiału wyjściowego, np. komórek naskórka policzków uzyskanych na drodze płukania jamy ustnej (16), pojedynczego korzenia włosa (17), nie zapłodnionego oocytu (18), czy pojedynczego plemnika (19).

Przedstawiona metoda jest technicznie łatwa i bardzo szybka, pozwalająca ustalić płeć osobnika w przeciągu paru godzin od momentu rozpoczęcia obróbki materiału biologicznego, którym mogą być wyschnięte plamy krwi, nasienia, itp. W okresie trzech lat jej stosowania zawsze wykazywała pełną specyficzność działania.

## Literatura

1. McCabe E. R. B., Huang S-Z., Seltzer W. K., Law M. L., (1987), *Hum. Genet.*, 75, 213.
2. Kanter E., Baird M., Shaler R., Balazs I., (1986), *J. Forensic Sci.*, 31, 403.
3. Tyler M. G., Kirby L. T., Wood S., Vernon S., Ferris J. A. J., (1986), *Forensic Sci. Int.*, 31, 267.
4. Fokushima H., Hasekura H., Nagai K., (1988), *J. Forensic Sci.*, 33, 621.
5. Kobayashi R., Nakauchi H., Nahahori Y., Nakagoma Y., Matsuzawa S., (1988), *J. Forensic Sci.*, 33, 613.
6. Witt M., Erickson R. P., (1990), DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science, red. Lee H. C., Gaensslen R. E., 98-113, Year Book Medical Publishers.
7. Guthrie R., (1961), *JAMA*, 17, 863.
8. Guthrie R., (1980), Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism, red. Bickel H., Guthrie R., Hammersen G., 259-270, Springer, New York.
9. Orfanos A. P., Naylor E. W., (1984), *Clin. Chim. Acta*, 138, 267.
10. Rubin E. M., Andrews K. A., Kan Y. W., (1989), *Hum. Genet.*, 82, 134.
11. Williams C., Weber L., Williamson R., Hjelm M., (1988), *Lancet* II, 693.
12. Lyonett S., Cailland C., Rey F., Berthelon M., Frezal J., Rey J., Munnich A., (1988), *Lancet* I, 507.
13. Witt M., Erickson R. P., (1989), *Hum. Genet.*, 82, 271.
14. Saiki R., (1989), komunikat ustny.
15. Wolfe J., Darling S. M., Erickson R. P., Craig D. W., Buckle V. J., Rigby P. W. J., Willard H. F., Goodfellow P. N., (1985), *J. Mol. Biol.*, 182, 477.
16. Lench N., Stanier P., Williamson R., (1988), *Lancet* I, 14.
17. Higuchi R., Beroldingen C. H. von Sensabaugh, G. F., Erlich H. A., (1988), *Nature*, 332, 543.
18. Rappolee D. A., Brenner C. A., Schultz R., Mark D., Werb Z., (1988), *Science*, 241, 1823.
19. Li H., Gyllensten U. B., Cui X., Saiki R. K., Erlich H. A., Arnheim N., (1988), *Nature*, 335, 414 .

## Application of molecular biology methods for blood testing

### Summary

In this paper a simple, rapid and reliable test for sex diagnosis has been described. The test is based on detection of aliphoid satellite sequences in undigested genomic DNA using the polymerase chain reaction (PCR) and dried blood specimens serving as the source of DNA. When female DNA was used as a template for the reaction, only the expected X-chromosome-specific fragment was detected, while with male DNA both X-specific and Y-specific-fragments were detected. The Y-chromosome-specific fragment was further characterized by restriction enzyme analysis. The Y fragment was detectable when DNA obtained from an equivalent of 5  $\mu$ l of spotted blood was used in the reaction. This test may find applications in sexing of human DNA for forensic purposes, in following host versus graft cells in patients with bone marrow transplants from the opposite sex or in searching for XO/XY mosaicism in patients with Turner syndrome.

### Adres dla korespondencji:

Michał Witt, Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań.