



Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Monica Abreu-Głowacka

**Przydatność wybranych Y-SNPs w badaniach śladów
biologicznych techniką real-time PCR**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: prof. zw. dr hab. n. med. Zygmunt Przybylski

POZNAŃ 2012

Podziękowania

*Serdeczne podziękowania składam mojemu promotorowi
prof. zw. dr. hab. n. med. Zygmuntovi Przybylskiemu
za cenne rady i pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy
oraz wszystkim, którzy przyczynili się do jej powstania.
Dziękuję także Rodzicom, mojemu Kochanemu Mężowi
oraz Ukochanej Córcie za wsparcie.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	1
1.1. Real-time PCR	3
1.1.1. Etapy reakcji real-time	5
1.1.1.1. Denaturacja podwójnej nici DNA	5
1.1.1.2. Hybrydyzacja starterów oraz amplifikacja DNA	5
1.1.1.3. Temperatura topnienia	5
1.1.1.4. Chłodzenie	6
1.1.2. Detekcja fluorescencji – produktów PCR metodą real-time.....	6
1.1.2.1. Detekcja fluorescencji z użyciem SYBR™ Green I.....	6
1.1.2.2. Sondy molekularne	7
1.1.2.2.1. Sondy Taqman	9
1.1.2.2.2. Sondy Beacons.....	10
1.1.2.2.3. Sondy Scorpion.....	11
1.1.2.2.4. Sondy SimpleProbe®	12
1.1.2.2.5. Sondy Eclipse™.....	13
1.1.2.2.6. Sondy Cyclicons™.	14
1.1.3. Optymalizacja reakcji PCR.....	15
1.1.3.1. Stężenie jonów Mg ²⁺	15
1.1.3.2. Przyłączenie primerów (ang. annealing)	15
1.1.3.3. Czas elongacji primerów	16

1.1.3.4. Czas i temperatura denaturacji.....	16
1.1.3.5. Ilość cykli.....	17
1.1.3.6. Primery	17
1.1.3.7. Enzym polimeraza Taq.....	17
1.1.3.7.1. FastStart DNA Master Hybprobe	18
1.1.3.8. Matrycowy DNA	18
1.1.3.9. Inhibitory reakcji PCR.....	19
1.2. Badania na chromosomie Y w Medycynie Sądowej	19
1.2.1. Markery chromosomu Y oraz ich lokalizacja chromosomalna	20
1.2.1.1. Badania przy użyciu markerów Y-STR.....	22
1.2.3. Badania populacyjne polimorfizmu markerów Y-STR.....	24
1.3. Polimorfizm Pojedynczego Nukleotydu (SNP).....	25
1.3.1. Rola markerów Y-SNPs w genetyce sądowej.....	26
1.3.1.1. Wybór SNPs na chromosomie Y (Y-SNPs)	27
1.3.2. Metody analiz markerów SNPs	28
1.3.2.1. Hybrydyzacja – ASO.....	29
1.3.2.1.1. Proces FRET	29
1.3.2.1.2. Detekcja fluorescencyjna i mikromacierze DNA	30
1.3.2.2. Elongacja (wydłużanie starterów).....	30
1.3.2.2.1. Minisekwencjonowanie	30
1.3.2.2.1.1. Metoda SnapShot	31

1.3.2.2.1.2. Metoda Maldi-TOF MS	31
1.3.2.2.1.3. Mikromacierze	31
1.3.2.2.2. Allelospecyficzne wydłużenie	32
1.3.2.2.3. Pirosekwencjonowanie	32
1.3.2.3. Metoda OLA (ang. oligonucleotide ligation assay).....	33
1.3.2.4. Inwazyjny podział.....	33
1.4. Wstępne badania śladów biologicznych.....	33
1.4.1. Metody wykrywania śladów krwi	34
1.4.2. Metody wykrywania śladów nasienia.....	35
1.4.2.1. Test PSA	36
1.4.2.2. Test RSID™ - semen.....	36
1.4.2.3. Technika ALS (ang. alternative light source).....	37
2. CEL PRACY	38
3. MATERIAŁ I METODY.....	39
3.1. Materiał.....	39
3.2. Metody	44
3.2.1. Wstępne badania śladów biologicznych.....	44
3.2.2. Izolacja DNA	44
3.2.3. Oczyszczanie DNA.....	48
3.2.4. Pomiar stężenia DNA	49
3.2.5. Real-time PCR z barwnikiem SYBR Green I - sY81	49

3.2.6. Metoda LightSNiP	51
3.2.6.1. Real-time PCR testem LightSNiP oraz Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.....	54
3.2.6.1.1. Optymalizacja warunków reakcji PCR.....	55
3.2.7. Badania metodą STR-PCR	55
3.2.8. Analiza biostatystyczna	59
4. WYNIKI	60
4.1. Wyniki uzyskane z barwnikiem SYBR-Green I - sY81 oraz testem LightSNiP - rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.	72
4.2. Analiza śladów biologicznych metodą LightSNiP.	75
4.3. Analiza zdegradowanego DNA metodą LightSNiP..	83
4.4. Genotypy uzyskane oraz obliczenia statystyczne.....	85
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	87
6. WNIOSKI.....	106
7. STRESZCZENIE	107
8. SUMMARY	109
9. SPIS WYKRESÓW	110
10. PIŚMIENICTWO	151

WYKAZ SKRÓTÓW

^{32}P → Radioaktywny izotop fosforu

ALS → Alternatywne źródło światła (*ang. Alternative Light Source*)

ASO → Hybrydyzacja z sondami allelospecyficznymi

CCD → Matryca CCD (*ang. Charge Coupled Deviece*)

cDNA → komplementarny DNA

Ct, Cp → Cykl progowy – poziom tła

DC → Wskaźnik dyskryminacji (*ang. Discrimination capacity*)

dNTP → Deoksynukleotydy

FRET → Proces transferu energii

Ft → Maksymalna fluorescencja emitowana

G + C → Związek guanina – cytozyna

GD → Zróżnicowanie w obrębie układów (*ang. Gene Diversity*)

GDB → *Human Genome Database*

HapMap Project → Haplotypowa Mapa Ludzkiego genomu

HD → Zróżnicowanie w obrębie haplotypów (*ang. Haplotype Diversity*)

HLA-DQ α → antygen zgodności tkankowej

ID → Numer referencyjny SNPs (np. rs17222279)

LD → Nierównowaga sprzężeń (*ang. Linkage Disequilibrium*)

MALDI-TOF MS → Spektrofotometria masowa metodą jonizacji laserowej

MGB → *Minor Groove Binder*

mRNA → Matrycowy RNA (*ang. Messenger RNA*)

NCBI → *National Center for Biotechnology Information*

NRY → *Non-recombining Region of the Y chromosome*

OLA → Technika ligacji nukleotydów (ang. *Oligonucleotide Ligation Assay*)

PAR1 } Pseudoautosomalny region na chromosomie Y lub X
PAR2 }

PCOs → Cykliczne oligonukleotydy

PCR → Reakcja Łańcuchowa Polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PSA → Antygen prostaty

Real-time PCR → Reakcja Łańcuchowa Polimerazy w czasie rzeczywistym

RSID™-semen → *Rapid Stain Identification of Human Semen*

RT-PCR → Odwrotna transkrypcja PCR (ang. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

SNP → Polimorfizm pojedynczego locus

SRY → *Sex- determining Region Y*

ssDNA → Forma jednoniciowa DNA (ang. *single stranded DNA*)

STR → Krótkie tandemowe powtórzenia (ang. *Short Tandem Repeats*)

STR-PCR → Analiza krótkich tandemowych powtórzeń metodą PCR

SYBR Green I → organiczny związek chemiczny ($C_{32}H_{37}N_4S^+$)

T_m → Temperatura topnienia (ang. *Melting Temperature*)

YCC → *The Y Chromosome Consortium*

Y-SNP → Polimorfizm pojedynczego locus na chromosomie Y

Y-STR → Krótkie tandemowe powtórzenia na chromosomie Y

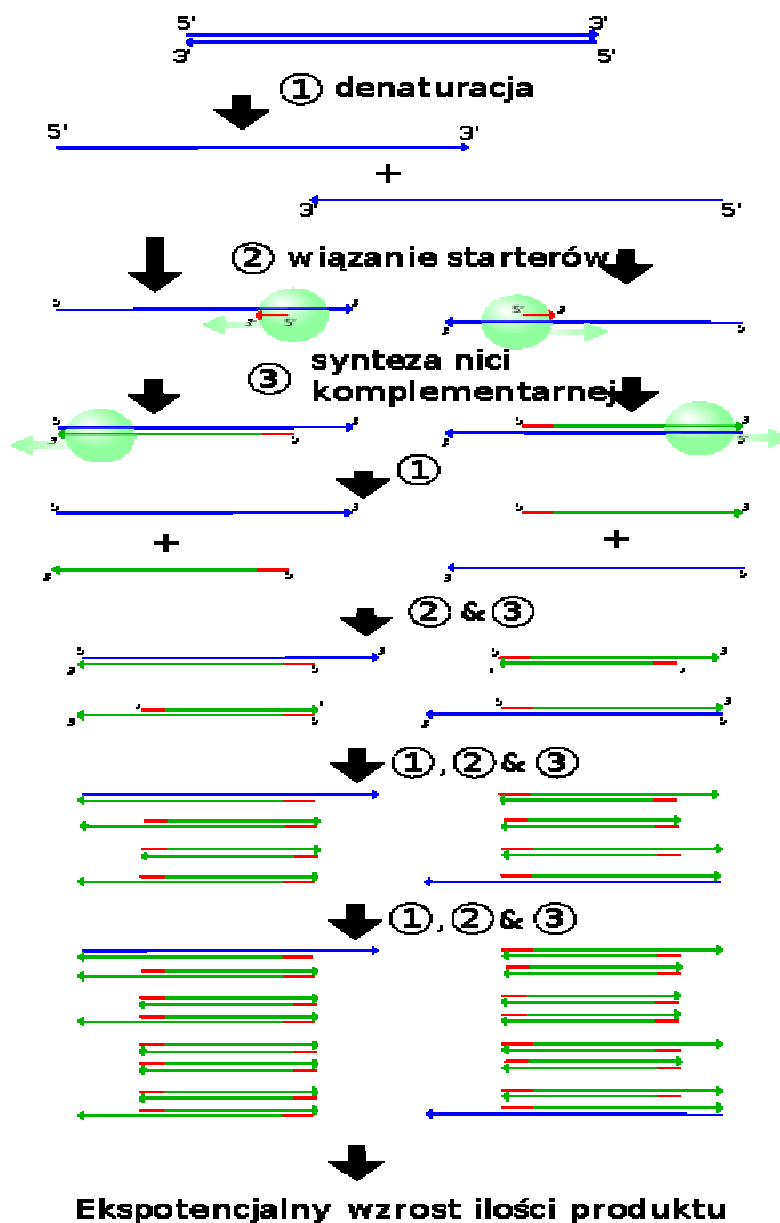
WSTĘP

W ostatniej dekadzie rozwój technik molekularnych wskazuje na rewolucyjną transformację w diagnostyce medycznej oraz w medycynie sądowej [189].

Naukowcy zajmujący się inżynierią genetyczną przez wiele lat pracowali nad uzyskaniem odpowiedniej ilości DNA do celów analitycznych. Inspiracją była metoda naśladowania procesu replikacji zachodzącego w komórce w warunkach *in vitro*. Dzięki temu powstała metoda powielania, czyli amplifikacji DNA metodami laboratoryjnymi [111, 138].

Kary Mullis z pomocą swoich współpracowników wyizolował z bakterii *Thermus aquaticus*, żyjącej na co dzień w gorących źródłach, odporną na wysokie temperatury polimerazę DNA, enzym służący do syntezy, a czasem naprawy DNA w komórce [138]. Badania zostały przeprowadzone na genie kodującym β -globinę w diagnostyce anemii sierpowatej [111, 137, 138]. W 1985r. wykorzystał tę cechę do zaprojektowania procesu, który w efekcie pozwolił na amplifikację krótkich fragmentów DNA. Metoda ta nazywa się PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy. Należy wspomnieć, że Kary Mullis przywrócił do życia metodę już wcześniej znaną. Podstawowe zasady reakcji PCR zostały bowiem opisane przez Kleppego i Khoranę w 1971r [106]. Z kolei Artur Kornberg w 1955 roku odkrył enzym, polimerazę DNA. Był to pierwszy krok do poznania molekularnych mechanizmów replikacji. Reakcja replikacji katalizowana przez biokatalizator, jakim jest polimeraza, polega na przyłączaniu wolnych nukleotydów do jednoniciowej struktury łańcucha DNA. Od określonego końca 3' w kierunku końca 5' do istniejącej nici będącej matrycową dołączane są na zasadzie komplementarności trifosforany nukleotydów. Po połączeniu z matrycą tworzy się typowa struktura dwuniciowego DNA [111, 156]

Reakcja łańcuchowa polimerazy ma na celu bezpośrednio amplifikować gen lub fragment DNA znajdujący się w próbce po wcześniejszej ekstrakcji oraz izolacji DNA [189, 208]. Etapy PCR to: denaturacja podwójnej nici DNA, hybrydyzacja starterów (przyłączenie primerów - annealing), amplifikacja DNA (elongacja) oraz chłodzenie. Cykl powtarza się od 20 do 50 razy w zależności od ilości materiału, który chce się uzyskać.



Ryc. nr 1.1. Etapy reakcji PCR [245].

Cechy reakcji PCR, takie jak specyficzność oraz czułość, pozwoliły na uzyskanie wielu kopii matrycowego DNA, nawet w stanie degradacji, co skłoniło naukowców do zastosowania tej reakcji w medycynie sądowej do badań śladów biologicznych [137, 138]. W 1988r. po raz pierwszy w medycynie sądowej przeprowadzono reakcję PCR, badając polimorfizm loci HLA-DQ α na szczątkach 3 letniej dziewczynki [15, 66, 184, 185].

Początkowo reakcję PCR przeprowadzono przez ręczne dodawanie polimerazy do każdego cyklu oraz zmiany temperatur w łaźniach wodnych. W latach 80- tych

pokazały się pierwsze komercyjne termocyklery, gdzie umieszczano małe plastikowe probówki w metalowych blokach [137, 138]. Na podstawie reakcji PCR powstała metoda PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR), która różni się od klasycznego PCR tym, że posiada system monitorujący, który pozwala śledzić reakcję PCR przy pomocy techniki fluorescencyjnej [137].

Na początku lat 90-tych Higuchi i współpracownicy stworzyli system do detekcji produktów PCR podczas ich gromadzenia się. Metoda ta zawierała w mieszaninie reakcyjnej interkalującą cząsteczkę bromku etydyny [51]. W reakcji użyto zmodyfikowanego termocyklera z możliwością napromieniowania próby światłem UV, następnie detekcja sygnału fluorescencyjnego odbyła się za pomocą kamery CCD. Minusem tej metody, oprócz rakotwórczego działania odczynników, była detekcja fluorescencji generowanej przez niespecyficzne produkty, która sumowała się z fluorescencją badanej próby [51, 189, 208]. Interkalacja jest zjawiskiem stworzenia stabilnych wiązań pomiędzy DNA a różnymi ligandami. Na przykład, etydyna interkaluje między sąsiadującymi nukleotydami wzdłuż DNA, powodując lokalne rozkręcenie o 26° [245].

W kolejnych pracach barwnik bromek etydyny zastąpiono mniej toksycznym związkiem i bardziej specyficznym barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green I [73]. W późniejszym etapie dzięki specyficznym sondom molekularnym udoskonalono metodę real-time PCR, zwiększając dokładność oraz czułość reakcji PCR [73].

1.1. Real-time-PCR

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym charakteryzuje się tym, że amplifikacja oraz detekcja amplifikowanego produktu przeprowadzane są równocześnie w tej samej probówce, co ogranicza ryzyko zanieczyszczenia oraz skraca czas reakcji. Inną ważną zaletą tej metody jest możliwość ilościowej analizy produktów amplifikacji uzyskanych w każdym cyklu reakcji łańcuchowej polimerazy poprzez detekcję fluorescencji. Emisja fluorescencji uzyskana w reakcji jest proporcjonalna do ilości amplifikowanego DNA [62, 126, 228].

Technika real-time PCR w genetyce sądowej pozwala na pomiar ilości DNA, sekwencji DNA na chromosomach X i Y oraz mitochondrialnego DNA [174]. Metoda ta pozwala również na szybką identyfikację innych gatunków, mikroorganizmów oraz patogenów, co ma istotne znaczenie w genetyce sądowej w badaniu materiału znalezionej po długim upływie czasu [22].

W początkowych cyklach reakcji amplifikacji powolne powielanie produktu jest równoznaczne z niskim poziomem emisji fluorescencji, która przedstawiona jest jako tło (ang. Background) [19, 23, 54, 133, 228]. W następnych etapach zwiększająca się ilość produktów PCR jest proporcjonalna do emitowanej fluorescencji. Cykl, w którym fluorescencja przekracza poziom tła, nazywany jest cyklem progowym Ct lub Cp (ang. Threshold cycle lub Crossing point). W tym cyklu badana matryca zostaje amplifikowana a emitowana fluorescencja osiąga maksymalną wartość Ft (ang. Fluorescence treshold) [16, 19, 54, 93, 126, 132, 133, 228, 229].

Od cyklu progowego zaczyna się wczesna faza logarytmiczna PCR. Im wyższe stężenie matrycy na początku reakcji PCR, tym mniej cykli potrzeba, aby moc emitowanej fluorescencji przekroczyła poziom tła [208]. Porównywanie Ct próby badanej z krzywą wzorcową pozwala na uzyskanie informacji o liczbie kopii sekwencji analizowanej. Krzywa wzorcowa powstaje na podstawie porównywania wartości Ct uzyskanych dla szeregów prób zawierających różne ilości badanej matrycy [19, 125, 132, 133, 228].

Metoda real-time PCR ma liczne zastosowanie między innymi w badaniach nad ekspresją mRNA, przy obliczaniu ilości kopii DNA, ilości kopii transgeniczných, w badaniach dyskryminacji allelicznej oraz w potwierdzeniu danych uzyskanych na mikromacierzach [247]. Metodę tę stosuje się również z dużym powodzeniem w diagnostyce molekularnej, w mikrobiologii klinicznej i żywnościowej, w onkologii klinicznej, w terapii genowej oraz medycynie sądowej [62, 125, 228].

PCR w czasie rzeczywistym posiada ograniczenia, między innymi trudność zaprojektowania eksperymentu, standaryzacji protokołów metody, wyboru odczynników, przygotowania matrycy oraz analizy danych. Jeżeli którykolwiek z tych czynników zostanie nieprawidłowo dobrany, otrzymane wyniki mogą doprowadzić do błędnych wniosków [51, 153, 173].

Ważny jest sposób zabezpieczenia materiału, transport i przechowywanie. Na jakość matrycy, która zostanie poddana badaniu, ma również wpływ zastosowana metoda izolacji; powinna być ona wolna od inhibitorów odwrotnej transkrypcji oraz od nukleaz (ważne przy długim przechowywaniu) [16, 24].

1.1.1. Etapy reakcji real-time

Parametry amplifikacji są zależne od matrycy, primerów oraz zastosowanego termocyklera. Reakcja PCR zawiera następujące etapy:

- ✓ denaturację podwójnej nici DNA,
- ✓ hybrydyzację starterów oraz amplifikację DNA,
- ✓ topnienie,
- ✓ chłodzenie.

1.1.1.1. Denaturacja podwójnej nici DNA

Denaturacja DNA polega na rozdzieleniu podwójnej nici DNA na dwie pojedyncze nici poprzez zerwanie wiązań wodorowych pomiędzy nićmi. Denaturację przeprowadza się w temperaturze 94°C - 95°C przez 0,5 - 2 min. W sytuacji, kiedy matrycowy DNA jest bogaty w GC, ten etap można przedłużyć od 3 do 4 min. W ten sposób rozdzielone nici DNA są gotowe do następnego etapu - przyłączenia starterów [151, 220].

1.1.1.2. Hybrydyzacja starterów oraz amplifikacja DNA

Temperatura annealingu powinna być o 5°C niższa od temperatury topnienia primerów. Przyłączenie starterów przeprowadza się przez 0,5 – 2 min. Przeważnie temperatura łączenia starterów oscyluje między 50°C a 60°C. Primery łączą się komplementarnie do pojedynczej nici DNA od końca 5' [151, 220]. Po annealingu temperatura rośnie do 72°C, pozwalając na optymalną pracę polimerazy DNA. Czas polimeryzacji, zwany też elongacją, zależy od wielkości amplifikowanego fragmentu. Przyjmuje się, że na odcinek 1000 nukleotydów polimeraza Taq potrzebuje 1 minuty [151, 220]. Na tym etapie kończy się pierwszy cykl. Aby namnożyć badany fragment DNA do dalszych badań, powtarza się ten cykl około 25 do 50 razy w zależności od użytej matrycy [220].

1.1.1.3. Temperatura topnienia - T_m

Wzrost temperatury w PCR powoduje destabilizację podwójnej struktury DNA wywołując rozdzielenie nici. Temperaturę, w której 50% DNA ulega denaturacji, nazywa się temperaturą topnienia DNA – T_m. Temperatura topnienia zależy od długości badanej cząsteczki DNA oraz sekwencji nukleotydowej. W dobrze dobranych warunkach reakcji PCR, oligonukleotyd tworzy komplementarną strukturę z docelowym DNA. Pojedyncze

miejsce, w którym zasady nie tworzą pary, uniemożliwia tworzenie hybrydy. Aby osiągnąć taki poziom precyzji warunków, temperatura inkubacji musi być tuż poniżej temperatury topnienia oligonukleotydu.

1.1.1.4. Chłodzenie

Po etapie amplifikacji – działania polimerazy Taq w temperaturze 72°C, temperatura zostaje obniżona (do około 4°C) i w ten sposób przerywa się pracę polimerazy oraz zachowuje w odpowiednich warunkach produkt PCR do dalszych badań [151, 220].

1.1.2. Detekcja fluorescencji – produktów PCR metodą real-time

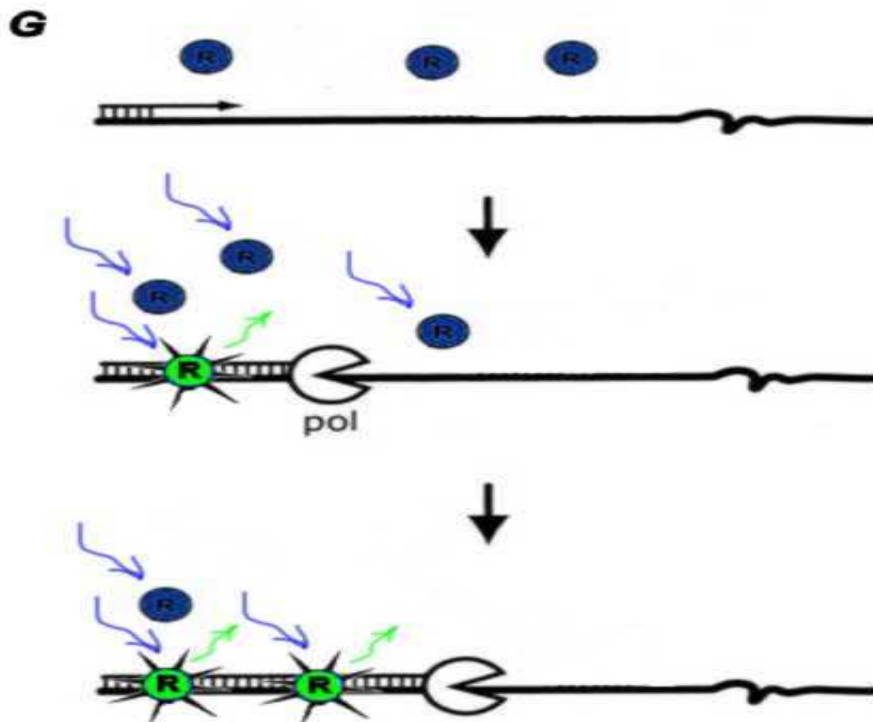
Systemy detekcji sygnału fluoroscencyjnego mogą być różne. Początkowo zastosowano niespecyficzną metodę detekcji fluorescencji z użyciem bromku etydyny. Później wprowadzono bardziej specyficzną metodę detekcji emisji fluorescencji z wykorzystaniem sond oligonukleotydowych oznakowanych na końcu 5' ³²P, natomiast pomiar produktów związanych z tym radioizotopem okazał się trudnym etapem, wymagającym rozdzielania chromatograficznego [23]. Wprowadzenie sond fluorogenowych połączyło dwie metody w badaniach z polimerazą: pierwszą opartą na ilościowym pomiarze fluorescencji w czasie rzeczywistym a drugą z możliwością identyfikacji docelowego DNA poprzez analizę emisji fluorescencji po reakcji PCR [23].

1.1.2.1. Detekcja fluorescencji z użyciem SYBR™ Green I

Pierwsza reakcja real-time PCR przeprowadzona została w 1997r. przez Ririe K M i Wittwera C [49, 249]. Fluorochrom SYBR Green I jest barwnikiem, który interkaluje w najmniejszym rowku cząsteczki DNA i emituje fluorescencje tylko w momencie związania się z podwójnym łańcuchem DNA. Metoda jest bardzo ekonomiczna, natomiast tak jak w przypadku bromku etydyny, barwnik ten interkaluje do każdej dwuniciowej cząsteczki DNA, w tym również do niespecyficzných produktów PCR. W takiej sytuacji po zakończeniu procesu amplifikacji przeprowadza się analizę krzywej topnienia produktów w mieszaninie reakcyjnej [228]. Krzywa topnienia powstaje w wyniku podnoszenia temperatury do 95°C z równoczesnym wykresem fluorescencji. Wraz ze wzrostem temperatury poziom

fluorescencji etapowo zmniejsza się. Efekt ten spowodowany jest wzrostem ruchu cząsteczek związanego barwnika [22, 24, 228].

W momencie, kiedy temperatura mieszaniny reakcyjnej osiągnie wartość, przy której nici DNA rozdzielają się, czyli temperaturę topnienia produktu (ang. melting temperature, T_m), cząsteczki fluorochromu uwalniają się a fluorescencja gwałtownie spada [62, 125, 228]. Temperatury topnienia poszczególnych produktów są cennym źródłem informacji o specyficzności reakcji. Amplikon, który nas interesuje, ma zwykle wyższą temperaturę topnienia niż dimery starterów. Nie jest ona jednak wyższa niż 80°C [24, 54, 125, 173, 228].



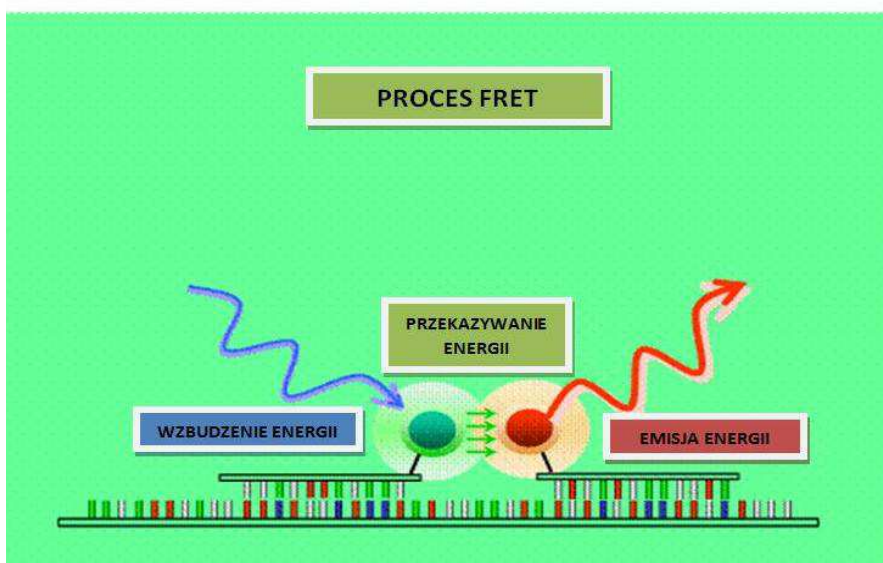
Ryc. nr 1.2. Zasady reakcji PCR systemem fluorescencyjnym SYBRTM Green I.

Inne fluorochromy o działaniu podobnym do SYBRTM Green I to: SYBRTMGold, YoYoTM-1, Yo-ProTM-1, AmplifluorTM oraz LUXTM primers [23].

1.1.2.2. Sondy molekularne

Inną formą detekcji fluorescencji metodą real-time PCR są sondy hybrydujące takie, jak: TaqMan, Beacons, Scorpions, SimpleProbe®, EclipseTM, CycliconsTM i inne. Ich działanie opiera się na reakcji FRET (ang. Fluorescent Resonant Energy Transfer) - procesie transferu energii fluorescencji z jednego fluorochromu do drugiego [35, 152, 189, 193, 228].

Teoria FRET została opracowywana przez Theodora Förstera w latach 40-tych. Pierwsze badania biologiczne, w których wykorzystano FRET przeprowadzono w 1970r. w analizie białek. W połowie lat 80-tych i początku 90-tych powstały pierwsze publikacje z wykorzystaniem FRET do badań genetycznych DNA [41, 55, 63]. Proces FRET powstaje wtedy, kiedy sonda z większą energią, nazywaną dawcą „Reporter”, przekazuje fluorochrom do znajdującej się blisko sondy z niską energią, nazywaną biorcą – wygaszacz „Quencher”. W ten sposób energia zostaje przekazana z jednego barwnika do drugiego a dodatkowo w trakcie fazy elongacji polimeraza degraduje sondę dzięki swojej aktywności 5'→ 3' egzonukleazy [41, 94], uwalniając „Reportera”- dawcę, który w momencie oddzielania się od „Quenchera” - wygaszacza emituje fluorescencję. Sygnał fluorescencji powstaje tylko wtedy, kiedy sonda hybryduje komplementarnie do sekwencji matrycowego DNA, w tym przypadku jest to sonda „Reporter”. Fluorescencja generowana w każdym cyklu reakcji jest proporcjonalna do ilości produktu amplifikowanego (ryc. nr 1.3) [23].



Ryc. nr 1.3. Zjawisko FRET.

Sondy molekularne są to oligonukleotydy oznakowane jednym fluorochromem dawcą na końcu 5', który przekazuje fluorescencję oraz jednym fluorochromem biorcą na końcu 3', który absorbuje fluorescencję uwolnioną przez fluorochrom dawcę.

Powszechnie stosowane barwniki na końcu 5'-„reporterowe” to: FAM (6-karboksylofluoresceina), TET (tetrachloro-6-karboksylo-fluoresceina) oraz VIC (nazwa zastrzeżona przez ABI, USA) [189, 228].

Do barwników wykorzystanych na końcu 3' – „wygaszacze” należą: TAMRA (6-karboksylotetrametylorodamina) oraz DABCYL [kwas 4-(4'-dimetyloaminofenyloazo) benzoesowy] [152, 228]. W ostatnich latach pojawiły się na rynku inne barwniki wygaszacze, takie jak BHQ™-1 i BHQ™-2 z firmy Biosearch Technology's oraz Epoch's Eclipse Dark. Wygaszacze te charakteryzują się tym, że posiadają niskie tło fluorescencyjne, co w efekcie pozwala na uzyskanie większej specyficzności oraz szerokiego zakresu absorbancji, umożliwiającego analizę multipleksową [23].

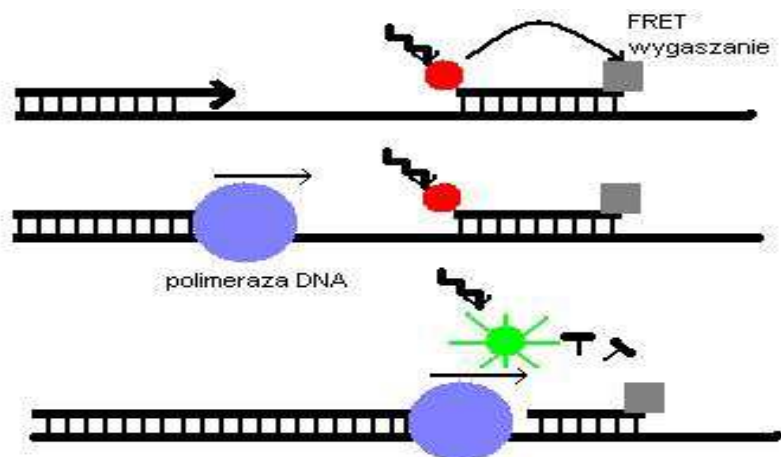
Najczęściej stosowanym wygaszaczem jest DABCYL, ponieważ może on znajdować się bardzo blisko sekwencji „Reporter”, co pozwala na sprawne przekazanie energii. Używany jest on również do syntezy oligonukleotydów „Reporter” i „Quencher” typu Beacons [23].

Ważnym czynnikiem w reakcji PCR z sondami molekularnymi jest wybór optymalnego stężenia primerów oraz sond, które pozwolą na śledzenie poziomu fluorescencji [126, 152, 153]. Ponieważ ilościowy pomiar kopii DNA równa się do poziomu fluorescencji w każdym cyklu, dlatego temperatura topnienia sond powinna być wyższa od temperatury topnienia oczekiwanej w badanych próbach [243].

Zaleca się, aby temperatura topnienia sond była o 5°C - 10°C wyższa od temperatury topnienia primerów w tej samej nici DNA. Sekwencja docelowa może się znajdować w dowolnym miejscu amplifikowanej sekwencji DNA, natomiast sondy powinny być zlokalizowane daleko od primerów, aby zmniejszyć rywalizację sonda – primer [243].

1.1.2.2.1. Sondy TaqMan

Sondy te są oligonukleotydami o długości ok. 20 – 30 pz. Można je nazwać „sondami hydrolizującymi”, które przez aktywność egzonukleazową powodują emisję fluorescencji oraz rozdzielają sondę „Reporter” i sondę „Quencher”. Podczas każdego cyklu PCR sonda rozpoznaje komplementarny fragment DNA i wiąże się z nim pomiędzy miejscami przyłączania starterów. Podczas fazy logarytmicznej PCR w każdym cyklu wraz ze wzrostem stężenia produktu hybryduje z nim więcej sondy. W trakcie degradacji uwalnia się fluorochrom a efektem tego w każdym kolejnym cyklu jest zwiększenie się poziomu fluorescencji (ryc. nr 1.4) [8, 54, 125, 126, 153, 228, 229].

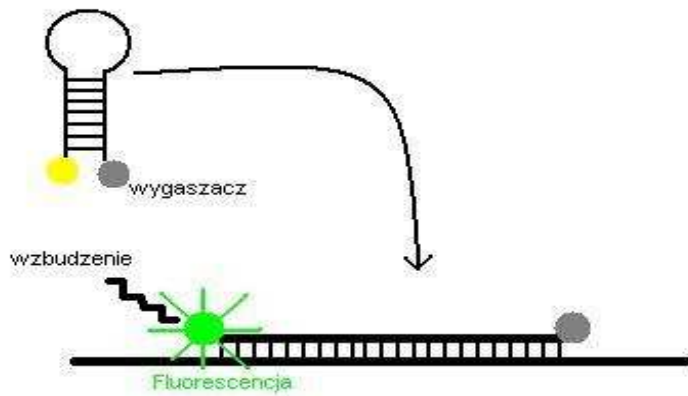


Ryc. nr 1.4. Proces działania Sondy Hybrydującej typu TaqMan.

Inne „sondy hydrolizujące” to sondy na bazie lantanowców. Technologia opiera się na czasowym multipleksowym działaniu związków lantanowców techniką real – time PCR, wykorzystując proces transferu energii z jednego fluorochromu do drugiego (FRET), natomiast cząsteczki lantanowców utrzymują bardzo długo aktywność fluorescencyjną, co pozwoliło na wykorzystanie związków tych metali jako dawców energii.[23].

1.1.2.2.2. Sondy Beacons

Sondy te są oligonukleotydami z jedną cząsteczką z fluorochromem i drugą z wygaszaczem na każdym końcu. Różnią się od sond TaqMan tym, że do wzbudzenia fluorescencji nie potrzebują aktywności egzonukleazy [8, 54, 125, 153, 189, 228]. Kiedy są wolne w mieszaninie reakcyjnej, to przyjmują formę „szpilki do włosów” (posiadają dwa ramiona z komplementarnymi sekwencjami) [191], co umożliwia zbliżenie fluorochromów, pozwalające na wygaszenie przez dawcę fluorescencji biorcy. W obecności komplementarnej sekwencji matrycy sonda rozwija się i hybryduje do niej. Barwnik oddala się od wygaszacza, co umożliwia emisję fluorescencji (ryc. nr 1.5) [8, 54, 125, 126, 153, 228, 229].



Ryc. nr 1.5. Działanie sondy hybrydującej typu Beacons.

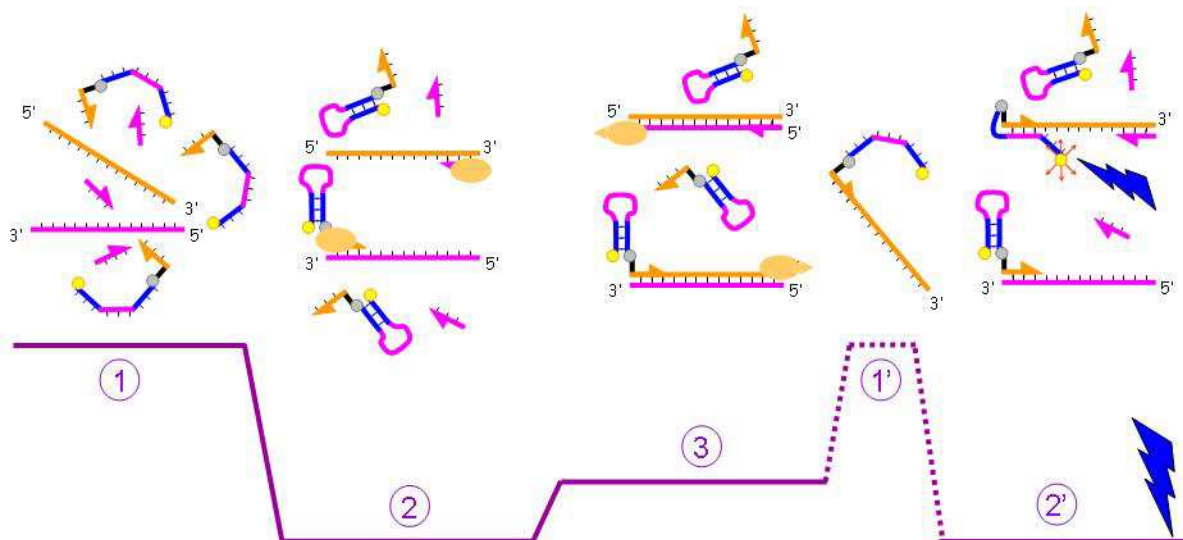
Sondy typu Beacons stosuje się w badaniach interakcji białko - DNA, w detekcji enzymatycznego podziału ssDNA, w śledzeniu techniką real-time PCR wewnątrztkankowej hybrydyzacji mRNA oraz w analizie mutacji poprzez badania polimorfizmu pojedynczego locus [23].

Specyficzność sond molekularnych typu Beacons pozwala na dokładne wykrywanie chromosomu Y w blastomerach oraz w mRNA w pojedynczych komórkach [23].

1.1.2.2.3. Sondy Scorpions

Detekcję specyficznej sekwencji primera oraz produktu PCR osiąga się poprzez jeden nukleotyd. Sonda, w momencie kiedy nie hybryduje, przyjmuje formę „szpilki do włosów”. Fluorochrom łączy się do 5' końca, który znajduje się naprzeciwko quenchera związanego do końca 3' [189]. Sekwencja pętli jest komplementarna do produktu elongacji primera, do którego sonda jest przyłączona. Pomiędzy końcem 5' a 3' znajduje się specyficzny starter, który nie amplifikuje się oraz blokuje polimerazę DNA i wygaszacz fluorescencji [8, 54, 126, 228, 229].

Hybrydyzacja sondy z komplementarnym fragmentem DNA powoduje otwarcie struktury w formie szpilki, a tym samym oddalenie fluorochromu od wygaszacza, wzbudzenie oraz rejestrację fluorescencji. Fragment blokujący pracę polimerazy zapobiega wydłużaniu końca 3' produktu PCR (ryc. nr 1.6) [126, 228].



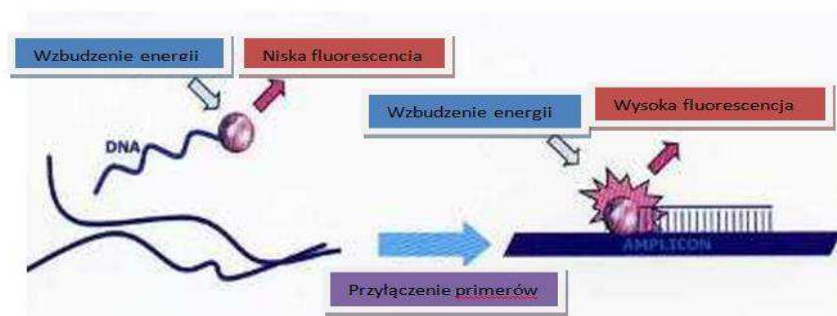
Ryc. nr 1.6. Schemat przedstawiający działanie sond typu Scorpions.

Sondy Scorpions wykorzystane są do detekcji mutacji poprzez badania SNP, do analizy ludzkich papillomawirusów oraz do różnicowania patogennych grzybów żyjących w roślinach [23].

1.1.2.2.4. Sondy SimpleProbe®

Sonda SimpleProbe® to pojedynczy oligonukleotyd związany z zielonym barwnikiem na końcu 5' lub 3'. Częsteczka zawierająca fluorochrom emituje fluorescencję w chwili hybrydyzacji z docelową sekwencją DNA. Należy wziąć pod uwagę koniec sekwencji wokół związanej sondy SimpleProbe®. Guanozyny znajdujące się w komplementarnej sekwencji mogą potencjalnie redukować sygnał fluorescencyjny sondy SimpleProbe®. Innym ważnym czynnikiem jest długość amplikonu. Do reakcji z sondą SimpleProbe® zaleca się amplikon o długości od 100 do 200 pz [123]. Zastosowanie sond SimpleProbe® jest różne, między innymi w badaniach SNPs. Ostatnie postępy w metodzie real-time PCR opierają się na systemach pozwalających uzyskać rezultaty bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej, zmieniając metodę real-time PCR na mniej czasochłonną oraz mniej pracochłonną. Przy pomocy powyższych sond stworzono test LightSNiP, który opiera się na Polimorfizmie Pojedynczego Nukleotydu (SNP) znajdującego się w GenBanku (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [243].

W skład testu LightSNiP wchodzi SimpleProbe® zawierający sondy fluorescencyjne oraz primery. Sondy hybrydują przy pomocy procesu FRET (ryc. nr 1.7).



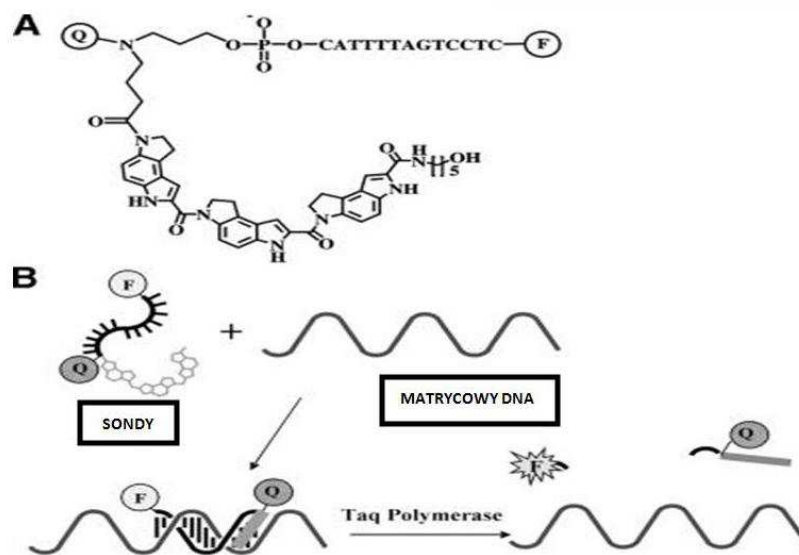
Ryc. nr 1.7. Działanie oraz efekt zestawu LightSNiP z sondą SimpleProbe® [243].

1.1.2.2.5. Sondy Eclipse™

Sondy te mają liniową formę. Wygaszacz fluorescencji (quencher) zawiera małą sekwencję zmodyfikowanych nukleotydów, nazywaną minor groove binder – MGB i przyłączoną na końcu 5' wygaszacza. Na końcu 3' znajduje się fluorochrom. Sondy te można porównać do sond hydrolizujących. Obecność MGB na końcu 5' i działanie polimerazy Taq powoduje powstanie formy Eclipse [23].

Technologia MGB ma ogromne zastosowanie w real-time PCR, ponieważ z łatwością można zaprojektować zestaw primerów potrzebnych do analizy trudnych regionów ludzkiego genomu; partycypacja w reakcji zmodyfikowanych nukleotydów może zlikwidować przeszkody, które mogą powstać w wyniku obecności sekwencji sond bogatych w A, T lub G [23].

Wygaszacz z MGB w większym stopniu redukuje tło w porównaniu z powszechnie zastosowanymi wygaszaczami, takimi jak TAMRA™ lub DABCYL (ryc. nr 1.8) [23, 175].



Ryc. nr 1.8. Schemat przedstawiający działanie sond typu Eclipse™.

1.1.2.2.6. Sondy Cyclicons™.

Sondy te znane również jako - cykliczne oligonukleotydy (PCOs). Opierają się na działaniu dwóch fragmentów sond zawierających dwa końce 3' i dwa końce 5'. Jeden z segmentów PCO jest komplementarny do fragmentu matrycy DNA, drugi segment nazywany zabezpieczającym jest krótszy, posiada od 5 do 8 nukleotydów oraz jest pseudo komplementarny do końca 3' i końca 5' sondy niekomplementarnej do matrycy DNA, nazywanej primer-sonda (ang. antisense). Przed hybrydyzacją PCOs formują wewnątrzcząsteczkowe struktury pseudo - cykliczne, w rezultacie powstaje komplementarność między sondą zabezpieczającą i sondą antisense (ryc. nr 1.9) [23].



Ryc. nr 1.9. Schemat przedstawiający działanie sond typu Cyclicons™.

Łączenie końców 3' - 3' między PCOs zwiększa stabilność nukleazy na końcu 3', podczas gdy pseudo - cykliczne struktury na końcu 5' dostarczają dodatkowej stabilności nukleazy na końcu 3', blokując nukleazy na końcu 5' [23].

Jeżeli sonda zabezpieczająca jest komplementarna do końca 5' sondy „antisense” lub sondy-primer, oba oligonukleotydy zostaną całkowicie związane

poprzez łączenie 3' - 3'. Jeżeli sonda zabezpieczająca jest komplementarna do końca 3' sondy –primer, oba oligonukleotydy zostaną całkowicie związane poprzez łączenie 5' - 5' [23].

Dawca energii przyłącza się do wolnego końca sondy zabezpieczającej - 3' lub 5' oraz biorca energii zwiąże się do zasady wewnątrz sondy - primer. Obecność komplementarnej sekwencji matrycowego DNA w reakcji powoduje, że struktura cykliczna sformowana przez oligonukleotydy otwiera się, rozdzielając fluorochrom od „quencher” i tym samym emitując fluorescencję [23, 95].

1.1.3. Optymalizacja reakcji PCR

Optymalna reakcja amplifikacji zależy od różnych czynników takich jak: wybór primerów, temperatury oraz stężenia odczynników w buforze. Najprostszą drogą do optymalizacji reakcji PCR, mając odpowiednią parę primerów, jest zmiana stężenia $MgCl_2$ lub temperatury annealingu. Program reakcji PCR stanowi bardzo ważny czynnik do optymalizacji. Częściej wprowadzone są zmiany w temperaturze annealingu, natomiast rzadziej zmieniana jest ilość cykli, czas każdego z nich oraz temperatura [27, 65, 192, 205, 231].

1.1.3.1. Stężenie jonów Mg^{2+}

Stężenie jonów Mg^{2+} może mieć wpływ na przyłączenie primerów, temperaturę oddzielenia nici od matrycy oraz od produktu PCR, specyficzność produktu, powstanie artefaktu primer-dimer oraz aktywność i specyficzność enzymu. Polimerazy wymagają wolnych jonów magnezu do dokładnego związania matrycowego DNA, primerów oraz nukleotydów. Reakcja PCR może zawierać od 0,5 do 2,5 mM magnezu ponad ogólne stężenie dNTP. Obecność EDTA oraz innych inhibitorów reakcji w roztworze primerów lub matrycowego DNA może zakłócić optymalną aktywność jonów magnezu [27, 65, 192, 231].

1.1.3.2. Przyłączenie primerów (ang. annealing)

Temperatura i długość czasu przyłączenia primerów zależy od zawartości zasadowej, długości oraz stężenia primerów. Temperaturę topnienia starterów oblicza się według wzoru: $[2n (A + T) + 4n_2 (G + C)] - 5$ [184], gdzie n oznacza liczbę określonych nukleotydów. Primery powinny zawierać od 18 do 30 zasad, zawartość

nukleotydów G - C powinna stanowić od 20% do 60% w sekwencji primerów oraz temperatura topnienia powinna być podobna. Obowiązująca temperatura annealingu jest o 5°C niższa od prawdziwej T_m primerów. Ponieważ polimeraza jest aktywna w szerokim zakresie temperatur, elongacja primerów będzie możliwa przy niskich temperaturach, wliczając w to etap annealingu [37]. Ogólnie, temperatura annealingu w zakresie od 55°C do 72°C daje najlepsze rezultaty. Zalecane stężenie primerów (0,2 μM) do annealingu pozwala w krótkim czasie uzyskać oczekiwany rezultat [27, 65, 231].

Ze zwiększeniem temperatury annealingu wzrasta możliwość prawidłowego przyłączenia primerów oraz redukcja nieprawidłowej elongacji nukleotydów przy końcu 3'. Dlatego rygorystyczne przestrzeganie temperatury annealingu, przede wszystkim w trakcie pierwszych kilku cykli, może pomóc we wzroście dokładności metody [231].

1.1.3.3. Czas elongacji primerów

Czas elongacji zależy od długości i stężenia sekwencji docelowej oraz temperatury. Elongacja primerów jest dokonywana przy temperaturze 72°C, ponieważ jest bliska optymalnej temperatury aktywności polimerazy. Szacuje się, że przy temperaturze 72°C przyłączają się od 35 do 100 nukleotydów w zależności od buforu, pH, stężenia soli oraz rodzaju matrycowego DNA [37, 84]. Zwiększenie czasu elongacji o jedną minutę przy 72°C jest wystarczające, żeby uzyskać produkt o długości 2 kb i może być przydatne we wcześniejszych cyklach, jeżeli ilość substratu jest bardzo niska oraz w ostatnich cyklach wtedy, kiedy stężenie produktu przekracza stężenie enzymu (1 nM) [27, 65, 192, 231].

1.1.3.4. Czas i temperatura denaturacji

Najczęstszą przyczyną nieudanej reakcji PCR jest niekompletna denaturacja matrycy lub produktu PCR. Denaturacji w typowych warunkach dokonuje się w temperaturze 95°C przez 30 sekund lub 97°C przez 17 sekund, natomiast wyższa temperatura oraz dłuższy czas mogą być odpowiednie dla sekwencji bogatych w pary G + C. Planując parametry etapu denaturacji należy wziąć pod uwagę czas i temperaturę aktywności polimerazy. Istnieje możliwość częściowej utraty aktywności

enzymatycznej, z tego powodu Taq Polimeraza czasem dodawana jest na końcu, jako ostatni składnik mieszaniny reakcyjnej do PCR [27, 65, 192, 231].

1.1.3.5. Ilość cykli

Optymalna ilość cykli zalecana do reakcji zależy od stężenia matrycowego DNA wtedy, kiedy inne parametry reakcji zostały zoptymalizowane. Najczęściej popełniany błąd polega na zaprogramowaniu za dużej liczby cykli. Taka sytuacja może doprowadzić do uzyskania niespecyficznych produktów, a z kolei mała ilość cykli w programie utrudnia uzyskanie oczekiwanego stężenia produktu PCR [65, 231].

Tabela nr 1.1. Ilość cząsteczek DNA do uzyskania oraz zalecana liczba cykli.

Docelowa ilość cząsteczek	Zalecana liczba cykli
3×10^5	25 - 30
$1,5 \times 10^4$	30 - 35
1×10^3	35 - 40
50	40 - 45

1.1.3.6. Primery

Optymalne stężenie primerów szacuje się między 0,1 a 0,5 μM . Stężenie primerów większe, niż zalecane, może spowodować kumulację niespecyficznych produktów oraz może zwiększyć prawdopodobieństwo powstania artefaktów określonych jako primer – dimer. Aby uzyskać jak największą specyficzność reakcji PCR primery powinny zawierać od 15 do 25 nukleotydów oraz posiadać od 40 do 60 % zawartości par G/C [132]. Temperatura topnienia primerów powinna znajdować się między 55°C a 60°C [65, 128, 192, 205, 231].

1.1.3.7. Enzym polimeraza Taq

Enzym polimeraza Taq toleruje wysokie temperatury. Optymalnej aktywności tego enzymu oczekiwać można w temperaturze między 72°C - 80°C [185, 231]. Polimeraza Taq jest aktywna również w temperaturze pokojowej, co może prowadzić do powstania niespecyficznych produktów reakcji PCR. W takiej sytuacji zaleca się przed rozpoczęciem reakcji PCR poddać enzym polimerazę wysokiej temperaturze (ang. hot start) celem zwiększenia specyficzności reakcji [37, 66].

Rozwój biotechnologii pozwolił na różne modyfikacje tego enzymu. Firma Applied Biosystems wprowadziła na rynek enzym AmpliTaqGold®, który jest

nieaktywny w temperaturze pokojowej, a rozpoczyna swoje działanie po wstępnej inkubacji w 95°C przez 10 minut [13, 66]. Taki „hot start” zmniejsza możliwość powstania niespecyficzných związków, które mogą powstać przy niskich temperaturach [66, 135].

Zalecane stężenie Taq DNA polimerazy znajduje się między 1 a 2,5 jednostek (U) na 100 µl reakcji. Kiedy optymalizujemy PCR, można testować stężenie enzymu w zakresie od 0,5 do 5 U/100 µl. Jeżeli stężenie enzymu jest za wysokie, mogą się pojawić niespecyficzne produkty w tle, a jeżeli stężenie enzymu jest za niskie, można nie uzyskać oczekiwanej ilości produktu PCR [65, 128, 205, 231].

1.1.3.7.1. FastStart DNA Master HybProbe

FastStart DNA Master HybProbe przeznaczony jest do pracy na LightCycler® 2.0 System. Z odpowiednimi primerami oraz sondami zestaw ten pozwala na specyficzną i czułą detekcję produktów PCR oraz na ilościowy pomiar określonej sekwencji DNA. Dodatkowo można określić genotyp w analizie Polimorfizmu Pojedynczego Locus (SNPs) oraz w badaniach nad mutacjami [243]. Zestaw przydatny jest również do dwuetapowego RT-PCR. Razem z LightCycler® Uracil-DNA Glycosylazę zapobiega powstaniu kontaminacji podczas reakcji PCR. Zasady działania zestawu LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe umożliwiają jego zastosowanie w amplifikacji oraz detekcji każdej sekwencji DNA i cDNA (komplementarny DNA). Do powyższego zestawu ważne jest dopasowanie warunków reakcji PCR, zaprojektowanie prawidłowych starterów oraz parę sond do każdej sekwencji. Wielkość amplikonu, który chcemy analizować, nie powinien przekraczać 1 kb. Optymalne wyniki uzyskuje się przy długości produktu maksymalnie do 700 pz [243].

1.1.3.8. Matrycowy DNA

Ilość DNA wymagana do reakcji PCR jest zależna od czułości zastosowanej metody. W genetyce sądowej ilość DNA uzyskana ze śladów biologicznych jest stosunkowo mała. Dostępne komercyjne zestawy wymagają do badań DNA o stężeniu między 0,5 ng a 2,5 ng DNA celem uzyskania optymalnych wyników. Taka ilość jest równoznaczna 166 – 833 kopiom haploidalnego genomu ludzkiego (jedna kopia genomu ludzkiego posiada około 3 pg DNA) [64]. Większość analiz genetyczno-sądowych można przeprowadzić badając mniej niż 100 pg DNA lub 33 kopii genomu

ludzkiego [59, 61, 66], natomiast interpretacja wyników może zostać ograniczona, kiedy badamy mniejszą ilość DNA.

1.1.3.9. Inhibitory reakcji PCR

Jednym z najczęstszych problemów spotykanych w analizie genetyczno - sądowej to obecność inhibitorów reakcji PCR [189, 226]. Metody izolacji DNA nie zawsze pozwalają na uzyskanie czystego DNA, pozostawiając nieczystości, które mogą ograniczyć działanie polimerazy Taq [12, 189].

W grupie potencjalnych inhibitorów znajdują się: hemoglobina krwi [2, 3, 34, 48, 108, 171, 189]; sole żółciowe i polisacharydy znajdujące się w kale oraz w roślinach [66, 114, 134, 171, 183]; próchnica z gleby (może być inhibitorem reakcji PCR w analizie materiału kostnego) [66, 102, 215, 221]; mocznik [1, 66, 103, 113, 171]; melanina z włosów i skóry [47]; wysokie stężenie jonów wapnia i magnezu [1]; wysokie stężenie EDTA dodanego do izolacji DNA z kości [108].

1.2. Badania na chromosomie Y w medycynie sądowej

Chromosom Y składa się z około 60 milionów par zasad. Jest jednym z najmniejszych chromosomów ludzkiego genomu (tylko chromosomy 21 i 22 są mniejsze). Około 2,5 Mbp na końcach chromosomu Y ulega rekombinacji z chromosomem X. 35 do 36 Mbp stanowi euchromatyny oraz 27% chromosomu Y (9,5 Mbp) zostało sekwencjonowane [26]. Większa część chromosomu Y – 95% nie ulega rekombinacji. Region ten nazywa się NRY (ang. Non – recombining Y), zawiera haploidalny DNA, który dziedziczy się w linii męskiej. Na chromosomie Y znajdują się dwa pseudo - autosomalne regiony (PAR), w których zachodzi rekombinacja z homologicznym regionem chromosomu X. Jeden z regionów nazywany PAR1 znajduje się na krótkim ramieniu (Yp) chromosomu Y i jego długość szacuje się na około 2,5 Mb. Drugi region pseudoautosomalny PAR2 znajduje się na długim ramieniu (Yq) chromosomu Y i jest mniejszy o jeden Mb w porównaniu z regionem PAR1 [80, 149]. Region decydujący o płci SRY zaczyna się w pozycji około 2,56 Mb w genie amelogeniny AMEL Y aż do 6,70 Mb na chromosomie Y [26]. Na początku lat 90-tych został opisany region decydujący o płci, nazywany również genem SRY [201].

Badania genetyczne na chromosomie Y w medycynie sądowej zostały pierwszy raz przeprowadzone w latach 70-tych metodą luminescencji mikroskopowej, dzięki której naukowcy zidentyfikowali chromosom Y w materiale dowodowym [149, 170,

174]. W późniejszym okresie rozwój genetyki molekularnej pozwolił na zastosowanie lepszych metod wykrycia chromosomu Y, badając satelitarny DNA [206]. Reakcja PCR okazała się przełomem w genetyce sądowej, rozszerzając zakres badań na chromosomie Y, w rezultacie czego wykryto inne regiony tego chromosomu [227] jak na przykład gen amelogeniny [4].

Badania na chromosomie Y mają duże zastosowanie w medycynie sądowej [71], m.in. w analizach:

- ✓ dotyczących przemocy seksualnej,
- ✓ pokoleniowych oraz ewolucyjnych,
- ✓ identyfikacyjnych,
- ✓ w ustalaniu ojcostwa,
- ✓ populacyjnych.

W sprawach o ustalenie ojcostwa, w sytuacji, kiedy prawdopodobieństwo ojcostwa (PI) uzyskane w analizie z markerami autosomalnymi jest niskie (poniżej miliona), można rozszerzyć je poprzez zastosowanie markerów STR znajdujących się na chromosomie Y, przy badaniu domniemanego ojca i dziecka płci męskiej. W przypadku, kiedy domniemany ojciec jest nieosiągalny, wówczas analiza Y-STR krewnych domniemanego ojca w linii męskiej pozwala uzyskać profil genetyczny tego mężczyzny w zakresie chromosomu Y oraz porównać uzyskane cechy z domniemanym synem [26].

Badania STR na chromosomie Y mają istotne znaczenie w analizach śladów biologicznych w sprawach dotyczących przemocy seksualnej. Zwłaszcza w sytuacjach, gdzie w analizie autosomalnych loci uzyskano mieszaniny DNA kobiety i mężczyzny trudne do identyfikacji.

1.2.1. Markery chromosomu Y oraz ich lokalizacja chromosomalna

Na początku lat 90-tych Lutz Roewer z zespołem kolegów opisał pierwszy polimorficzny marker na chromosomie Y i nazwał go Y-27H39. Obecnie znany jest jako marker STR DYS19 [28, 178]. W kolejnych latach rozwój metod oraz technologii genetycznej pozwolił na wykrycie krótkich powtarzających się fragmentów DNA na chromosomie Y [28]. W 2002 roku badania potwierdziły dostępność blisko 30 markerów STR. Na początku 2003 roku uzyskano informację o istnieniu ponad 200 markerów, dostępnych w Genomowej Bazie Danych (ang. GDB; www.gdb.org).

W ten sposób uzyskujemy informację o sekwencji tych markerów oraz otrzymujemy ważne narzędzie do badań bazy danych sekwencji DNA [28].

Rozwój genetyki molekularnej w ostatnich 20 latach pozwolił na rozszerzenie zakresu badań genetycznych z użyciem markerów na chromosomie Y w medycynie sądowej [30].

Tabela nr 1.2. Rozwój Y markerów w ostatnich latach [28].

Rok	Markery	Ref.
1992	DSY19	[178]
1994	YCAI a/b, YCAII a/b, YCAIII a/b (DYS413), DXYS156	[130]
1996	DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 DYF371, DYS425, DYS426	[179] [88]
1997	DYS288, DYS388	[99]
1998	DYS385 a/b	[196]
1999	A7.1 (DYS460), A7.2 (DYS461), A10, C4, H4	[225]
2000	DYS434, DYS435, DYS436, DYS437, DYS438, DYS439	[11]
2001	DYS441, DYS442	[80]
2002	DYS443, DYS444, DYS445, DYS462, DYS446, DYS447, DYS448, DYS449, DYS450, DYS452, DYS453, DYS454, DYS455, DYS456, DYS458, DYS459 a/b, DYS463, DYS464 a/b/c/d, DYS468-DYS596 (+129)	[81] [17] [176] GBD
2003	DYS597-DYS645 (+50)	GBD

Markery na chromosomie Y o charakterystyce haplotypów (grupa pojedynczych alleli umieszczonych w różnych miejscach chromosomu, które są wspólnie przekazywane z jednego pokolenia do drugiego, np. jak SNPs), mają istotne znaczenie w badaniach populacyjnych [130]. Podstawową grupę markerów niezbędnych do badań populacyjnych zlokalizować można wzdłuż całego chromosomu Y. Markery z cechą haplotypów takie jak DYS393 i DYS19 znajdują się w krótkim ramieniu (p), na długim ramieniu chromosomu Y (q) sytuuje się: DYS391, DYS389 I/II, DYS390, DYS385 a/b oraz DYS392 [28]. Markery znajdujące się na końcach krótkiego ramienia blisko pseudoautosomalnego regionu chromosomu Y wskazują na wysoką skłonność do rekombinacji z chromosomem X [37, 68, 149]. Na przykład, marker DYS393 ma swój odpowiednik na chromosomie X: oznaczony jako marker DXYS267 [28, 45].

Na chromosomie Y znajdują się palindromiczne regiony, które ulegają duplikacji. W takim loci po amplifikacji uzyskujemy dwa allele. Na przykład marker DYS385 znajduje się na dwóch miejscach długiego ramienia chromosomu Y. Regiony te rozdzielone są o 40 000 pz, co w efekcie po amplifikacji daje dwa różne allele [28].

1.2.1.1. Badania przy użyciu markerów Y-STR

Badania na chromosomie Y przy pomocy markerów STR przeprowadza się różnymi metodami, w zależności od możliwości laboratoryjnych, celu badań oraz badanego materiału. Powszechnie stosowana metoda w medycynie sądowej polega na rozdziale fragmentów amplifikowanego DNA w polu elektroforetycznym [28]. Do każdej próby dodany jest standard wielkości w zależności od oczekiwanego produktu oraz do każdej elektroforezy drabinka alleliczna, która pozwala na porównywanie wielkości fragmentu DNA badanego z wielkością alleli w drabince [28, 57].

Na rynku są dostępne różne zestawy komercyjne pozwalające na analizę markerów na chromosomie Y. Rozwój oraz wzrost ilości markerów Y-STR w ostatniej dekadzie pozwoliły na dokładniejszą analizę genetyczno - sądową. Zakres wielkości markerów STR na chromosomie Y znajduje się między 100 pz a 500 pz.

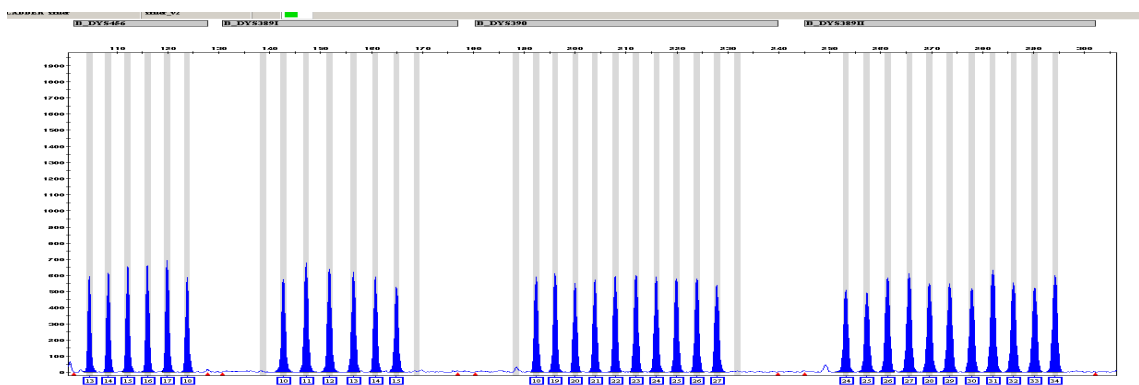
Tabela nr 1.3. Zestawy komercyjne do analizy markerów Y-STR [28].

Źródło	Zestaw	Rok	Markery STR
ReliaGene Technologies, USA	Y-Plex™6	2001	DYS393, DYS19, DYS389II, DYS390, DYS391 i DYS385 a/b
	Y-Plex™5	2002	DYS389I, DYS389II, DYS439, DYS438 i DYS392
	Y-Plex™12	2003	DYS392, DYS390, DYS385a/b, DYS393, DYS389I, DYS391, DYS389II, Amelogenina, DYS19, DYS439 i DYS438
Serac, Niemcy	genRes®DYSplex-1	2002	DYS390, DYS39I, DYS385a/b, Amelogenina i DYS5389I/II
	genRes®DYSplex-2	2002	DYS392, DYS3993, DYS19 i DYS389I/II
Promega Corporation	PowerPlex®Y	2003	DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390 i DYS385a/b
Biotype, Niemcy	MenPlex® Argus Y-MH	2004	DYS393, DYS390, DYS385a/b, DYS391, DYS19, DYS389I, DYS392 i DYS389II
Applied Biosystems	Y-filer™	2004	DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, C4, DYS392H4, DYS437, DYS438 i DYS448.

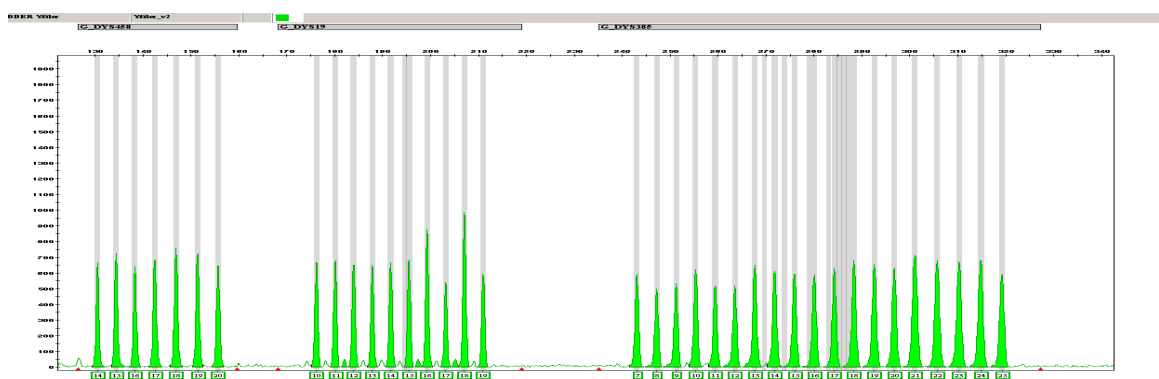
Pierwszy dostępny multiplex do badań metodą STR-PCR na chromosomie Y, Y-Plex™6, zawierał 6 markerów i został opracowywany przez ReliaGene Technology USA w styczniu 2001r. W lipcu 2002r. ta sama firma wyprodukowała kit Y-Plex™5 zawierający 5 markerów a już we wrześniu 2002r. opracowała zestaw Y-Plex™12 z 12 markerami. Również w 2002r. niemiecka firma Serac opracowywała 2 zestawy markerów Y-STR zawierające 4 i 5 markerów (Tab. nr 1.3) [28, 202].

W 2003r. firma Promega® wprowadziła na rynek kit markerów Y-STR zawierający 12 loci, w którym po raz pierwszy znajdował się nowy marker, tj. DYS437. (Tab. nr 1.3) [28].

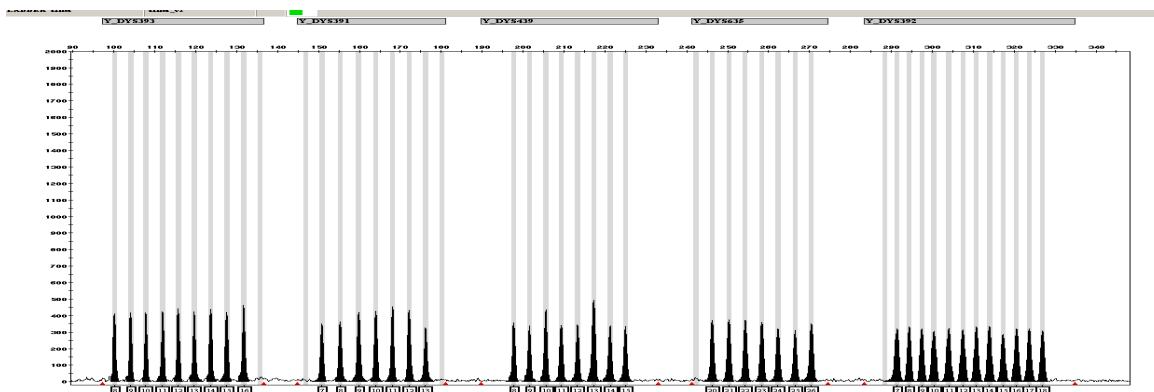
W 2004r. firma Biotype z Niemiec opracowała zestaw zawierający 9 markerów Y-STR. W tym samym roku Applied Biosystems wprowadził zestaw 16 markerów Y-STR, w którym po raz pierwszy pojawiły się markery DYS456, DYS458, C4, DYS392, H4, DYS437 i DYS448 (Tab. nr 1.3) [28].



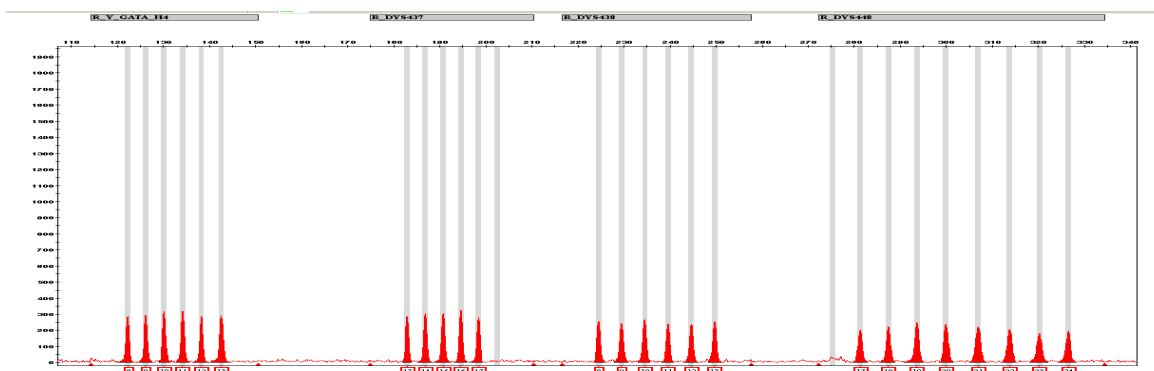
Ryc. nr 1.11. Drabinka alleli do zestawu Y-filer firmy Applied Biosystems. Kolor niebieski – barwnik 6-FAM zawierający układy DYS456, DYS389I, DYS390 oraz DYS389II.



Ryc. nr 1.12. Drabinka alleli do zestawu Y-filer firmy Applied Biosystems. Kolor zielony – barwnik VIC zawierający układy DYS458, DYS19 oraz DYS385.



Ryc. nr 1.13. Drabinka alleli do zestawu Y-filer firmy Applied Biosystems. Kolor czarny – barwnik NED (żółty) zawierający układy DYS393, DYS391, DYS439, DYS635 oraz DYS392.



Ryc. nr 1.14. Drabinka alleli do zestawu Y-filer firmy Applied Biosystems. Kolor czerwony – barwnik PET zawierający układy YGATAH4, DYS437, DYS438 oraz DYS448.

1.2.3. Badania populacyjne polimorfizmu markerów Y-STR

Profile genetyczne uzyskane w różnych regionach na świecie stosując 9 markerów Y – STR z cechą haplotypów pozwoliły na stworzenie bazy danych - [http:// www.ystr.org](http://www.ystr.org). Powyższy zestaw zawiera następujące markery: DYS19, DYS385, DYS390, DYS390, DYS391, DYS392 i DYS393. Stanowiły one w medycynie sądowej haplotyp minimalny. W późniejszym okresie został poszerzony o dwa loci Y- STR [196].

Dostępne bazy danych znajdują się na stronach internetowych [28]: www.yhrd.org, gdzie opisano badania wykonane na 224 populacjach na świecie, natomiast strona www.ystr.org zawiera dane o badaniach na 94 populacjach europejskich [180]; na 30 regionalnych populacjach Stanów Zjednoczonych - mając na uwadze różnorodność tej ostatniej [96, 98] oraz na 22 populacjach azjatyckich [118]. Wyniki badań na populacji Stanów Zjednoczonych umieszczono również na stronach internetowych: www.reliagene.com [202] i www.promega.com.

Na stronach internetowych www.ybase.org, www.ysearch.org i www.smgf.org znajdują się dane z badań genealogicznych dokonanych na całym świecie.

1.3. Polimorfizm Pojedynczego Nukleotydu (SNP)

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu to utrwalone punktowe zmiany w sekwencji DNA, powstające w wyniku tranzycji lub transwersji [8]. W genomie człowieka liczba SNPs jest ogromna. Wykazana wstępna liczba to ponad 2 miliony [66, 119, 218], mające istotne znaczenie w badaniach populacyjnych oraz w diagnostyce medycznej w kierunku badań nad chorobami genetycznymi [26]. Przyszłość badań genetycznych w medycynie sądowej jest ściśle związana z polimorfizmem pojedynczego nukleotydu. Uzyskane wyniki nie wskazują na obecność artefaktów (stutters), co ma potencjalne znaczenie w analizie mieszanin DNA. Badania przeprowadzone są w pełni zautomatyzowaną metodą, co skraca czas badania oraz pracy laboratoryjnej. Najważniejszą zaś zaletą SNPs jest możliwość uzyskania produktu PCR mniejszego niż 100 pz, co ma ogromne znaczenie przy analizie zdegradowanego DNA.

Badając jeden SNP, uzyskujemy maksymalnie dwa allele, co powoduje, że siła dyskryminacji jest w stosunku do badań systemem STR niska. Do porównywalnej analizy 13 loci STR jest potrzebna analiza, 25 do 45 loci SNP [30]. Inne badania wskazują, że wyniki uzyskane przy badaniu 50 SNPs stanowią od 20% do 50% informacji genetycznej uzyskanej w porównaniu do analizy 12 loci STR [60]. Ilość SNPs potrzebnych do analizy może być różna; zależna od stopnia polimorfizmu badanych SNPs. Badając od 50 do 100 SNPs można oczekiwać, że uzyskana siła dyskryminacji będzie zbliżona do siły dyskryminacji analizy od 10 do 16 loci STR [28, 58].

Loci SNPs mogą się znajdować w regionie kodującym i niekodującym białko w ludzkim genomie. Usytuowane w regionie kodującym pozwalają na badania diagnostyczne chorób genetycznych oraz farmakogenetycznych [204]. Natomiast, większość SNPs znajduje się w regionie niekodującym w ludzkim genomie i odgrywa ważną rolę w badaniach genetyczno - populacyjnych oraz w genetyce sądowej.

Przeważająca ilość SNPs znajduje się w bazie danych w Centrum Narodowym Informacji Biotechnologicznej (National Center for Biotechnology Information, NCBI dbSNP) [53, 66, 129, 219].

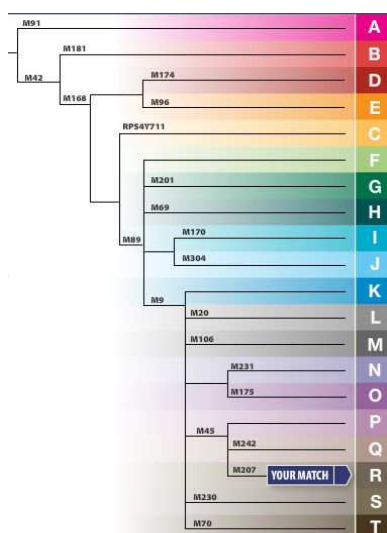
1.3.1. Rola markerów Y-SNPs w genetyce sądowej

Analiza markerów SNPs na chromosomie Y dostarcza ważnej informacji genetyczno-sądowej w sytuacjach, kiedy badamy DNA w stanie degradacji lub kiedy analizujemy mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny, gdzie ilość DNA kobiety jest dużo większa od ilości DNA mężczyzny [115].

Interpretacja wyników uzyskanych przy badaniu SNPs na chromosomie Y jest bardzo łatwa, ponieważ uzyskujemy tylko jeden allel.

Międzynarodowa grupa naukowców: Michael Hammer z Uniwersytetu w Arizonie, Peter Underhill z Uniwersytetu w Stanfordzie, Mark Jobling z Uniwersytetu w Leicester oraz Chris Tyler Smith z Uniwersytetu w Oxfordzie na czele uporządkowała listę haplogrup chromosomu Y w Konsorcium Chromosomu Y (ang. Y Chromosome Consortium, YCC) oraz opublikowała ją w lutym 2002r w czasopiśmie Genome Research [28]. Haplogrupa to grupa osobników o podobnych genach. Różnice genetyczne mogą powstać w wyniku mutacji genetycznych zachodzących co kilkaset lat w markerach SNPs [89, 211].

Uporządkowane haplogrupy pozwoliły na stworzenie drzewa genealogicznego chromosomu Y, w którym zostało opisanych ponad 250 biallelicznych markerów oraz 153 różnych haplogrup. Zostało ono zaktualizowane w sierpniu 2003r. przez Marka Joblinga i Chrisa Tylera Smitha oraz w 2008r. przez naukowców z Uniwersytetów w Arizonie i Stanfordzie [246].



Ryc. nr 1.15. Nomenklatura haplogrup opracowanych przez YCC. Każdy marker posiada swoje haplogrupy (A-T). Haplogrupa R, a dokładniej R1b/R1b3, cechuje populację Kaukaską, z której pochodzi populacja Europejska [28].

Informacje na temat każdej haplogrupy można uzyskać między innymi na stronach internetowych: www.ycc.biosci.arizona.edu, www.decodememe.com i www.isogg.org.

W pracy Juana J. Sancheza i inni [188, 189] zostało zanalizowanych 35 SNPs na chromosomie Y, gdzie z 29 SNPs przedstawiono haplogrupy w populacji europejskiej. Badaniom poddano także 61 Y-SNPs populacji Stanów Zjednoczonych (badania przeprowadzone przez Michaela F. Hammera i współpracowników). W efekcie powstała baza danych tej populacji [72]. Vallone oraz Butler zbadali 50 Y-SNPs przy zastosowaniu 8 multiplexów [216].

Badania SNPs przeprowadzone na chromosomie Y i na mitochondrialnym DNA (mtDNA) pomogły naukowcom śledzić migrację populacji [91, 143] oraz na stworzeniu nowym rodowód obecnych mutacji oraz innych możliwych do powstania w przyszłości [90, 174].

1.3.1.1. Wybór SNPs na chromosomie Y

Wybór SNPs do badań genetyczno-sądowych jest trudnym zadaniem. Human Genome Projekt w 2002r. stworzył najważniejszą grupę SNPs lub ID opartych na statusie walidacji, polimorfizmie, jakości sekwencji, technologii stosowanej oraz sprzężenia [154].

Istnieje wiele czynników, które należy wziąć pod uwagę przy wyborze SNPs w zależności od projektu badań. Korzystając ze strony internetowej, na której znajduje się baza SNPs, należy zwrócić uwagę na występujące allele (zmiana nukleotydowa), region w chromosomie, gdzie występuje, pozycję ze zmianą nukleotydową oraz poziom heterozygotności naszego SNPs [115, 154].

Sprzężenie jest jednym z najważniejszych czynników w wyborze SNPs do analizy. Aktualne badania wykazują, że kiedy dochodzi do nierównowagi sprzężeń (ang. Linkage Disequilibrium: LD), pojawiają się wyraźne bloki w ludzkim genomie. Ta zmienność, zakres oraz dystrybucja LD w różnych populacjach nie jest do końca zbadana [154].

Obecnie można znaleźć dużą ilość Y-SNPs w publikacjach sądowo-medycznych, które dostarczają informacji na temat badanych SNPs, natomiast strony internetowe są źródłem wiedzy o SNPs wcześniej niebadanych [154].

Dodatkowo przy wyborze SNP należy wziąć pod uwagę:

- ✓ organizm, na którym planujemy przeprowadzić badania,

- ✓ ilość powtórzeń występowania wybranego SNP w genomie,
- ✓ walidację SNPs.

Ta ostatnia cecha gra ważną rolę w badaniach genetyczno-sądowych. Wybrane markery SNPs w tej dziedzinie powinny posiadać dużą siłę dyskryminacji do analiz mieszanin DNA oraz badań populacyjnych [115, 154].

Obecnie wyboru SNPs na chromosomie Y można dokonać, korzystając z baz danych, które zawierają szeroką oraz dokładną informację o Y-SNPs w zależności od zastosowanej metody laboratoryjnej: www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/, www.snp.cshl.org/, www.ensembl.org/, itp. [154, 199].

1.3.2. Metody analiz markerów SNPs

Pod koniec lat 90-tych, w wyniku długiej pracy naukowców z DOE (Department of Energy Office) oraz NIH (National Institutes of Health) Human Genome, powstała mapa SNPs zawierająca ponad 100 000 markerów. Przedstawione zostały również metody identyfikacji SNPs oraz najbardziej typowe kodujące regiony w większości zidentyfikowanych genach [56, 233].

W 1999r. Konsorcja Farmaceutyczne z Arthurem L. Holdenem na czele wykryły 300 000 SNPs, w późniejszym okresie przedstawiono ponad milion [56, 233].

Ilość SNPs w ludzkim genomie, ich łatwość i raczej ograniczony polimorfizm zainteresowały naukowców pod kątem rozwoju diagnostyki medycznej [204]. Markery SNPs, stosowane w celu identyfikacji genów zaangażowanych w choroby genetyczne, posiadają potencjalne znaczenie w analizie farmakogenetycznej [204].

W genetyce sądowej analiza komercyjnie dostępnych markerów STR dotyczy zakresu między 100 a 600 pz. Wyboru SNPs należy dokonać w niższym zakresie – poniżej 100 pz (wielkość amplikonu) tak, aby analiza trudnego materiału (zdegradowany DNA) była możliwa.

Metody analizy SNPs charakteryzują się wysokim poziomem automatyzacji, co pozwala na szybką i dokładną analizę. Natomiast odczynniki potrzebne do analiz SNPs nadal są bardzo kosztowne.

Do badań identyfikacyjnych, w ustalaniu ojcostwa oraz porównawczych dowodów rzeczowych, istotna jest analiza kilku SNPs. Im więcej ich zastosujemy, tym większe będzie prawdopodobieństwo uzyskania wysokiego polimorfizmu zbliżonego do rezultatu uzyskanego metodą STR. Wiąże się to jednak z trudnością przy wyborze optymalnych warunków reakcji [8].

Nie ma idealnej metody genotypowania SNPs. Wybór odpowiedniej metody do badań zależy od posiadanego sprzętu. Do analiz w genetyce sądowej wymagany jest odpowiednio dobrany multiplex oraz wysoka dokładność w interpretacji wyników [204].

Zastosowane metody wykrywania SNPs dzielą się na cztery grupy:

- ✓ hybrydyzacja (ASO),
- ✓ elongacja (wydłużanie starterów),
- ✓ metoda oparta na działaniu ligazy – OLA (ang. Oligonucleotide Ligation Assay),
- ✓ inwazyjny podział.

1.3.2.1. Hybrydyzacja – ASO

Metoda hybrydyzacji, zwana też ASO (ang. Allele Specific Oligonucleotide Hybridization), według Rabioneta i Estivilla (1999) opiera się na łączeniu komplementarnych, znakowanych specyficznych sond do matrycy DNA zawierającej polimorficzne miejsce. Sondy przekazują energię poprzez proces FRET [204].

Wcześniej metodę tę używano do analizy Southern blot lub Dot blot. Oligonukleotydy zawierają od 15 do 21 par zasad. Oparta na nich metoda pozwala na wykrywanie miejsca ze zmianą nukleotydową. Metoda ASO ma podstawowe znaczenie w badaniach przy zastosowaniu SNPs, w genotypowaniu oraz w Projekcie Ludzkiego Genomu (Human Genome Projekt) [204].

Sondy Oligonukleotydowe mogą być znakowane radioaktywnie, enzymatycznie oraz fluorescencyjnie [204].

1.3.2.1.1. Proces FRET

Proces transferu energii z jednego fluorochromu do drugiego (Fluorescence resonance energy transfer – FRET) omówiony został w punkcie – **1.1.2.2..**

Badanie Polimorfizmu Pojedynczego Nukleotydu (SNP) przy zastosowaniu tego procesu można przeprowadzić w LightCycler firmy Roche®. Dwie specyficzne sekwencje oligonukleotydów są wyznakowane fluorescencyjnie [8, 204].

W oparciu o zjawisko FRET lub metodę ASO działają również sondy omawiane w punkcie - **1.1.2.2..**

Jedną z zalet metody hybrydyzacji jest brak pracy laboratoryjnej po reakcji PCR, ponieważ detekcja oraz PCR są przeprowadzone równocześnie, co znacznie skraca czas pracy [204].

1.3.2.1.2. Detekcja fluorescencyjna i mikromacierze DNA

Metoda polega na hybrydyzacji krótkich oligonukleotydów związanych z podłożem stałym zwanym mikromacierzą z produktem PCR oznakowanym fluorescencyjnie oraz zawierającym sekwencję ze zmianą nukleotydową. Technika ta pozwala na równoczesną analizę kilku SNPs [20, 204]. Natomiast wydajność hybrydyzacji oraz stabilność powstających produktów zależy nie tylko od stopnia polimorfizmu, lecz także od sekwencji otaczającej SNPs [35, 204]. W związku z tym mogą się pojawić trudności z wybraniem optymalnych warunków reakcji do równoczesnej analizy kilku SNPs. Ten problem został rozwiązany poprzez system GeneChip, firmy Affymetrix, poprzez stosowanie sondy ASO do każdego SNP [204].

Technikę tę stosuje się do genotypowania dużej ilości SNPs, co przekracza obecne możliwości genetyki sądowej.

1.3.2.2. Elongacja (wydłużanie starterów)

Metoda wydłużania starterów (ang. Primer Extension) pozwala na multiplexową analizę SNPs. Oparta jest na umiejętności enzymu polimerazy do włączenia specyficznych deoksyrybonukleotydów do komplementarnej sekwencji matrycowego DNA [112, 181, 182, 204, 216].

Istnieją różne warianty reakcji opartej na zasadzie wydłużania starterów:

- ✓ minisekwencjonowanie,
- ✓ allelospecyficzne wydłużenie,
- ✓ pirosekwencjonowanie.

1.3.2.2.1. Minisekwencjonowanie

W procesie minisekwencjonowania allele primer rozpoczynający reakcję w sekwencji matrycowego DNA natychmiast łączy się i jest wydłużany przez polimerazę DNA, która zawiera nukleotyd komplementarny do polimorficznego miejsca [103, 201, 206].

Większość metod do analizy SNPs wymaga przeprowadzenia wcześniejszej reakcji PCR. Przed metodą minisekwencjonowania, aby zredukować nadmiar odczynników reakcji PCR i uzyskać specyficzny produkt, zaleca się również przeprowadzenie tej reakcji [201].

1.3.2.2.1.1. Metoda SNaPshot

Obecnie na rynku istnieją różne technologie oparte na bazie metody minisekwencjonowania. Firma Applied Biosystems oferuje zestaw SNaPshot w postaci multiplexu. Dzięki niemu rozdział produktów PCR przeprowadza się poprzez elektroforezę kapilarną na analizatorach genetycznych (również tej firmy). Można zaprojektować nawet 10 multiplexów, co pozwala na uzyskanie wyniku 10 SNPs równocześnie [182, 185, 186, 201].

1.3.2.2.1.2. Metoda MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (ang. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry), zwana też spektrofotometrią masową, jest konfiguracją spektrofotometrów mas źródła jonów MALDI oraz analizatora TOF [201, 212].

MALDI (ang. Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – MALDI) jest łagodną metodą jonizacji laserowej, która z dobraną energią nie doprowadza do fragmentacji cząsteczek, lecz tylko do ich oddzielania ze specjalnej przygotowanej matrycy. Matryca absorbuje energię lasera i przekazuje ją do analizowanych cząsteczek [201, 212].

TOF (ang. Time Of Flight – TOF), analizator jonów, który przy pomocy impulsu elektrycznego wprowadza jony do komory analizatora, gdzie zaczyna się pomiar m/z (masa w stosunku do ładunku) oparty na zasadzie, że ze wzrostem masy cząsteczkowej jonów wydłuża się ich czas przelotu [201].

Spektrofotometr MALDI – TOF pozwala na bezpośrednią detekcję składu populacji cząsteczek o dużych masach. Jego zastosowanie w badaniach genetycznych przy użyciu markerów SNPs polega na związaniu sond z dNTPs przez reakcję wydłużenia, powodując zwiększenie różnic masowych między allelami SNPs [18, 50, 204, 217].

1.3.2.2.1.3. Mikromacierze

System ten opiera się też na reakcji wydłużania starterów [147, 200, 204]. Metoda polega na naniesieniu matrycowego DNA na płytkę zawierającą specyficzne sondy molekularne. Detekcja następuje przez pomiar emisji fluorescencji [8, 28, 147]. Istnieją dwa rodzaje mikromacierzy: cDNA oraz oligonukleotydowe [92]. Na mikromacierzach cDNA zablokowane są długie fragmenty DNA. Proces ten ma miejsce

na powierzchni membran, szkła lub silikonu [92]. Mikromacierze oligonukleotydom są wytwarzane w procesie syntezy na stałej powierzchni. Oligonukleotydy są krótkie (10 - 80 pz), co pozwala na określenie zmian na poziomie ekspresji genów, analizę SNPs, wykrywanie nowych transkryptów, badanie procesów metylacji oraz innych zmian epigenomicznych [92, 147, 204].

Mikromacierze do badań SNPs w jednym eksperymencie umożliwiają analizę kilkuset mutacji i polimorfizmów, jak też poznanie mechanizmów rozwoju chorób genetycznych [92].

1.3.2.2.2. Allelospecyficzne wydłużenie

Proces ten polega na różnicach efektywności wydłużania polimerazy DNA między starterami ze zmianą lub bez zmiany na końcu 3'. Polimeraza DNA wydłuży tylko starter z końcem 3', który będzie komplementarny do matrycowego DNA. Do każdego zanalizowanego SNP jest potrzebna para starterów. Detekcja produktu reakcyjnego może zostać dokonana poprzez mikromacierze z nukleotydami oznakowanymi fluorescencyjnie [148, 204].

1.3.2.2.3. Pirosekwencjonowanie

W 1996 roku w Royal Institute of Technology w Sztokholmie profesor Pal Nyren, wraz ze swoim uczniem Mostafa Ronaghi, opracował nowatorską technikę sekwencjonowania DNA – pirosekwencjonowanie [66].

Polega ona na sekwencjonowaniu DNA w czasie rzeczywistym. Do reakcji wykorzystane są cztery enzymy – polimeraza DNA, sulfurylaza, lucyferaza oraz apiraza. Podczas syntezy DNA uwalnia się pirofosforan (PPi). W wyniku kaskady reakcji enzymatycznej dochodzi do emisji światła a jego intensywność zależy od ilości wydalonego pirofosforanu a równocześnie od ilości stworzonych sekwencji nukleotydów [203].

Pirosekwencjonowanie znalazło zastosowanie w takich analizach jak: badanie sekwencji odcinków DNA, wykrywanie mutacji i polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, genotypowanie wirusów i bakterii czy badanie mitochondrialnego DNA [203].

1.3.2.3. Metoda OLA (ang. Oligonucleotide Ligation Assay)

W tej metodzie dwa oligonukleotydy lub sondy o długości nie większej niż 20 nukleotydów hybrydują z docelową sekwencją DNA [208].

Technika OLA opiera się na właściwościach ligazy DNA, która włącza się do nukleotydów stwarzając wiązanie kowalencyjne między dwoma oligonukleotydami [8]. Komponentami tej reakcji są: trzy sondy oligonukleotydowe i dwie sondy allelospecyficzne. Jedna sonda oligonukleotydowa jest komplementarna do sekwencji z miejscem polimorficznym i również jedna ze sond posiada na końcu 3' nukleotyd komplementarny do miejsca ze zmianą nukleotydową. Do przyłączenia substratów z produktem dochodzi tylko wtedy, kiedy sekwencje są komplementarne między sobą [48].

Do badań, w których można zastosować metodę OLA należą: analiza chorób genetycznych o znanych mutacjach oraz analiza patogenów wirusowych i bakteryjnych [48].

1.3.2.4. Inwazyjny podział

Do tej reakcji wymagana jest para oligonukleotydów. Jeden określony jest jako oligonukleotyd „atakujący” (ang. Invader oligonucleotide) oraz drugi, który przyłącza się do matrycowego DNA zawierającego nukleotyd częściowo komplementarny. Oligonukleotyd „atakujący” jest komplementarny do sekwencji SNP z końcem 3'. Sonda posiada dwa regiony, jeden komplementarny do SNP na końcu 5' oraz drugi niekomplementarny do regionu 5' SNP. Kiedy zasada alleliczna łączy się komplementarnie do zasady sondy, oligonukleotyd „atakujący” w regionie 3' stwarza strukturę, którą wykrywa endonukleaza, zwalniając sondę na końcu 5'. Jeżeli endonukleaza nie wykryje struktury matrycy, to nie dojdzie do detekcji pojedynczego miejsca mutacyjnego [94, 124, 131, 204].

1.4. Wstępne badania śladów biologicznych

Każda komórka zawierająca jądro posiada dwie kopie ludzkiego genomu i teoretycznie można uzyskać pełny profil genetyczny osobnika przy zastosowaniu optymalnych metod laboratoryjnych [107, 120, 121].

Ślady biologiczne przekazane przez Organa Ścigania i Władze Wymiaru Sprawiedliwości do pracowni hemogenetycznej Zakładu Medycyny Sądowej wymagają wstępnych oględzin, które mają istotne znaczenie w późniejszej interpretacji wyników.

Na przykład w sprawach o zabójstwo ważne jest, by ustalić, czy w materiałach zabezpieczonych do badań znajdują się ślady krwi.

W sprawach dotyczących przemocy seksualnej istotne jest, aby potwierdzić, czy w materiałach przekazanych do badań znajdują się ślady nasienia.

Dostępne obecnie metody pozwalają również potwierdzić obecność krwi w kale, obecność śliny i krwi oraz nasienia na różnych podłożach.

1.4.1. Metody wykrywania śladów krwi

Do wykrywania śladów, które mogą zawierać krew, stosowane są różne metody:

- ✓ niespecyficzne,
- ✓ specyficzne.

Do niespecyficznych metod należą techniki z zastosowaniem Luminolu, Benzydyny oraz testu Kastela-Mayera [169, 230], w których wynik pozytywny może okazać się fałszywie pozytywny, natomiast wynik negatywny jednoznacznie może wskazać na brak krwi w badanym śladzie.

Wśród powyższych metod najbardziej czuła jest metoda z zastosowaniem Luminolu (3-amino-phthalhydrazide). Dzięki niej można uzyskać wynik pozytywny na obecność krwi nawet przy rozcieńczeniu 1:1000 000 [230]. Natomiast wadą jest to, że można uzyskać wyniki fałszywie pozytywne w badaniu materiału zawierającego ślady miedzi, jej stopów oraz żelaza i kobaltu.

Metodę wykorzystującą aktywności peroksydazy, również można zastosować do wykrywania śladów krwi [66]. Cząsteczki hemoglobiny katalizują hydrolizę nadtlenu wodoru, co w efekcie prowadzi do oksydacji składnika chemicznego reakcji, zmieniając barwę [66, 70]. Przykłady składników, które ulegają oksydacji to: leukomalachit zielony (skrót: LMG), fenoloftaleina (test Kastela i Mayera), która zabarwia się na różowo oraz tetrametylbenzidyna (skrót: TMB), zabarwiająca się na zielono [67, 80, 157]. Metoda ta należy również do niespecyficznych, ponieważ każdy materiał zawierający aktywność peroksydazy może dać fałszywie pozytywny wynik. Do takich materiałów należy zaliczyć skórę i rośliny [66, 169, 214].

Obecnie na rynku dostępne są testy bardziej specyficzne. Ich swoistość oraz łatwość zastosowania pozwala na szybkie oraz wygodne wykrycie hemoglobiny krwi w laboratorium lub w miejscu zdarzenia.

W 1853r. Teichman i w 1912r. Takayama opracowali metodę opartą na powstaniu kryształków pochodzących od hemoglobiny krwi. Czerwony barwnik – hemoglobina pod wpływem kwasu octowego i soli kuchennej zamienia się w kryształki chloroheminy. Uwidocznienie tych kryształków dokonano metodą mikroskopową oraz spektroskopową. Kryształki heminy barwią się na kolory jasnobrunatny, czerwobrunatny lub prawie czarny [66, 219, 235]. W metodach specyficznych wykorzystuje się technikę spektrofotometryczną lub testy immunochromatograficzne [76, 232]. Do powyższych testów należy test Hemcheck, Hem Select, Hexagon OBTI test Hemophan, Hemastix® oraz RSID™blood [82, 157, 230]. Niestety, jeżeli ilość ekstraktu (antygeny) jest zbyt duża, można uzyskać fałszywie negatywne wyniki przy zastosowaniu powyższych testów immunochromatograficznych [230].

Testy immunochromatyczne opierają się na migracji przeciwciała przez membranę zawierającą specyficzne miejsce, gdzie zachodzi reakcja immunologiczna. Innymi słowy, ślad, na którym podejrzewamy obecność krwi, powinien zawierać przeciwciało glikoforynę A – znajdujące się na ściankach czerwonych komórek krwi. Dodana próba do okienka testowego migruje przez membranę. Jeżeli znajduje się krew w śladzie, zostaje zatrzymane przeciwciało. Jako wynik pozytywny otrzymuje się dwie kreski, jedną negatywną lub kontrolną, drugą pozytywną wskazującą na obecność krwi w materiale biologicznym [66, 82].

1.4.2. Metody wykrywania śladów nasienia

Ślady nasienia również można wykryć przy zastosowaniu technik laboratoryjnych. Początkowo w medycynie sądowej stosowano metodę mikroskopową do wykrywania plemników przygotowanych w preparatach oraz zabezpieczonych na wymazówkach. Nieobecność plemników nie wskazuje jednak na brak nasienia. Mężczyźni z azoospermią lub z oligospermią mają małą lub zerową ilość plemników, co można potwierdzić przez badanie mikroskopowe. W praktyce taki obraz doprowadza do błędnych wniosków w analizie genetyczno-sądowej [67, 207]. Również forma dostarczania śladów biologicznych do badań genetycznych np. wymazy, utrudnia przeprowadzenie wstępnych testów określających rodzaj zabezpieczonego materiału.

Istnieją różne metody wykrycia obecności markerów białkowych w płynie nasiennym. Wśród tych markerów znajduje się gamma - glutamylotranspeptydaza (GGT), dehydrogenaza mleczanowa (LDH), cholina oraz spermina. Powyższe metody

zostały wycofane w medycynie sądowej ze względu na wysokie stężenie tych markerów w innych narządach ciała ludzkiego [67].

Do testów wykrywania obecności nasienia można zaliczyć też technikę pomiaru aktywności kwaśnej fosfatazy (AP) oraz test PSA (antygen specyficzny prostaty).

Metoda aktywności AP może wykazywać fałszywie pozytywne wyniki ze względu na to, że kwaśna fosfataza znajduje się również w innych wydzielinach organizmu np. pochwowej [67, 167].

1.4.2.1. Test PSA

Test PSA opiera się na reakcji immunologicznej w celu wykrycia antygenu specyficznego dla prostaty. Sensabaugh w 1978 roku stwierdził, że PSA jest białkiem specyficznym, które posiadają mężczyźni, co skłoniło specjalistów kryminalistyki do wykorzystania tego białka do badań wykrywania nasienia w śladach biologicznych pozostawionych na miejscu przestępstwa [67, 197, 213]. Zaletą tej techniki jest to, że wykrycie antygenu PSA nie ma nic wspólnego z ilością plemników w pozostawionym śladzie. Hochmeister i współpracownicy udowodnili, że komercyjne testy używane w praktyce klinicznej nadają się do identyfikacji nasienia w praktyce sądowej [67, 75].

Niestety, obecnie przeprowadzone badania w tym kierunku wskazują na niespecyficzność tego testu, albowiem również u kobiet w wydzielinie z piersi wykryto obecność antygenu PSA [14, 67, 191]. Wynik pozytywny w kierunku obecności antygenu PSA można także zaobserwować u pacjentów chorych na nowotwór płuc, macicy i piersi [52, 67], podczas badania łożyska [67, 127] oraz moczu [67, 127, 190]. Ilość PSA zmienia się też w zależności od wieku mężczyzny oraz od jego stanu zdrowia. W przerostie prostaty stwierdza się znacznie zawyżony poziom PSA [67, 244].

1.4.2.2. Test RSID™ - Semen

Do innych metod immunochromatograficznych należy test RSID™ - Semen (ang. Rapid Stain Identification of Human Semen). Test RSID wykrywa białko semenogelinę, która znajduje się w pęcherzykach nasiennych odpowiedzialnych za ejakulację. Test RSID™ - Semen opiera się na działaniu dwóch ludzkich przeciwciał

monoklonalnych semenogeliny. Test zalicza się do testów immunochromatycznych, które opierają się na reakcji immunologicznej opisanej wyżej w punkcie 1.4.1.

Test ten ma najlepsze zastosowanie w wykrywaniu ludzkiego nasienia, ponieważ ujawnia tylko obecność białka semenogeliny znajdującego się w płynie nasiennym człowieka, a nie w innych płynach ustrojowych oraz w nasieniu innych zwierząt. Zaleca się użycie do testu maksymalnie 20 ul nasienia lub wymazówki z zabezpieczonym materiałem do badań [83, 141].

1.4.2.3. Technika ALS (ang. Alternative Light Source)

Metoda oparta na alternatywnym źródle światła pozwala na uwidocznienie plamy, co do której jest podejrzenie, że może to być plama powstała z nasienia, krwi lub z innych płynów biologicznych np. z wydzieliny z pochwy, potu, śliny. Urządzenie to, pracując w oparciu o światło o określonej długości emisji fluorescencyjnej oraz specjalne filtry, pozwala na określenie rodzaju zaplamień. Fluorescencja przybiera różne odcienie bieli a zaplamienia wykazują nierównomierny rozkład emisji [67]. Metoda ta pozwala na szybką detekcję śladów, natomiast ostatecznej identyfikacji śladu można dokonać tylko metodami biochemicznymi.

Technika ta wykorzystuje zasadę wykrywania obecności enzymu kwaśnej fosfatazy w śladach zawierających nasienie. Identyfikacja śladu jest możliwa wtedy, kiedy stężenie tego enzymu jest wysokie w badanej plamie [66, 67]. Jednak pomimo niskiego stężenia enzymu w takich wydzielinach jak ślina i wydzielina z pochwy można go wykryć techniką ALS [66, 178].

2. CEL PRACY

- I. Porównanie metody z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I z metodą z użyciem sond molekularnych przy pomocy LightCycler® 2.0;
- II. Opracowanie optymalnych warunków do przeprowadzenia reakcji PCR metodą z zastosowaniem SYBR™ Green I oraz LightSNiP, celem uzyskania produktu amplifikacji na trudnym do opracowywania materiale biologicznym w genetyce-sądowej oraz dobór optymalnego stężenia DNA potrzebnego do przeprowadzenia analiz powyższymi metodami;
- III. Analizowanie przydatności metody LightSNiP z wybranymi Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 oraz rs17306671 w analizie śladów biologicznych w porównaniu z wynikami analiz uzyskanych metodą STR-PCR;
- IV. Porównanie wyników uzyskanych metodą LightSNiP siedmiu zastosowanych Y-SNP;
- V. Opracowywanie bazy częstości występowania zastosowanych markerów Y-SNPs w województwie wielkopolskim.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Wykorzystano do badań:

- a) Plamy będące mieszaniną krwi mężczyzny i kobiety, w proporcjach 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000. Próby te zostały przygotowane w celu przeprowadzenia wstępnych badań metodą LightSNiP z wybranymi Y- SNPs. Te same próby zostały poddane również reakcji STR-PCR;
- b) Plamy krwi i nasienia będące mieszaniną kobiety i mężczyzny. Powyższe mieszaniny rozlano na różnym podłożu: na bibułach Whatmann® 3 mm i 2 mm oraz na kompresie z gazy. Mieszaniny przygotowano w proporcjach 1:30, 1:50 oraz 1:100 (♂ : ♀), w celu wstępnego sprawdzenia efektywności metody LightSNiP oraz zastosowanych Y-SNPs;
- c) Przygotowano różne mieszaniny DNA w postaci wyizolowanego DNA mężczyzny o stężeniu 5,6 ng/μl i DNA kobiety o stężeniu 5,3 ng/μl w proporcjach: 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000, w celu sprawdzenia granicy czułości metody real-time PCR z testem LightSNiP;
- d) Wymazy z jamy ustnej oraz krew od 108 niespokrewnionych mężczyzn biorących udział w sprawach o ustalenie ojcostwa oraz próby stanowiące ślady biologiczne opracowane w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UM w Poznaniu;
- e) Ślady biologiczne w postaci wymazów oraz krwi pobranej od niespokrewnionych osób w sprawach dotyczących przemoc seksualnej, które zostały opracowane w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej w latach 2008-2011 metodą STR-PCR.

Wybrano 25 spraw, gdzie badano 36 śladów w postaci wymazów z pochwy, 2 ślady w postaci wymazów z odbytu, 2 ślady pozostawione na fragmentach staników, 2 ślady obecne na fragmentach spodni, 11 śladów na majtkach, 2 ślady w postaci końcówek paznokci oraz materiał porównawczy pochodzący od 6 mężczyzn.

W wymienionych poniżej sprawach uzyskano trudną do interpretacji mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny lub tylko profil kobiety:

Sprawa nr 1: Zbadano 3 materiały dowodowe w postaci fragmentów majtek (A, B i C), gdzie wcześniej w badaniach STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano trudną do identyfikacji mieszaninę DNA. Powyższe próby poddano badaniu z zastosowaniem testu Hemophan na obecność hemoglobiny i w każdej z nich uzyskano wynik pozytywny, natomiast badając te same próby za pomocą testu PSA na wykrywanie obecności enzymu prostaty otrzymano wyniki negatywne.

Sprawa nr 2: Zbadano 2 materiały dowodowe (A i B) w postaci wymazów z pochwy oraz materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej podejrzanego w sprawie (C). Po wstępnych oględzinach materiału dowodowego uzyskano w próbach A i B pozytywny wynik podczas badania testem Hemophan na obecność hemoglobiny, natomiast te same próby poddane badaniu testem PSA na wykrywanie enzymu prostaty dały wynik negatywny. Podczas badania materiałów dowodowych metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano trudną do interpretacji mieszaninę DNA.

Sprawa nr 3: Wykorzystano do badań jako materiał dowodowy wymaz z pochwy (A) i wymaz z odbytu (B) oraz materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej podejrzanego (C). We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym w materiałach w postaci wymazów z pochwy i odbytu uzyskano trudną do analizy mieszaninę DNA. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 4: Zbadano 3 materiały dowodowe (A, B i C) w postaci wymazów z przedsonka pochwy-A, ze środka pochwy- B oraz ze sklepienia pochwy- C. Jako materiał porównawczy zbadano wymazy z jamy ustnej podejrzanego w sprawie (D). W badaniach metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano trudną do identyfikacji mieszaninę DNA podczas badania materiału dowodowego. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 5: W tej sprawie poddano badaniom dwa materiały dowodowe w postaci fragmentów majtek (A i B) oraz materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej (C). Podczas badania materiału dowodowego metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano profile genetyczne trudne do

analizy. W wyniku przeprowadzonych wstępnych oględzin materiału dowodowego A i B testem Hemophan na obecność hemoglobiny oraz testem PSA na obecność enzymu prostaty uzyskano wyniki negatywne.

Sprawa nr 6: Zbadano materiał dowodowy w postaci 3 wymazów z pochwy (A, B i C). Uzyskane wyniki metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym wskazały w powyższych próbach profile genetyczne trudne do interpretacji. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 7: Zanalizowano wymaz z pochwy, w którym wcześniej uzyskano profil genetyczny trudny do interpretacji metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym. Nie wykonano w tej sprawie wstępnego badania testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 8: Do badań wykorzystano dwa wymazy z pochwy (A i B), w których uzyskano trudną do identyfikacji mieszaninę DNA metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 9: Przeprowadzono analizę dwóch wymazów z pochwy: A- wymaz z przedsiionka pochwy i B- wymaz z pochwy. Dodatkowo zbadano 3 próby w postaci fragmentów majtek (C, D i E). W badaniach metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano we wszystkich próbach trudne do interpretacji profile genetyczne. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 10: Poddano badaniom 4 wymazy z pochwy (A, B, C i D), z których w wyniku przeprowadzonych badań metodą STR-PCR zestawem Y-filer (markery na chromosomie Y) firmy Applied Biosystems nie uzyskano produktu amplifikacji. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 11: Zbadano 2 wymazy z pochwy (A i B). W badaniach metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano w obu próbach profile genetyczne trudne do interpretacji. Nie wykonano w tej sprawie wstępnego badania testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 12: Przeprowadzono analizę na materiale dowodowym w postaci dwóch fragmentów stanika (A i B), gdzie w wyniku badań wykonanych metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny trudną do identyfikacji. Wynik markera amelogeniny wskazywał na allele X,X (kobieta). Powyższe próby poddano badaniu testem Hemophan na obecność hemoglobiny i uzyskano wynik pozytywny, natomiast otrzymano wynik negatywny podczas analizy prób A i B testem RSiD do wykrywania białka semenogeliny w ludzkim nasieniu.

Sprawa nr 13: Zbadano materiał dowodowy w postaci wymazu z pochwy. W badaniach metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym uzyskano trudny do analizy profil genetyczny. Wymaz poddano badaniu testem RSiD do wykrywania białka semenogeliny w ludzkim nasieniu, uzyskując wynik negatywny.

Sprawa nr 14: Dotyczy badania trzech materiałów dowodowych w postaci fragmentów majtek (A i B) oraz fragmentu spodni (C). Badania metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym wykazały w próbie A profil genetyczny kobiety, w próbie B mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny oraz w próbie C profil genetyczny kobiety. Powyższe próby poddano analizie testem Hemophan i uzyskano wynik pozytywny. Nie przeprowadzono badania testem RSiD lub PSA.

Sprawa nr 15: Poddano badaniu trzy materiały dowodowe w postaci fragmentów majtek (A i B) oraz fragmentu spodni (C). Badania metodą STR-PCR z markerami znajdującymi się w regionie autosomalnym przy badaniu prób A, B i C wykazały trudną do analizy mieszaninę DNA. Przeprowadzono analizę testem RSiD na obecność białka semenogeliny w ludzkim nasieniu we wszystkich próbach i uzyskano wynik negatywny, natomiast podczas badania próby C testem Hemophan na obecność hemoglobiny otrzymano wynik pozytywny.

Sprawa nr 16: Wykorzystano do badań wymaz z pochwy. Wyniki uzyskane metodą STR-PCR wykazały niekompletną mieszaninę DNA. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 17: Zbadano trzy wymazy z pochwy (A i B) oraz materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej mężczyzny podejrzanego w sprawie. Metodą STR-PCR uzyskano w próbie A profil kobiety, a w próbie B mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny, gdzie w markerze amelogeniny nie uzyskano allelu Y. Nie wykonano

w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 18: Badaniom poddano cztery materiały dowodowe w postaci wymazów z pochwy (A, B, C i D), 2 materiały dowodowe w postaci końcówek paznokci (E i F) oraz materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej pobranych od mężczyzny podejrzanego w sprawie (G). Metodą STR-PCR w badanym materiale dowodowym uzyskano trudną do interpretacji mieszaninę DNA. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 19: Przeprowadzono badanie na próbach w postaci wymazów z pochwy (A, B i C). Metodą STR-PCR uzyskano w tych próbach niekompletną mieszaninę DNA trudną do identyfikacji. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 20: Zbadano materiał dowodowy w postaci wymazu z pochwy, gdzie w badaniu metodą STR-PCR uzyskano trudną do analizy mieszaninę DNA. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 21: Zbadano materiał dowodowy w postaci fragmentów majtek (A i B). Metodą STR-PCR uzyskano niekompletną mieszaninę DNA. Powyższe próby poddano badaniu testem RSiD na obecność białka semenogeliny w ludzkim nasieniu i uzyskano wynik pozytywny.

Sprawa nr 22: Zbadano dwa wymazy z pochwy (A i B). Wyniki uzyskane metodą STR-PCR wskazywały na niekompletną mieszaninę DNA. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa nr 23: Poddano analizie wymaz z odbytu (A) oraz wymaz z pochwy (B). W powyższej sprawie metodą STR-PCR uzyskano trudną do interpretacji mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny, ze względu na przeważającą ilość materiału genetycznego pochodzenia żeńskiego. Nie wykonano w tej sprawie wstępnych badań testem Hemophan, RSiD lub PSA ze względu na małą ilość dostarczonego materiału do badań.

Sprawa 24: Dotyczy badania 3 materiałów dowodowych w postaci wymazów z pochwy (A, B i C), materiału dowodowego w postaci wymazu spod paznokci (D) oraz materiału porównawczego w postaci wymazów z jamy ustnej podejrzanego w sprawie

(E). W wyniku przeprowadzonych badań metodą STR-PCR uzyskano trudną do analizy mieszaninę DNA podczas badania prób A, B, C i D. Wykonano test RSiD na obecność białka semelogeniny w ludzkim nasieniu na próbach A, B i C i uzyskano wyniki negatywne. Materiału dowodowego D nie poddano badaniom testem RSiD.

Sprawa nr 25: Zbadano dwa wymazy z pochwy (A i B). Wyniki uzyskane metodą STR-PCR w regionie autosomalnym wskazywały tylko na profil genetyczny kobiety. Nie uzyskano produktu amplifikacji z zastosowaniem zestawu Y-filer. Powyższe wymazy poddano badaniom testem PSA i otrzymano wynik pozytywny.

- f) 52 próby w postaci krwi, fragmentów mięśnia, skóry z włosami, kości oraz włosów pochodzących od nieznanymi osób, dostarczonych do naszego Zakładu Medycyny Sądowej w Poznaniu do badań identyfikacyjnych. W powyższych próbach ze względu na wysoki stopień degradacji DNA nie uzyskano profilu genetycznego NN osób przy zastosowaniu markerów autosomalnych, co uniemożliwiło ich identyfikację.

3.2. Metody

3.2.1. Wstępne badania śladów biologicznych

Ślady biologiczne dotyczące spraw o przemoc seksualnej poddano wstępnej analizie na obecność hemoglobiny oraz nasienia przy pomocy testów Hemophan, PSA oraz RSiD, omówionych w rozdziale 1.4.

3.2.2. Izolacja DNA

Izolację DNA z wymazów z jamy ustnej, z plam krwi naniesionych na bibule Whatmann® 3mm oraz z plam krew-nasienie przeprowadzono metodą kolumnkową zestawem Sherlock AX firmy A&A Biotechnology według protokołu postępowania:

- 1) Wymazy poddano trawieniu przez 2 godz. z wodą jałową, buforem lizującym L 1.4 oraz roztworem Proteinazy K;
- 2) Po inkubacji próbę naniesiono na kolumnę z żółtym filtrem, a następnie wirowano 2 min. przy 10 000 obr/min. Ten etap służy do usuwania większych zanieczyszczeń pochodzących z podłoża oraz resztek fragmentów tkanek;

- 3) Kolumnę usunięto a przesącz, gdzie znajduje się DNA, przeniesiono do niebieskiej kolumny celem oczyszczenia DNA. Następnie wirowano 2 min. przy 10 000 obr/min. w temperaturze 7°C;
- 4) Przesącz wylano i dodano buforu płuczającego K2. Wirowano 2 min. przy 10 000 obr/min. w temperaturze 7°C, czynność powtórzono;
- 5) Przeniesiono kolumnę do nowej probówki i dodano buforu elucyjnego K3, wirowano 2 min. przy 10 000 obr/min. w temperaturze 7°C, czynność powtórzono;
- 6) Eluat zawierający DNA przeniesiono do probówki eppendorf o pojemności 1,5 ml zawierającej izopropanol oraz wzmacniacz precypitacji, następnie wirowano 20 min. przy 14 000 obr/min. w temperaturze 7°C;
- 7) Po ostatnim wirowaniu supernatant oddzielono a osad suszono w temperaturze pokojowej przez odwrócenie probówki do następnego dnia (na dnie probówki powinien się pojawić niebieski osad, który pozwoli śledzić proces rozpuszczania DNA);
- 8) Osad rozpuszczono w 100 µl jałowej wody.

Wszystkich wirowań dokonano przy pomocy wirówki MPW-65R firmy MPW med. Instruments. Bufory, Proteinaza K i kolumny filtracyjne dostarczono wraz z zestawem Sherlock AX, Firmy A&A Biotechnology. Izolację DNA z pełnej krwi dokonano metodą organiczną: chloroformowo – fenolową po uprzednim oczyszczeniu fenolu mercaptoetanołem (firmy Sigma), 1M tris-HCl pH8, 0,5M EDTA pH 8 oraz mieszaniną chloroform: alkohol izoamylowy w stosunku 24:1.

W pierwszym dniu:

- 1) Do 5 ml krwi (w falkonach o pojemności 50 ml, firmy Sarstedt) dodano 25 ml roztworu Tritonu (firmy Sigma) i wody dejonizowanej w stosunku 1:100;
- 2) Próby wirowano 20 min. przy 3000 rpm w temperaturze 4°C;
- 3) Supernatant wylano;
- 4) Do uzyskanego osadu dodano 35 ml buforu do lysis (Sacharoza, Tris oraz MgCl₂), mocno wstrząśnięto;
- 5) Próby wirowano 20 min. przy 3000 rpm w temperaturze 4°C;

- 6) Powtórzono punkt nr 4 i 5 aż do uzyskania białego osadu wolnego od hemoglobiny (hemoglobina jest inhibitorem reakcji PCR);
- 7) Wylano supernatant i dodano 3 ml zamrożonego buforu TEN (1 M Tris-HCl, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA pH 8);
- 8) Wstrząśnięto aż do rozpuszczenia bryłki zamrożonego buforu TEN, a następnie dodano wodę dejonizowaną do $\frac{3}{4}$ pojemności falkonu;
- 9) Ponownie wirowano 20 min. przy 3000 rpm w temperaturze 4°C;
- 10) Znowu dodano 3 ml zamrożonego buforu TEN, osad roztrzepano bryłką. Po wytrząśnięciu zostawiono aż do osiągnięcia temperatury pokojowej;
- 11) Do każdej próby dodano 150 μ l SDS (20%, Firmy Sigma) oraz 150 μ l Proteiny K o stężeniu 10 mg/ml (Firmy Promega®)
- 12) Inkubowano w temperaturze 37°C przez noc.

Następnego dnia:

- 13) Próby wyjęto z cieplarki i pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej;
- 14) Dodano 1,5 ml nasyconego NaCl i 3 ml roztworu chloroformu: alkoholu izoamyłowego w stosunku 24:1; mocno mieszano;
- 15) Wirowano 15 min. przy 3000 rpm w temperaturze pokojowej;
- 16) Górną warstwę ściągano przy pomocy pipety pasterowskiej i przenoszono do próbki typu falkon o pojemności 15 ml (firmy Sarstedt);
- 17) Dodano 3 ml fenolu, mocno mieszano, wirowano 3 min przy 1000 rpm w temperaturze pokojowej;
- 18) Etap 17 powtórzono 3-krotnie;
- 19) Ponownie ściągano górną fazę i supernatant przenoszono do czystej próbki typu falkon o pojemności 15 ml (firmy Sarstedt);
- 20) Dodano 3 ml mieszaniny chloroformu: alkohol izoamyłowym w stosunku 24:1, mocno mieszano, wirowano 3 min. przy 1000 rpm w temperaturze pokojowej;
- 21) Etap 20 powtórzono 2-krotnie;
- 22) Ściągano pipetą pasterowską górną warstwę i przeniesiono do falkonu – 50 ml (Sarstedt);
- 23) Dodano do $\frac{3}{4}$ objętości próbki zimny alkohol absolutny;

- 24) Wytrącone DNA zebrano za pomocą pipety automatycznej z odpowiednią końcówką i przeniesiono do sterylnej probówki typu eppendorf o pojemności 1,5 ml;
- 25) DNA suszono przez 2 godz. w temperaturze pokojowej;
- 26) Dodano 300 µl jałowej wody do każdej probówki zawierającej DNA.

Wirowania dokonano przy pomocy wirówki MPW-350R, Firmy MPW Med. Instruments. Odczynniki do przyrządzania buforu do lysis, buforu TEN oraz do procesu oczyszczania fenolu zakupiono w firmie Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH S.A.).

Izolacji DNA z materiału w postaci fragmentów kostnych dokonano przy użyciu powyżej omówionej izolacji fenolowej, po uprzednim skruszeniu materiału kostnego w ciekłym azocie za pomocą młynka FreezerMill 6750 (Spex CertiPrep, Matuchen, USA).

Zastosowano również izolację kolumnkową za pomocą zestawu GeneMatrix Bone Purification Kit, Firmy EURx Ltd. Etapy tej izolacji były następujące:

- 1) Umieszczono 0,4 g rozdrobnionej kości w probówce 2 ml dostarczonej wraz z zestawem;
- 2) Dodano 800 µl buforu Lyse BN, worteksowano;
- 3) Dodano 40 µl Proteiny K (w zestawie), worteksowano;
- 4) Inkubowano w temperaturze 56°C, przez noc;

Następnego dnia:

- 5) Dodano 40 µl buforu aktywacyjnego BN do minikolumny, pozostawiono w temperaturze pokojowej dla zapewnienia kompletnego nasączenia buforem aktywacyjnym membrany minikolumny, a tym samym uzyskania maksymalnej wydajności wiązania DNA;
- 6) Dodano 800 µl buforu Sol BN, worteksowano;
- 7) Inkubowano w temperaturze 56°C, przez 10 min.;
- 8) Wirowano 5 min. przy 14 000 rpm;
- 9) Przeniesiono 1,2 ml supernatantu do nowej probówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml;
- 10) Dodano 600 µl 96% alkoholu, worteksowano;
- 11) Wirowano przez 2 min. przy 12.000 rpm;
- 12) Przeniesiono 600 µl supernatantu do minikolumny wiążącej DNA;
- 13) Wirowano przez 2 min. przy 12 000 rpm;

- 14) Wyjęto minikolumnę, wylano przesącz i umieszczono minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej;
- 15) Powtórzono kroki 12-14;
- 16) Przeniesiono pozostałość supernatantu do minikolumny, znajdującej się w probówce odbierającej;
- 17) Wirowano przez 2 min. przy 12 000 rpm;
- 18) Powtórzono krok nr 14;
- 19) Dodano 500 μ l buforu płuczącego Wash BNX1 do minikolumny i wirowano przez 2 min. przy 12 000 rpm;
- 20) Powtórzono krok 18;
- 21) Dodano 500 μ l buforu płuczącego Wash BNX2 do minikolumny i wirowano 3 min. przy 12 000 rpm;
- 22) Minikolumnę umieszczono w nowej sterylnej probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml;
- 23) Dodano 30-100 μ l buforu do elucji (10mM Tris-HCl, pH8, 5) ogrzanego do temperatury 70°C;
- 24) Minikolumnę pozostawiono 5 min. w temperaturze pokojowej,
- 25) Wirowano minikolumnę przez 2 min. przy 12 000 rpm;
- 26) Usunięto minikolumnę, zamknięto probówkę;

DNA jest gotowe do dalszych analiz.

Wszystkich wirowań dokonano wirówką MPW-65R Firmy MPW Med. Instruments. Bufory oraz odczynniki zostały dostarczone razem z kitem firmy EURx.

3.2.3. Oczyszczanie DNA

Oczyszczania DNA dokonano zestawem do zagęszczania i oczyszczania DNA przed i po reakcji PCR.

Do naszych badań zaleca się wykonanie tej czynności również przed reakcją PCR ze względu na duże prawdopodobieństwo obecności zanieczyszczeń, które mogą się znajdować w próbach dostarczonych do badań i potencjalnie mogą działać, jako inhibitory reakcji PCR.

Do tego procesu zastosowano kolumny filtracyjne Amicon Ultra 30k Montage® PCR Centrifugal Filter Devices, firmy Millipore.

- Pojemnik z filtrem umieszczono w probówce dostarczonej wraz z zestawem;

- Dodano 300 μ l wody jałowej oraz 100 μ l roztworu zawierającego DNA;
- Wirowano 15 min. przy 6000 rpm;
- Wyjęto pojemnik z filtrem (gdzie znajduje się DNA) z probówki, odwrócono i włożono do nowej probówki (w zestawie);
- Dodano do odwróconego filtra 20 μ l wody jałowej;
- Wirowano 2 min. przy 6000 rpm.

Uzyskany eluat jest gotowy do dalszych badań.

Wirowano przy wirówką firmy Sigma 1-13.

3.2.4. Pomiar stężenia DNA

Pomiaru stężenia DNA dokonano za pomocą Spektrofotometru NanoDrop, wersja ND-1000 V3.1.0, Firmy NanoDrop Technologies, Inc, USA.

Wyniki uzyskano w formie wykresu, gdzie porównuje się otrzymaną absorbancję z długością fali zastosowanej do zmierzenia kwasów nukleinowych. Wyniki stężenia podane są w jednostce ng/ μ l. Uzyskany współczynnik absorbancji próbki przy 260 i 280 nm pozwala na ocenę czystości DNA (260 nm : 280 nm).

Spektrofotometr ten nie pozwala na pomiar stężenia DNA poniżej 0,1 ng/ μ l w związku z tym rozcieńczono 10 prób 100 razy.

3.2.5. Real-time PCR z barwnikiem SYBR Green I - sY81

Do reakcji zastosowano YSNP – sY81 (Seielstad et al.1994) (GBD n°S76940), amplikon o długości 209 pz, należący do haplogrupy E3a oraz markera M2 i znajdujący się w pozycji q11.222 na chromosomie Y. Sekwencje primerów odszukano na stronie internetowej www.yhrd.org. Zostały one zsyntetyzowane przez firmę TIB®-MOLBIOL, Niemcy:

Forward 5' aggcactggtcagaatgaag 3'

Reverse 5' aatggaaaatacagctcccc 3'

Primer Forward o stężeniu 129,6 μ M:

- Odwirowano i dodano 1296 μ l specjalnej wody do reakcji PCR, otrzymując stężenie 100 pmol/ μ l, zworteksowano i zwirowano;
- Z przygotowanego roztworu, aby uzyskać stężenie 25 pmol/ μ l, potrzebne do reakcji PCR, pobrano 100 μ l i rozpuszczono w 300 μ l wody do PCR w oddzielnej probówce typu Eppendorf (firmy Sarstedt).

Primer Reverse o stężeniu 130,1 μM :

- Odwirowano i dodano 1301 μl wody do PCR, otrzymując stężenie 100 $\text{pmol}/\mu\text{l}$, zworteksowano i zwirowano;
- Z przygotowanego roztworu, aby uzyskać stężenie 25 $\text{pmol}/\mu\text{l}$, potrzebne do reakcji PCR, pobrano 100 μl i rozpuszczono w 300 μl wody do PCR w oddzielnej probówce typu Eppendorf (firmy Sarstedt).

Do uzyskania optymalnych parametrów reakcji PCR, jak temperatura przyłączenia starterów, dokonano amplifikacji za pomocą MasterCycler Gradient, firmy Eppendorf.

Do tego etapu przygotowano 8 prób w 12 dołkach płytki, co równa się 96 próbom. Przygotowano mieszaninę reakcyjną zawierającą:

- 6,25 μl Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences)
- 0,5 μl Forward Primer (TIB®Molbiol)
- 0,5 μl Reverse Primer (TIB®Molbiol)
- 4,25 μl H₂O do PCR (Fermentas Life Sciences)

Do każdego dołka dodano 11,5 μl mieszaniny reakcyjnej oraz 1 μl matrycy DNA.

Wybrano następujące etapy PCR:

1. Temp. = 94°C przez 7 min.;
2. Temp. = 95°C przez 10 sek.;
3. Temp. = 60°C przez 20 sek. (przyłączenie primerów)
Gradient = 7°C \pm (do 67°C);
4. Temp. = 72°C przez 30 sek. (aktywność polimerazy);
5. Replikacja 37 cykli;
6. Temp. = 72°C przez 2 min.;
7. Temp. = 94°C przez 1 min.;
8. Temp. = 40°C.

Analizę przeprowadzono na LightTyper® firmy Roche® Diagnostics.

108 prób izolowanego DNA metodą organiczną – fenolową, metodą kolumnkową zestawem Sherlock AX oraz metodą kolumnkową zestawem EURx do kości poddano reakcji amplifikacji z Y-SNP- sY81 i z barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green I.

Przygotowano mieszaninę reakcyjną do PCR w ilościach [159]:

- 6,25 μ l Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Life Sciences);
- 0,5 μ l Forward Primer (TIB®Molbiol);
- 0,5 μ l Reverse Primer (TIB®Molbiol);
- 4,25 μ l H₂O do PCR (Fermentas Life Sciences).

Do każdej kapilary o pojemności 20 μ l (Roche® Diagnostics) dodano 11,5 μ l mieszaniny reakcyjnej oraz 1 μ l matrycy DNA.

Kapilary umieszczono w statywie firmy Roche® Diagnostics, zapewniającym odpowiednią niską temperaturę reakcji. Kapilary włożono do odpowiednich otworów na karuzeli firmy Roche® Diagnostics – 20 μ l LightCycler® Sample Carousel 2.0 oraz zwirowano w wirówce LCC Carousel Centrifuge 2.0, firmy Roche® Diagnostics.

Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy użyciu LightCycler® 2.0, firmy Roche® Diagnostics na ścieżce fluorescencyjnej 530 w następujących warunkach:

- denaturacja wstępna: 95°C przez 7 min.- 1 cykl;
- amplifikacja: 95°C przez 0 sek., 64°C przez 15 sek., 72°C przez 30 sek. – 40 cykli;
- topnienie: 95°C przez 0 sek., 50°C przez 0 sek., 95°C przez 0 sek.;
- chłodzenie: 40°C przez 0 sek..

Analizę temperatur topnienia przeprowadzono za pomocą wersji programu 4.05, firmy Roche® Diagnostics.

3.2.6. Metoda LightSNiP

Metoda ta pozwala na analizę SNPs przy użyciu sond molekularnych typu FRET (punkt 1.1.2.2.) oraz na uzyskanie genotypu badanego SNP opierając się na działaniu sondy SimpleProbe®.

W niniejszej pracy wykorzystano 7 SNPs znajdujących się na chromosomie Y, testy LightSNiP zawierające Y-SNPs oraz sondy firmy TIB®Molbiol, Niemcy.

Tabela. nr 3.1. Charakterystyka opracowanych Y SNPs.

Loci SNP	Gen	Lokalizacja chromosomalna	Zmiana nukleotydowa	Długość produktu PCR	Referencje
rs3900	CYorf15A	Yq11.222	C/G	91 pz	Underhill et al. 1997
rs34442126	USP9Y	Yq11.21	C/T	112 pz	Zerjal et al. 1997
rs17222279	NLGN4Y	Yq11.221	A/G	77 pz	Underhill et. al. 1997
rs2032604	USP9Y	Yq11.21	G/T	61 pz	Underhill et. al. 1997
rs11553055	ASMTL	Yp11.32	G/A	101 pz	GenBank BM052639.1
rs17315821	intergenic	Yq11.221	C/T	60 pz	Karafet et al. 2008
rs17306671	intergenic	Yq11.21	T/A	52 pz	Karafet et al. 2008

Rs3900 znajduje się na chromosomie Y, w miejscu niekodującym białko. Znany jest również jako marker M9, należący do haplogrupy K. Zlokalizować go można w genie CYorf15A, który należy do rodziny taxilini. Prawdopodobnie związany jest z regulacją transkrypcji osteoblastów [248], natomiast ogólne funkcje genu CYorf15A pozostają do końca nieznane. Pomimo to przypuszcza się, że geny CYorf15A oraz CYorf15B kodują homologiczne białka na końcach amino-węglowych, odpowiednich do genu CYorf15. Dowodem na to jest ograniczenie w identyfikacji transkryptów w różnych miejscach [248].

Rs34442126 znajduje się w chromosomie Y, w miejscu niekodującym białko. Znany też, jako marker M46, należący do haplogrupy N1C oraz N3, znajdujący się w genie USP9Y. Gen ten, jest odpowiedzialny za proces tworzenia ponad 60 białek związanych z ubikwityną - proteazą specyficzną, która należy do grupy peptydaz-cysteinowych C19 [117, 139]. Enzym ten katalizuje wewnątrztkankowy podział molekuly ubikwityni [7, 139]. Gen zlokalizowany jest w regionie AZF, nazywanym czynnikiem azoospermii; uważa się, że bierze udział w rozwoju plemników. Mężczyźni, którzy mają zaburzenia lub brak produkcji plemników, często mają delecję w regionie AZF, zwłaszcza w genie USP9Y [139, 210].

Rs17222279 znajduje się na chromosomie Y, w miejscu niekodującym białko. Znany jest też jako marker M467, należy do haplogrupy R1. Zlokalizować go można w genie NLGN4Y należącym do grupy genów NLGN, które nazywają się neuroliginami i odgrywają ważną rolę w rozwoju różnego rodzaju synaps oraz są mediatorami w specyficzności synoptycznej [38]. Działanie genów NLGN potwierdza się w rozwoju systemu nerwowego. Mutacje w genach NLGN3 i NLGN4 wykryto u pacjentów z rodzinnym autyzmem, w syndromie Aspergera oraz w ociężałości umysłowej związanej z chromosomem X [92, 121].

Rs2032604 na chromosomie Y również znajduje się w regionie niekodującym białko. Można go nazwać też M172, należy do haplogrupy J2. Tak jak SNP rs34442126 znajduje się w genie USP9Y [139].

Rs11553055 może się znajdować na chromosomie Y i na chromosomie X ponieważ usytuowany jest w regionie pseudoautosomalnym (PAR 1 i PAR 2), gdzie może dojść do rekombinacji. Region ten powstaje podczas mejozy, gdzie dochodzi do parowania rekombinacji z chromosomem X. W konsekwencji geny zlokalizowane w rejonach PAR są dziedziczone w ten sam sposób jak geny autosomalne. PAR1 jest zlokalizowany na końcowym fragmencie krótkiego ramienia chromosomu (Yp), a PAR2 na końcu długiego ramienia (Yq). PAR1 i PAR2 zajmują odpowiednio 2600 i 320 kpz. SNP ten występuje w kodującym regionie chromosomu Y w genie ASMTL, który katalizuje reakcję biosyntezy melatoniny, hormonu obniżającego temperaturę ciała oraz ułatwiającego zasypianie [122, 177].

Rs17315821 i rs17306671 znajdują się w regionie intergenowym (ang. intergenic region- IGR), odcinek sekwencji DNA znajdująca się między grupami genów. Region ten może spełnić funkcje kontroli pobliskich genów, natomiast rola większość tych regionów pozostaje nieznana. Powyższe Y-SNPs umieszczone są w regionie niekodującym białko, poza grupami genów. Zazwyczaj takie sekwencje znajdują się nad regionem kodującym białko po stronie 5' i jak wcześniej omówiono biorą udział w ekspresji genów na poziomie transkrypcji [6, 31]. Rs17315821 znany jest też jako marker P123 a rs17306671 jako marker P125. Oba SNPs należą do haplogrupy IJ [239, 240].

Wszystkie testy LightSNiP przygotowano dla 96 reakcji:

- probówkę odwirowano (na dnie pojawił się żółty osad);
- dodano 100 μ l H₂O do PCR do probówki, zworteksowano i zwirowano;
- rozpipetowano po 25 μ l do 4 probówek;
- przechowywano gotowe Y-SNPs do analizy w temperaturze - 20°C.

Bardzo ważnym komponentem reakcji real-time PCR jest polimeraza. Do analizy użyto zestawu LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, firmy Roche® Diagnostics. Zestaw ten zawiera probówkę z enzymem (LightCycler®Fast-Start Enzyme 1a), probówkę z mieszaniną reakcyjną – primerami oraz sondami (LightCycler®Fast –Start Enzyme 1b), probówkę z MgCl₂ - 25 mM oraz H₂O PCR-Grade. Cały kit przechowywano w temperaturze -20°C.

Przed reakcją PCR przygotowano odpowiedni Master Mix według protokołu postępowania firmy Roche® Diagnostics.

3.2.6.1. Real-time PCR testem LightSNiP oraz Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.

Według protokołu postępowania dołączonego do testów LightSNiP – rs3900, LightSNiP-rs34442126, LightSNiP-rs17222279, LightSNiP-rs2032604, LightSNiP-rs11553055, LightSNiP-rs17315821 i LightSNiP-rs17306671 firmy TIB®Molbiol, mieszanina reakcyjna powinna być przygotowana w następujący sposób [160-167]:

- 14,4 µl – 10,4 µl H₂O do PCR;
- 1 µl Reagent Mix (LightSNiP rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 I i rs17306671);
- 2 µl FastStart DNA Master;
- 1,6 µl MgCl₂ (25mM);
- 1 µl-5 µl DNA (o stężeniu około 50 ng).

Zalecana końcowa objętość mieszaniny reakcyjnej – 20 µl.

Końcowe stężenie MgCl₂ w mieszaninie reakcyjnej – 3 mM.

Kapilary z mieszaniną reakcyjną oraz DNA włożono do odpowiednich otworów w karuzeli firmy Roche® Diagnostics – 20 µl LightCycler Sample Carousel 2.0 oraz zwirowano w wirówce LCC Carousel Centrifuge 2.0, Firmy Roche® Diagnostics.

Reakcję amplifikacji przeprowadzono przy użyciu LightCycler® 2.0 firmy Roche® Diagnostics na ścieżce fluorescencyjnej 530.

Parametry według protokołu postępowania firmy TIB® Molbiol:

- denaturacja - 95°C przez 10 min.- 1 cykl;
- amplifikacja - 95°C przez 10 sek., 60°C przez 10 sek. (Single), 72°C przez 15 sek.- 45 cykli;
- topnienie - 95°C przez 20 sek., 40°C przez 20°C, 85°C przez 0 sek. (0,2°C/s-continuous) - 1 cykl;
- chłodzenie- 40°C przez 30 sek.

Analizę temperatur topnienia przeprowadzono za pomocą wersji programu wersji 4.05 Firmy Roche® Diagnostics. Przygotowano mieszaninę reakcyjną w niskiej

temperaturze za pomocą specjalnego statywu. Wirowano za pomocą wirówki minispin, firmy Eppendorf.

Jako kontrolę negatywną użyto H₂O do PCR oraz DNA z pochodzenia żeńskiego.

3.2.6.1.1. Optymalizacja warunków reakcji PCR

Celem otrzymania jak najlepszych rezultatów podczas analizy materiału w postaci śladów biologicznych optymalizację przeprowadzono w zakresie ilości matrycy DNA, ilości jednostek polimerazy Taq, stężenia MgCl₂ oraz liczby cykli termicznych. Po zmianie każdego parametru analizowano wydajność procesu amplifikacji. Do przeprowadzenia powyższych zmian skłoniła nas możliwość przystosowania tej metody do analiz genetyczno – sądowych. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.

- testowano następujące ilości matrycy: 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 i 1,5 ng. Resztę składników w mieszaninie reakcyjnej oraz parametry reakcji amplifikacji pozostawiono bez zmian (według protokołu postępowania opisanego w rozdziale 3.2.6.1.)

- testowano następujące ilości MgCl₂: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 i 5,0 mM. Resztę składników w mieszaninie reakcyjnej oraz parametry reakcji amplifikacji pozostawiono bez zmian (według protokołu postępowania opisanego w rozdziale 3.2.6.1.)

- zalecana ilość cykli według protokołu postępowania to 45 cykli. Przeprowadzono reakcję amplifikacji w 40, 45, 50 i 55 cyklach.

3.2.7. Badania metodą STR-PCR

Wszystkie próby poddane badaniom metodą LightSNiP wcześniej zanalizowano metodą STR-PCR. W ten sposób można było sprawdzić przydatność wybranych SNPs za pomocą LightCycler®, firmy Roche® w badaniach genetyczno - sądowych.

Próby po izolacji chloroformem-fenolem oraz metodą kolumnkową poddano amplifikacji przy zastosowaniu zestawów PowerPlex®16 i PowerPlex®ESX17, firmy Promega oraz zestawu AmpFlSTR®Yfiler, firmy Applied Biosystems.

Warunki reakcji amplifikacji dla zestawu PowerPlex®16:

Stężenie DNA zalecane do pracy z tym zestawem oscyluje między 0,5 ng a 1 ng.

Tabela nr 3.2. Etapy oraz parametry reakcji amplifikacji zestawem PowerPlex®16.

Wstępna inkubacja (denaturacja)	10 cykli			Ostatnia elongacja	Chłodzenie
	Denaturacja	Przyłączenie primerów	Elongacja		
95°C 11 min.	94°C 30 sek.	60°C 30 sek.	70°C 45 sek.	60°C 30 min.	4°C ∞
	22 cykli				
	90°C 30 sek.	60°C 30 sek.	70°C 45 sek.		

Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Gene Amp® PCR System 9700 wersja 3.09, firmy Applied Biosystems.

Próby po amplifikacji zestawem PowerPlex® 16, przygotowano do elektroforezy w następujący sposób:

- mix reakcyjny zawierający 24,5 µl Hi-Di™ formamide (firmy Applied Biosystems) i 0,5 µl standardu wielkości ILS Internal Lane Standard 600 (firmy Promega);
- dodano do próbki o pojemności 0,5 µl : 25 µl powyższego mixu reakcyjnego oraz 1 µl amplifikowanego DNA;
- przygotowano w ten sam sposób, co próby, drabinkę alleliczną, dostarczoną do każdego zestawu, w tym przypadku do PowerPlex®16 (firmy Promega).

Fragmety DNA uzyskane po amplifikacji rozdzielono przez elektroforezę kapilarną w analizatorze genetycznym ABI PRISM 310, firmy Applied Biosystems.

Zastosowano 4-kolorową matrycę do zestawu PowerPlex®16: barwnik Fluorescency matrix (niebieski kolor), barwnik JOE matrix (zielony kolor), barwnik TMR matrix (żółty kolor) oraz barwnik CXR matrix (czerwony kolor).

Zastosowano moduł GS STR POP4 (1 ml) A i wyniki zanalizowano za pomocą programu GeneMapper® ID wersja 3.2. Firmy Applied Biosystems.

Warunki reakcji amplifikacji dla zestawu PowerPlex®ESX17:

Zalecane stężenie DNA do pracy zestawem ESX17 znajduje się w zakresie około 0,5 ng.

Tabela nr 3.3. Etapy oraz parametry reakcji amplifikacji przy zastosowaniu zestawu PowerPlex®ESX17.

Wstępna inkubacja (denaturacja)	30 cykli			Ostatnia elongacja	Chłodzenie
	Denaturacja	Przyłączenie primerów	Elongacja		
96°C 2 min.	94°C 30 sek.	59°C 2 min.	72°C 90 sek.	60°C 45 min.	4°C ∞

Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Gene Amp® PCR System 9700 wersja 3.09, firmy Applied Biosystems.

Próby po amplifikacji zestawem PowerPlex®ESX17, przygotowano do elektroforezy kapilarnej w następujący sposób:

- mix reakcyjny zawierający 24,5 µl Hi-Di™ formamide (firmy Applied Biosystems) i 0,5 µl standardu wielkości CC5 Internal Lane Standard 500 (firmy Promega);
- dodano do próbki o pojemności 0,5 µl : 25 µl powyższego mixu reakcyjnego oraz 1 µl amplifikowanego DNA;
- przygotowano w ten sam sposób, co próby, drabinkę alleliczną, dostarczoną do każdego zestawu, w tym przypadku do PowerPlex®ESX17 i ESI17 (firmy Promega).

Fragmety DNA uzyskane po amplifikacji rozdzielono przez elektroforezę kapilarną w analizatorze genetycznym ABI PRISM 310, firmy Applied Biosystems.

Zastosowano 5- kolorową matrycę do zestawu PowerPlex® ESX17: barwnik Fluorescency matrix (niebieski kolor), barwnik JOE matrix (zielony kolor), barwnik TMR-ET matrix (żółty kolor), barwnik CXR-ET matrix (czerwony kolor) oraz barwnik CC5 matrix (pomarańczowy kolor).

Zastosowano moduł GS STR POP4 (1ml) G5v2 i wyniki zanalizowano za pomocą programu GeneMapper® ID wersja 3.2., firmy Applied Biosystems.

Warunki reakcji amplifikacji dla zestawu AmpFISTR®Yfiler:

Do amplifikacji powyższymi zestawami potrzebne jest około 0,1 ng wyizolowanego DNA.

Tabela nr 3.4. Etapy oraz parametry reakcji PCR zastosowane do zestawu AmpFlSTR®Yfiler.

Wstępna inkubacja (denaturacja)	30 cykli			Ostatnia elongacja	Chłodzenie
	Denaturacja	Przyłączenie primerów	Elongacja		
95°C 11 min.	94°C 1 min.	61°C 1 min.	72°C 1 min.	60°C 80 min.	4°C ∞

Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Gene Amp® PCR System 9700 wersja 3.09, firmy Applied Biosystems.

Po amplifikacji próby przygotowano do elektroforezy w poniższy sposób:

- mix reakcyjny zawierający 24,5 µl Hi-Di™ formamide (firmy Applied Biosystems) i 0,5 µl standardu wielkości Gene Scan™ - 500 LIZ® Size Standard (firmy Applied Biosystems), wortexowano i wirowano;
- dodano do próbki o pojemności 0,5 µl : 25 µl powyższego mixu reakcyjnego oraz 1,5 µl amplifikowanego DNA;
- przygotowano w ten sam sposób drabinkę alleliczną, dostarczoną do każdego zestawu, w tym przypadku do AmpFlSTR®Yfiler (firmy Applied Biosystems).

Fragmety DNA uzyskane po amplifikacji rozdzielono przez elektroforezę kapilarną w analizatorze genetycznym ABI PRISM 310, firmy Applied Biosystems.

Do elektroforezy kapilarnej wybrano odpowiednią matrycę, 5-kolorową do zestawu AmpFlSTR®Yfiler: barwnik 6 - FAM (niebieski kolor), VIC (zielony kolor), NED (żółty kolor), PET (czerwony kolor) oraz LIZ (pomarańczowy kolor).

Zastosowano moduł GS STR POP4 (1ml) G5v2 i wyniki zanalizowano za pomocą programu GeneMapper® ID wersja 3.2., firmy Applied Biosystems.

Do wszystkich elektroforez zastosowano polimer 4 (POP4™), kapilary o długości 47 cm i grubości 50 µm oraz bufor do analizatora genetycznego 10 stężony z EDTA firmy Applied Biosystems.

Do przygotowania prób po amplifikacji do elektroforezy użyto próbek o pojemności 0,5 ml oraz gumowe korki firmy Polgen.

Wirowania dokonano wirówką minispin, firmy Eppendorf.

3.2.8. Analiza biostatystyczna

Częstości allelicznej każdego loci Y-SNPs obliczono prostą metodą liczenia wariantów genowych. Wskaźnik różnicowania haplotypowego GD skalkulowano na podstawie formuły: $GD = 1 - \sum p_i^2$, gdzie p_i stanowi częstości haplotypu lub allelu [140, 150]. Wskaźnik dyskryminacji DC obliczono przy pomocy wzoru: $DC = H/N$, gdzie H jest ogólną ilością badanych haplotypów oraz N ilością badanych mężczyzn [99] oraz wskaźnik polimorfizmu genomowego lub haplotypowego HD obliczono na podstawie wzoru: $HD = N (1 - \sum f_i^2) / N - 1$ [99, 140]. Celem analizy statystycznej jest sprawdzenie przydatności wybranych Y-SNPs jako zestaw do badań populacyjnych oraz do analizy porównawczej śladów biologicznych.

4. WYNIKI

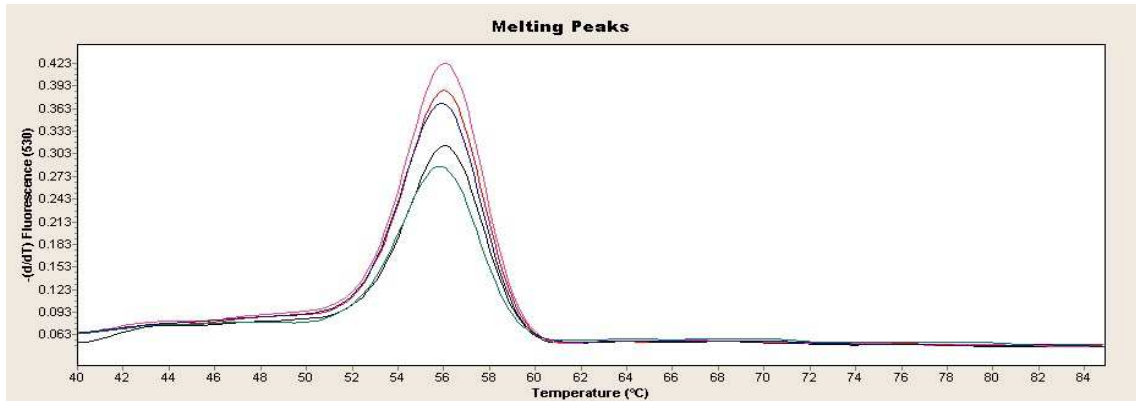
Techniką PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) można uzyskać wyniki w krótkim czasie. Metoda LightSNiP pozwala na badania Polimorfizmu Pojedynczego Locus (SNP), co skłoniło nas do testowania tej metody oraz do sprawdzenia jej przydatności w badaniach genetyczno-sądowych.

Poddano optymalizacji niektóre składniki mieszaniny reakcyjnej oraz parametry reakcji PCR. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę z zastosowaniem różnych stężeń matrycy DNA – 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 i 1,5 ng. Przy stężeniu matrycy wynoszącym 0,5, 1,0 i 1,5 ng z zastosowaniem rs34442126 i rs11553055 uzyskano produkt amplifikacji. Z zastosowaniem rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671 uzyskano produkt amplifikacji już przy stężeniu DNA 0,075 ng. Optymalne stężenie MgCl₂ uzyskano w zakresie między 1,5 a 3,5 mM. Zwiększenie ilości cykli do 50 skutkowało produktami amplifikacji w próbach z niskim stężeniem DNA.

Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji wprowadzono drobne zmiany w mieszaninie reakcyjnej oraz dodano 5 cykli do etapu amplifikacji. Końcową objętość mieszaniny reakcyjnej zmniejszono do 10 µl. Badania przeprowadzono w następujący sposób:

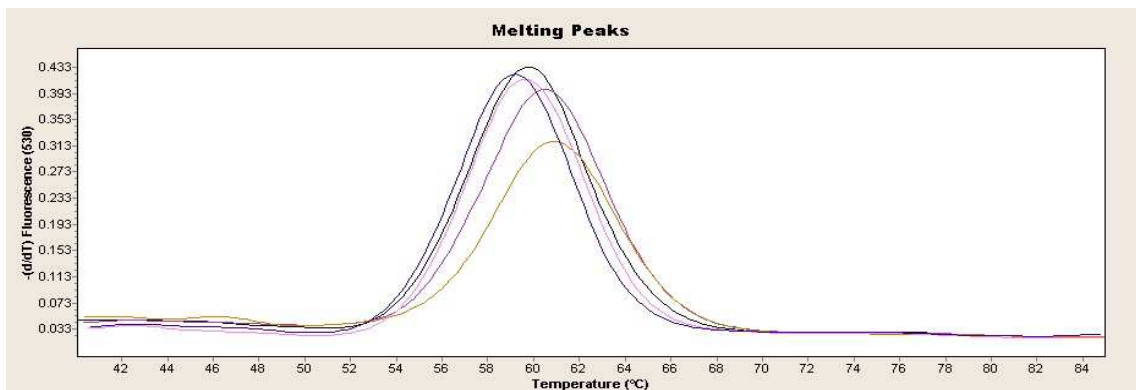
- Mieszanina reakcyjna
 - 5,2 µl H₂O do PCR;
 - 0,5 µl Reagent Mix (LightSNiP rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671);
 - 1 µl FastStart DNA Master Hyprobe;
 - 0,8 µl MgCl₂ (25mM);
 - 2,5 µl DNA.
- Parametry reakcji amplifikacji
 - denaturacja – 95°C przez 10 min.- 1 cykl;
 - amplifikacja – 95°C przez 10 sek., 60°C przez 10 sek. (single), 72°C przez 15 sek. - 50 cykli;
 - topnienie – 95°C przez 20 sek., 40°C przez 20 sek., 85°C przez 0 sek. (0,2°C/s-continuos) - 1 cykl;
 - chłodzenie- 40°C przez 30 sek.

W celu sprawdzenia czułości metody LightSNiP przygotowano kilka mieszanin (w mikrolitrach) zawierających materiał pochodzący od mężczyzny i kobiety (krew) w proporcjach: 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000 (♂ : ♀). Przeprowadzono badania z zastosowaniem testu LightSNiP i Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs1722279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.



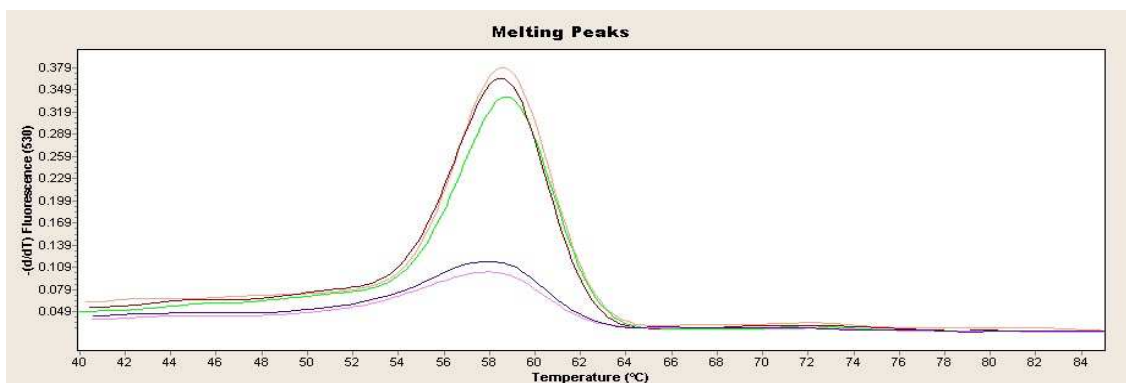
Ryc. nr 4.1. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 oraz 1:50 przy zastosowaniu LightSNiP – rs34442126.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:100, 1:000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP - rs34442126.



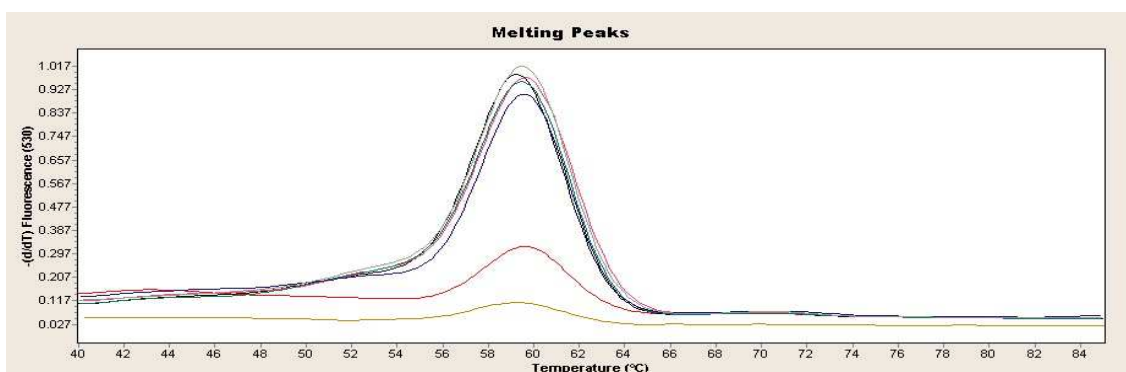
Ryc. nr 4.2. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 oraz 1:50 przy zastosowaniu LightSNiP – rs11553055.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:100, 1:000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP – rs11553055.



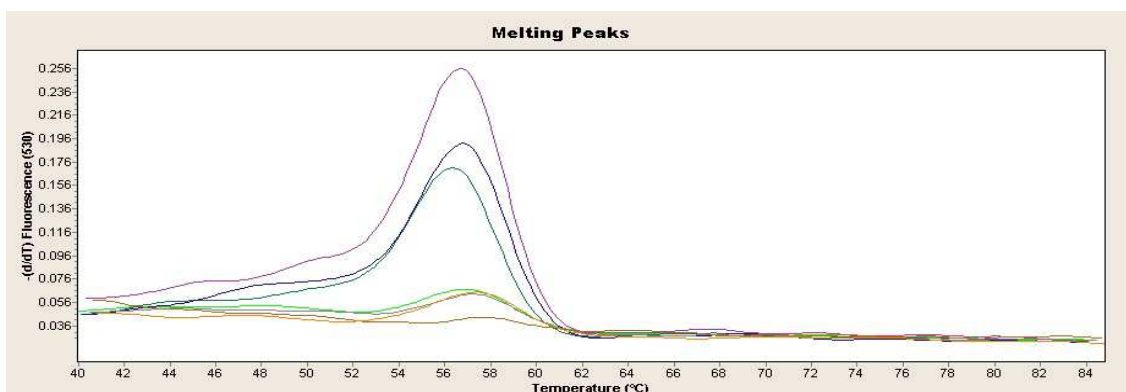
Ryc. nr 4.3. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 oraz 1:50 przy zastosowaniu LighSNiP – rs3900.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:100, 1:000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP – rs3900.



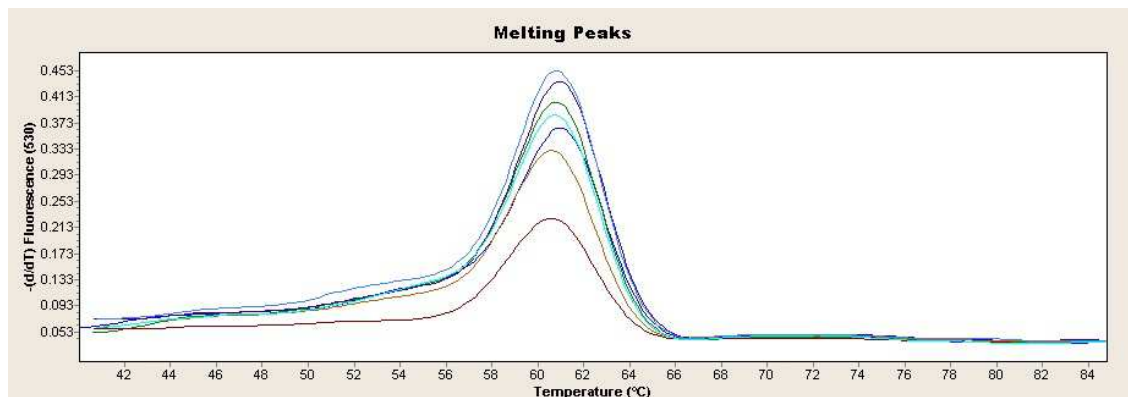
Ryc. nr 4.4. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LighSNiP – rs1722279.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP - rs1722279.



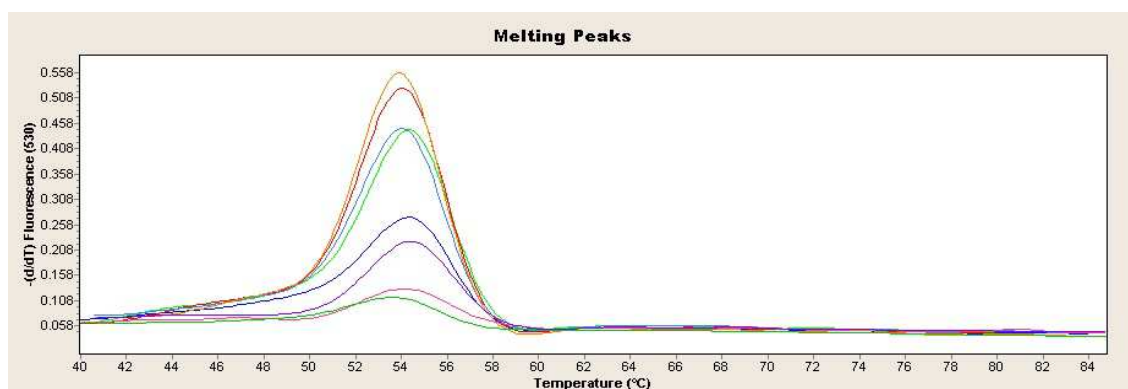
Ryc. nr 4.5. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LighSNiP – rs2032604.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP - rs2032604.



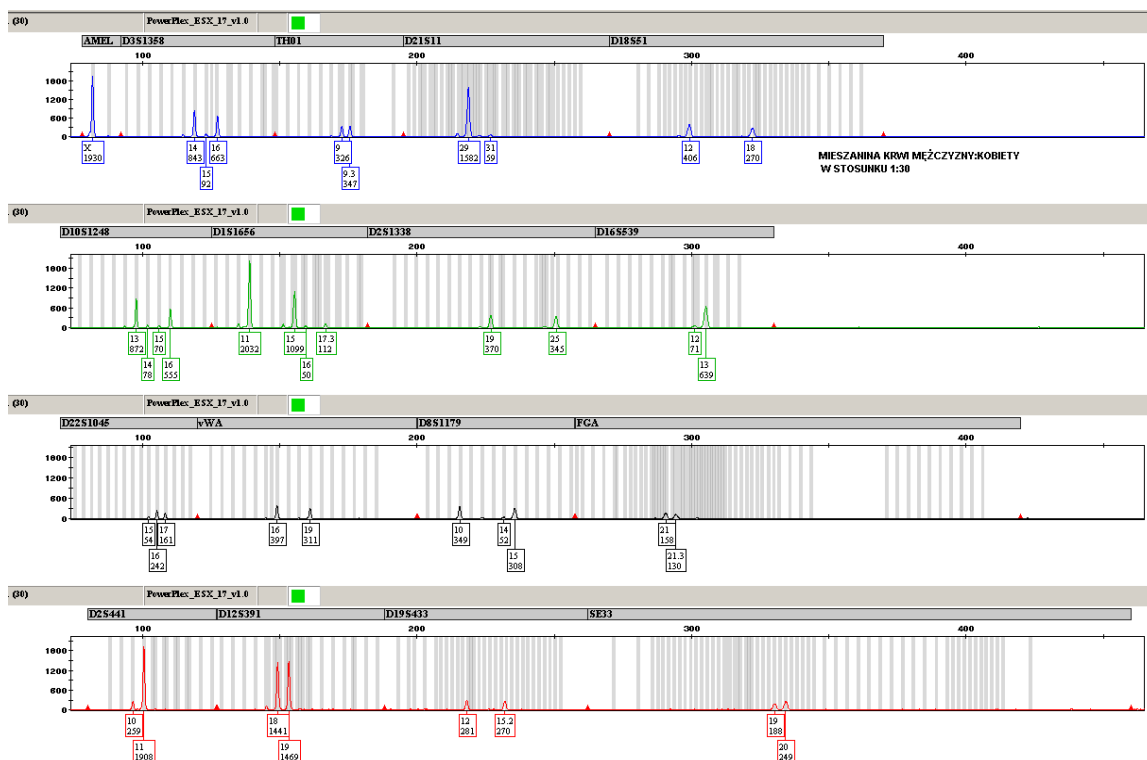
Ryc. nr 4.6. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LighSNiP – rs17315821.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP - rs17315821.

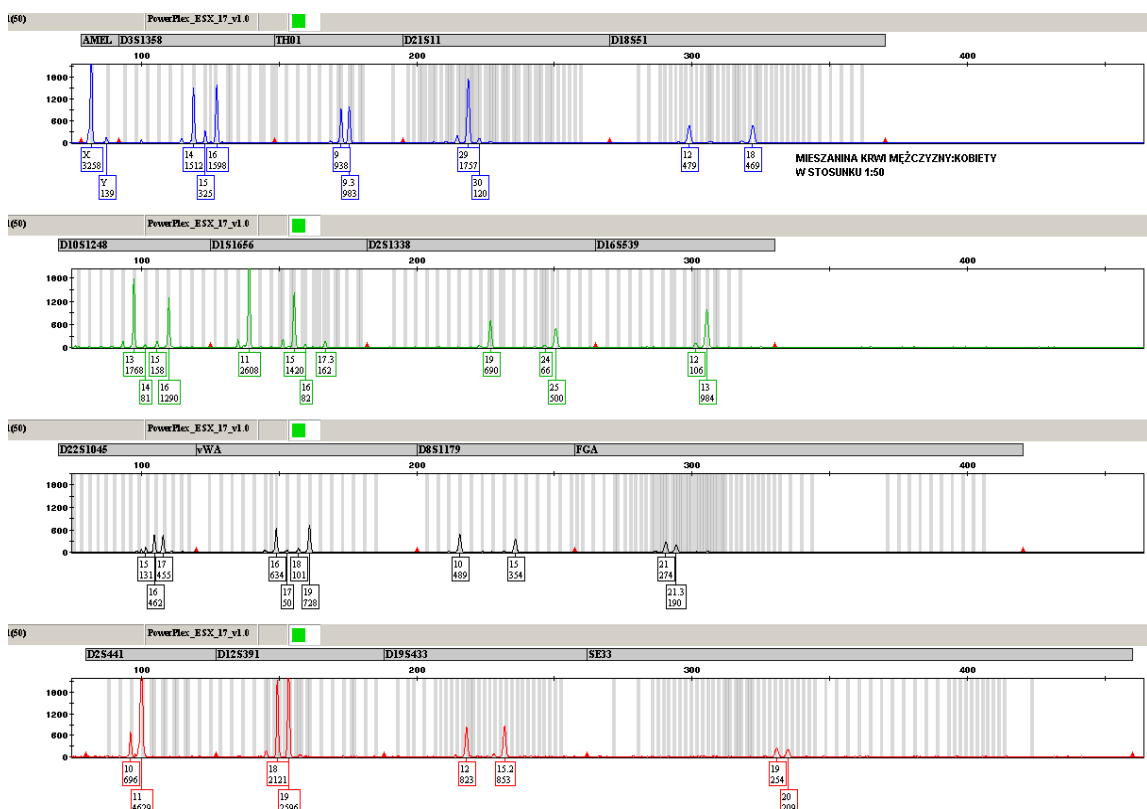


Ryc. nr 4.7. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LighSNiP – rs17306671.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP - rs17306671.

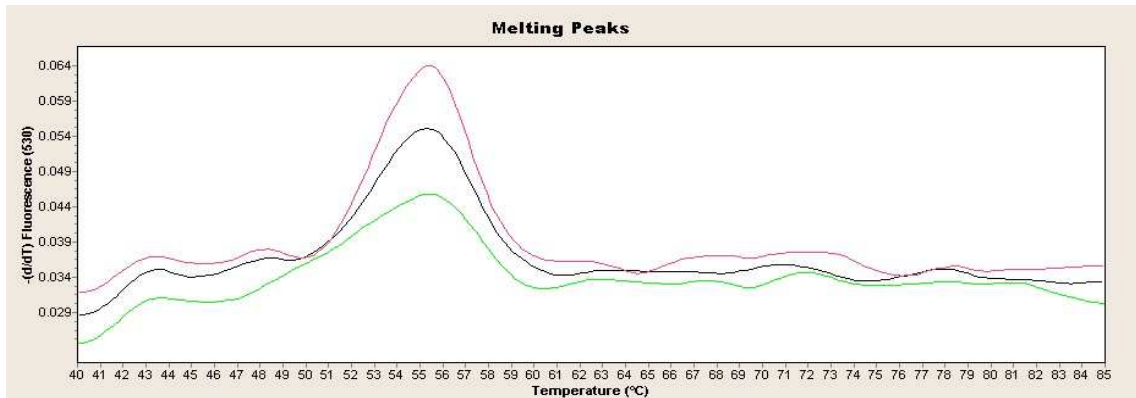


Ryc. nr 4.8. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny – kobiety w stosunku 1:30 zestawem STR-PCR PowerPlex® ESX17. Przygotowana mieszanina materiału genetycznego w postaci krwi. Można zaobserwować w markerze amelogeniny brak allelu Y.

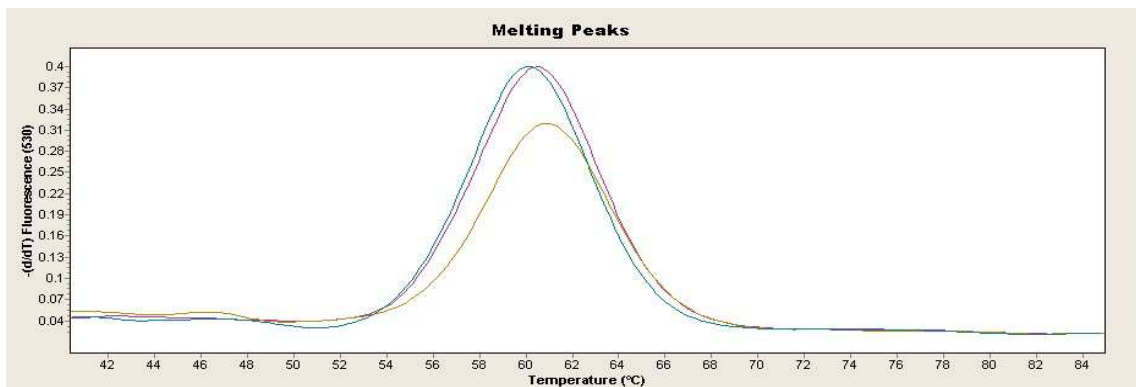


Ryc. nr 4.9. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w stosunku 1:50 przy zastosowaniu zestawu STR-PCR PowerPlex®ESX17. Przygotowana mieszanina materiału genetycznego w postaci krwi.

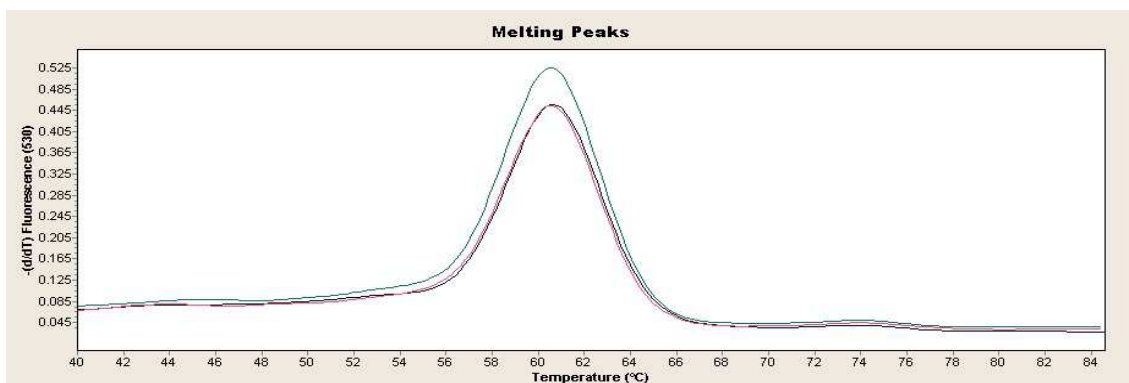
Przeprowadzono badania testem LightSNiP na przygotowanych mieszaninach materiału biologicznego pochodzenia ludzkiego w postaci nasienia oraz krwi. Mieszaniny mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) rozlano na różnym podłożu. W stosunku 1:30 rozlano na bibule Whatmann® 3 mm, w stosunku 1:50 na bibule Whatmann® 2 mm, a w stosunku 1:100 na kompresie z gazy. Do analizy zastosowano Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.



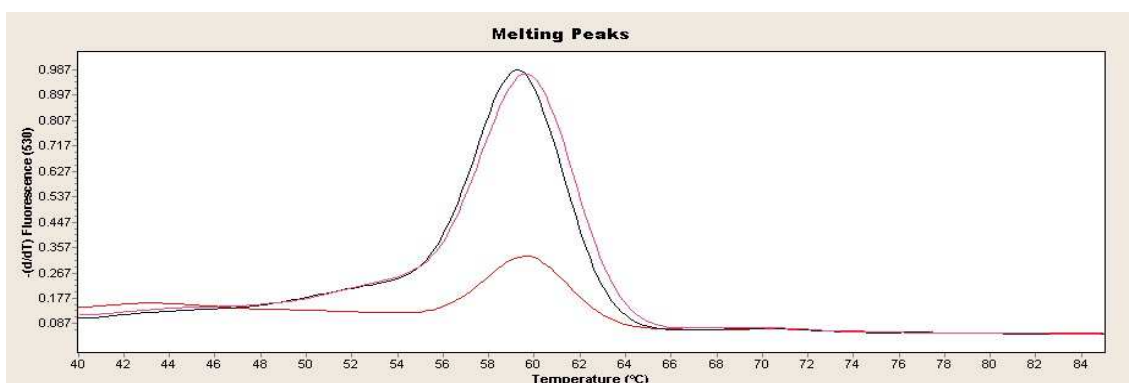
Ryc. nr 4.10. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszaniny DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs34442126.



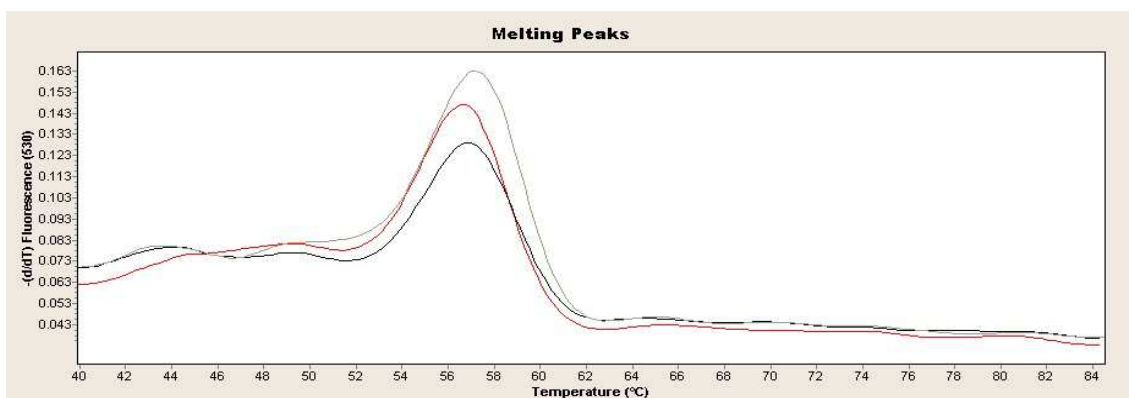
Ryc. nr 4.11. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszaniny DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs11553055.



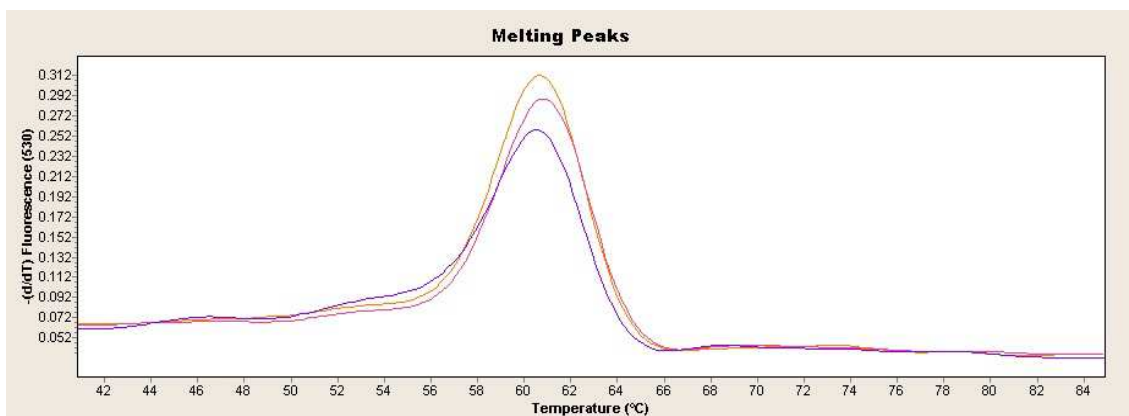
Ryc. nr 4.12. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszanki DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs3900.



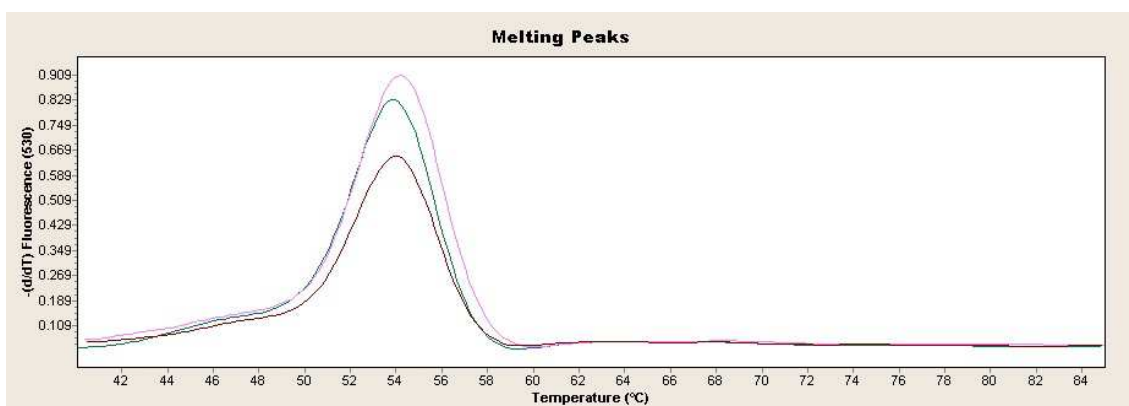
Ryc. nr 4.13. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszanki DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs1722279.



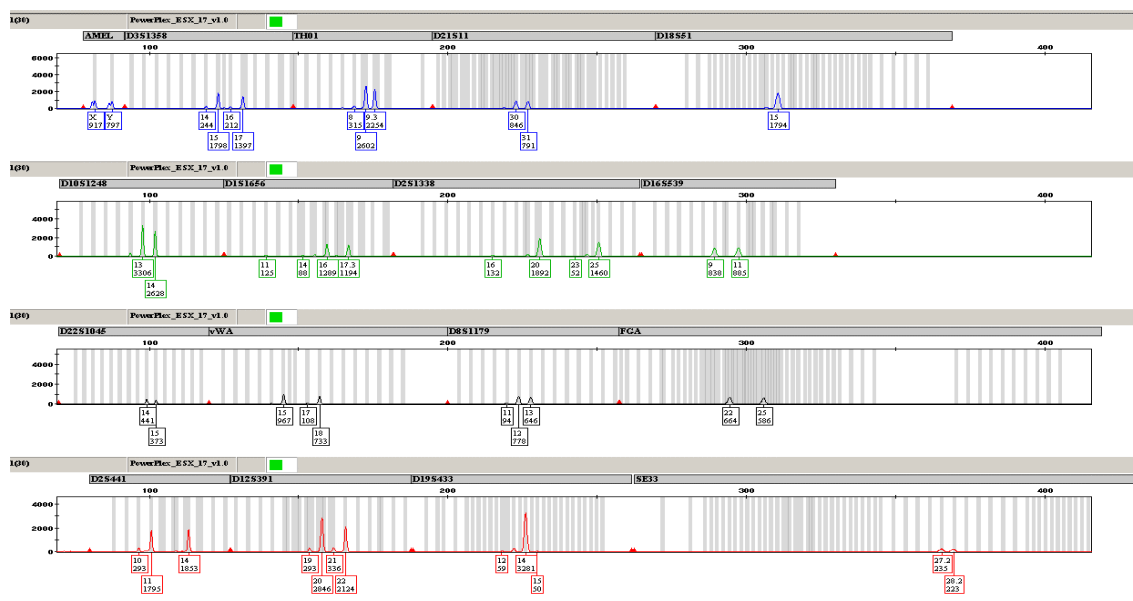
Ryc. nr 4.14. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszanki DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs2032604.



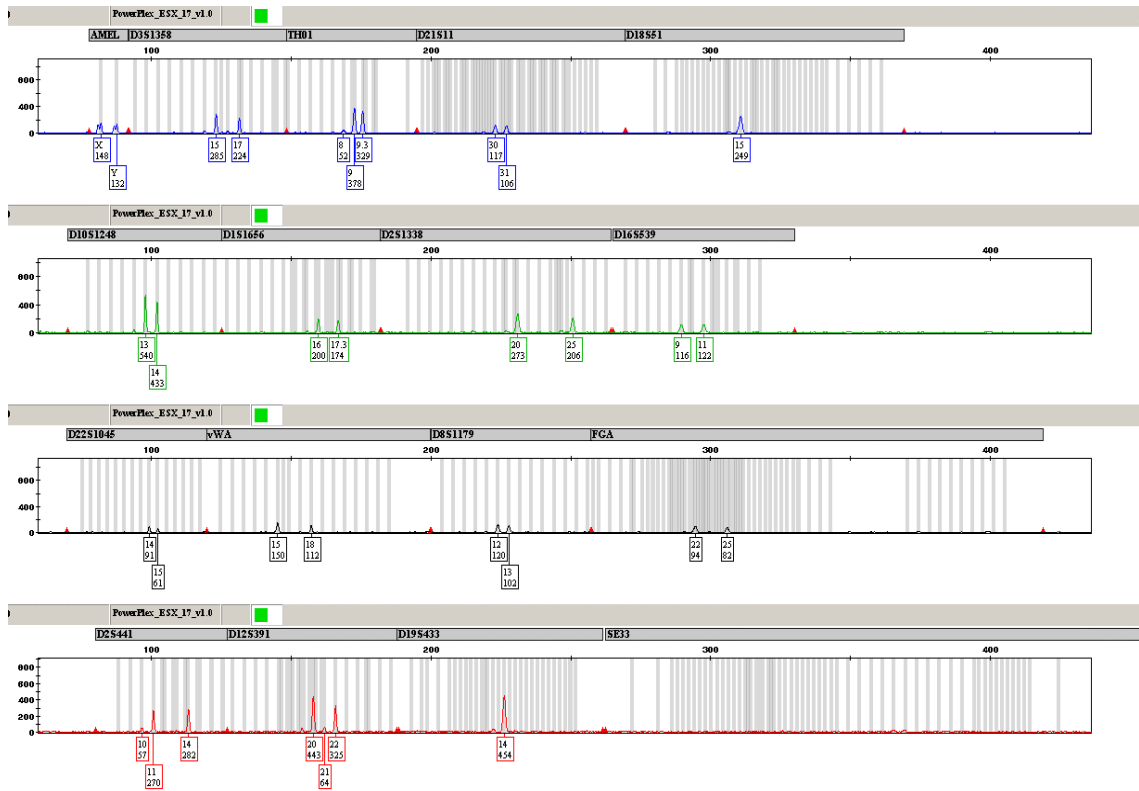
Ryc. nr 4.15. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszanki DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs17315821.



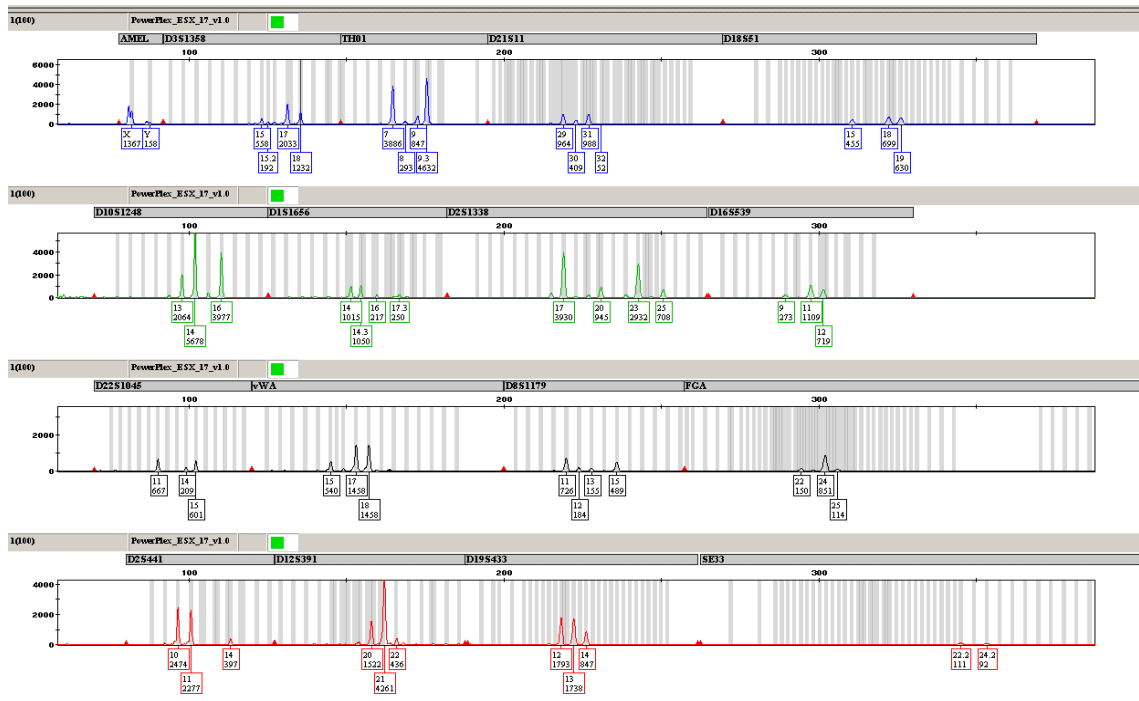
Ryc. nr 4.16. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania przygotowanej mieszanki DNA mężczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:30, 1:50 oraz 1:100, rozlanych odpowiednio na bibule Whatmann® 3mm, na bibule Whatmann® 2mm oraz na kompresie z gazy. Zastosowano LighSNiP – rs17306671.



Ryc. nr 4.17. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszanki DNA z nasienia mężczyzny i krew kobiety w stosunku 1:30. Przygotowana mieszanina rozlano na bibule Whatmann® 3 mm. Zastosowano zestaw STR-PCR PowerPlex®ESX17.

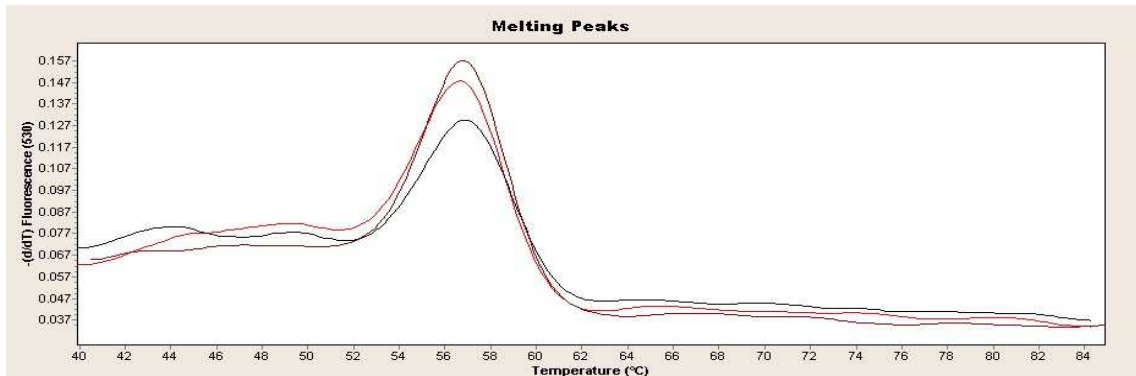


Ryc. nr 4.18. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszaniny DNA z nasienia męzczyzny i krew kobiety w stosunku 1:50. Przygotowana mieszanina rozlano na bibule Whatmann® 2 mm. Zastosowano zestaw STR-PCR PowerPlex®ESX17.



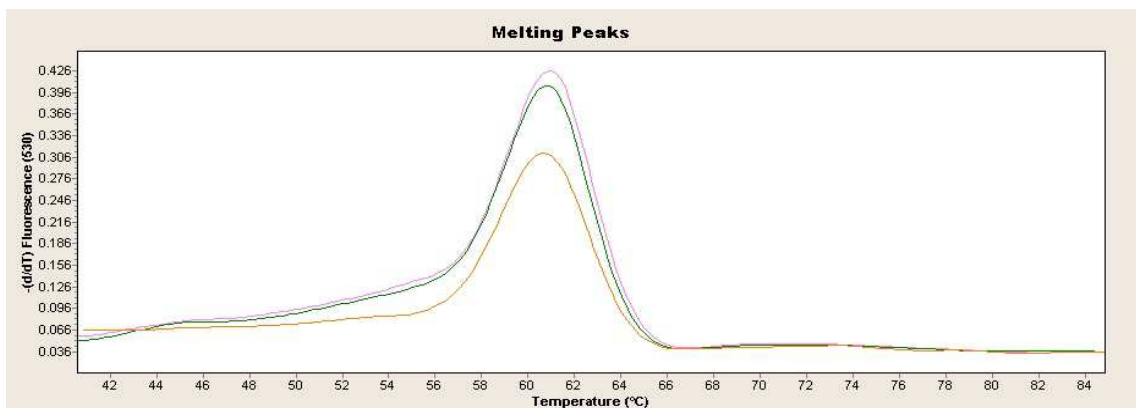
Ryc. nr 4.19. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszaniny DNA męzczyzny (nasienie) i kobiety (krew) w stosunku 1:100. Przygotowana mieszanina rozlano na kompresie z gazy. Zastosowano zestaw STR-PCR PowerPlex®ESX17.

Zbadano testem LightSNiP oraz Y-SNPs: rs2032604, rs17315821 i rs17306671 różne mieszaniny DNA w postaci wyizolowanego DNA mężczyzny o stężeniu 5,6 ng/μl i DNA kobiety o stężeniu 5,3 ng/μl w proporcjach: 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:15000 oraz 1:20000, celem sprawdzenia granicy czułości metody real-time PCR z testem LightSNiP.



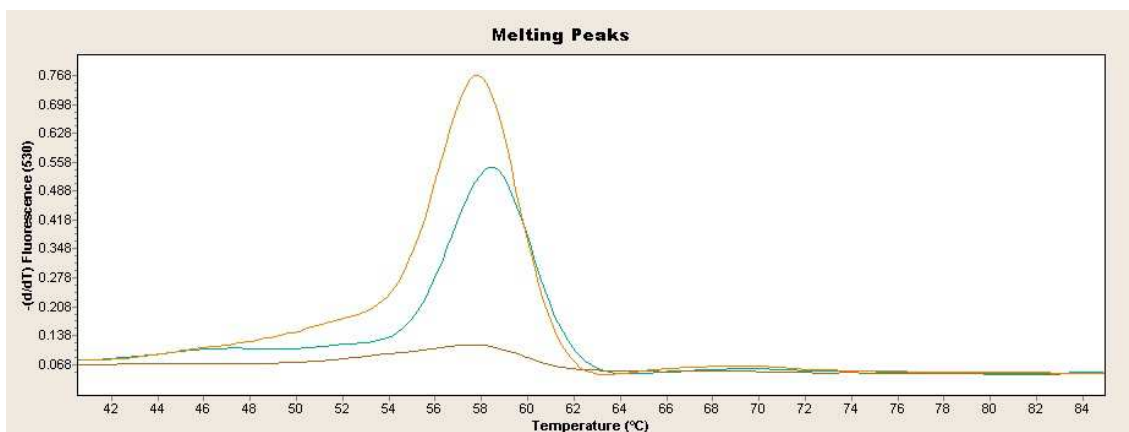
Ryc. nr 4.20. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LightSNiP – rs2032604.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP – rs2032604.



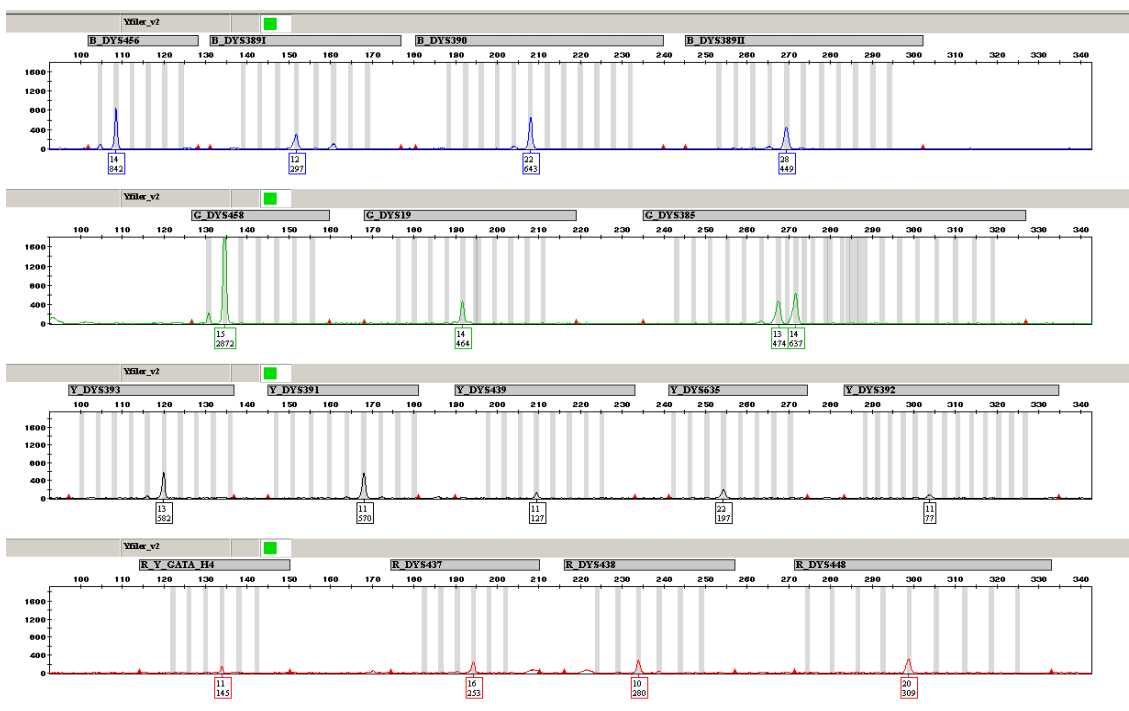
Ryc. nr 4.21. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LightSNiP – rs17315821.

Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP – rs17315821.

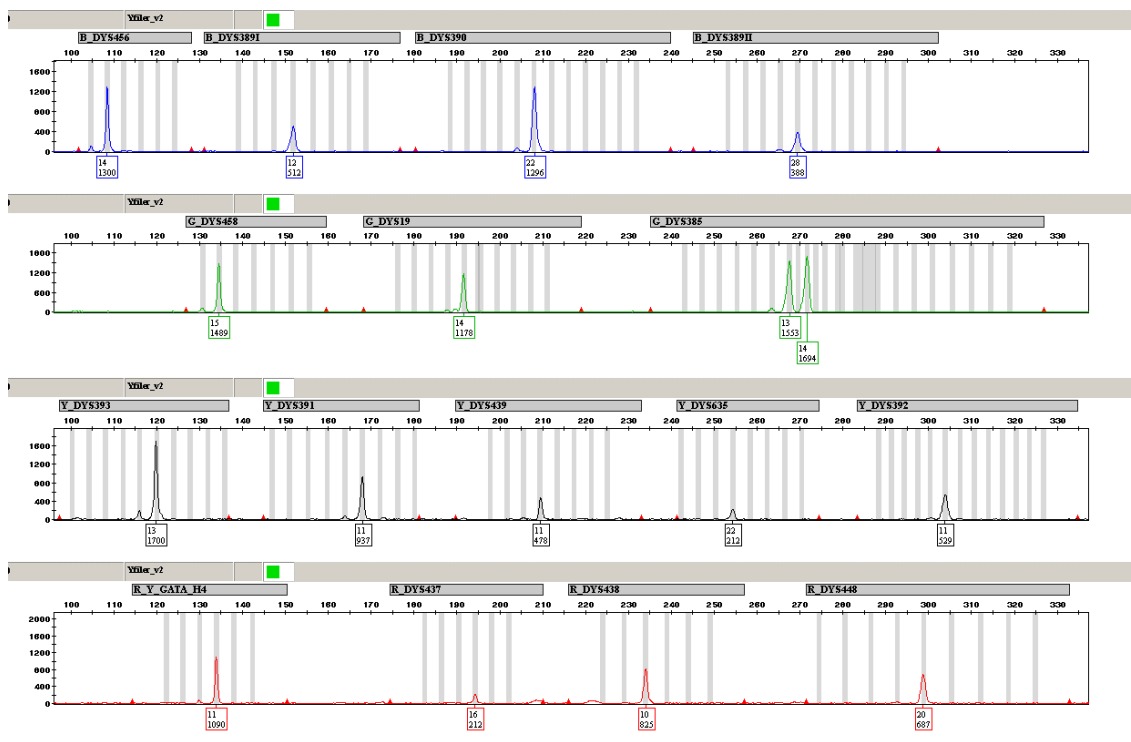


Ryc. nr 4.22. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania mieszaniny wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:100, 1:1000 oraz 1:10000 przy zastosowaniu LighSNiP – rs17306671.

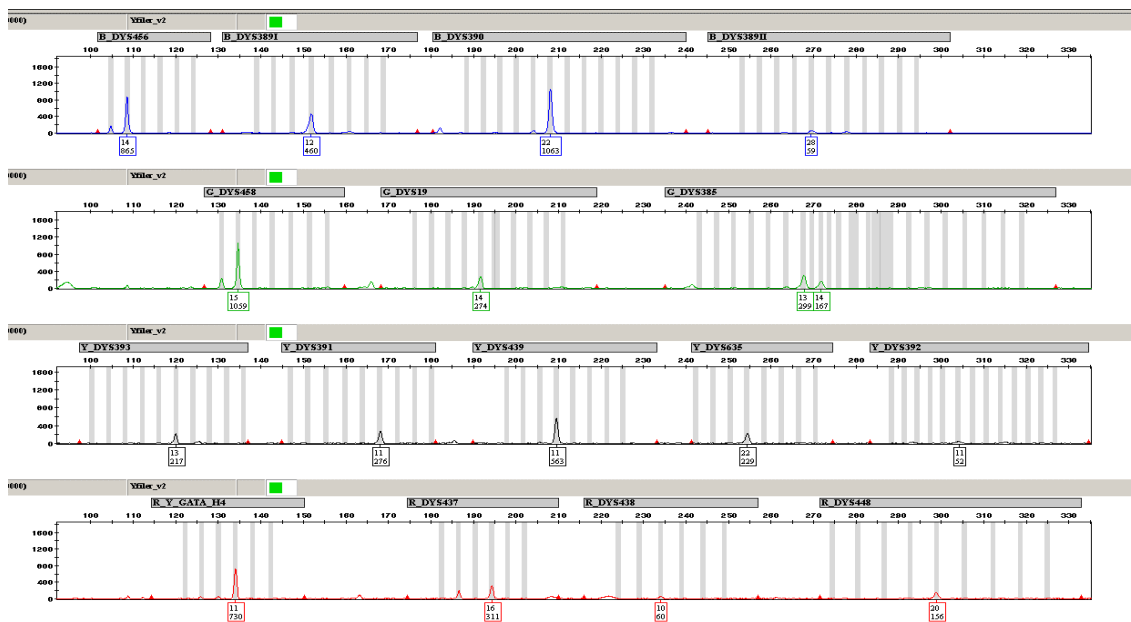
Nie uzyskano wyniku amplifikacji podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcjach 1:15000 oraz 1:20000 testem LightSNiP – rs17306671.



Ryc. nr 4.23. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszaniny wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:30 z zastosowaniem zestawu AmpF ℓ STR®Yfiler.



Ryc. nr 4.24. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszanki wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:50 z zastosowaniem zestawu AmpF ℓ STR ® Yfiler.

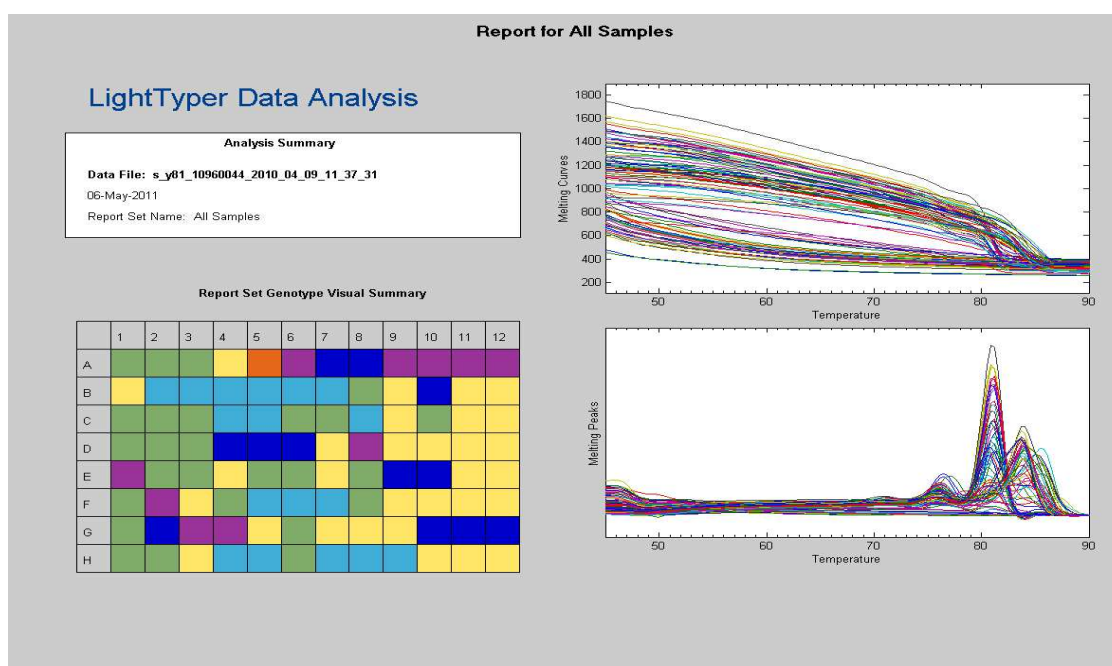


Ryc. nr 4.25. Elektroforegram uzyskany podczas badania mieszanki wyizolowanego od mężczyzny i kobiety DNA w stosunku 1:10000 z zastosowaniem zestawu AmpF ℓ STR ® Yfiler

4.1. Wyniki uzyskane z barwnikiem SYBR-Green I - sY81 oraz testem LightSNiP - rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.

Jednym z celów mojej pracy było porównanie czułości oraz specyficzności dwóch metod. W pierwszych z nich zastosowano barwnik SYBR Green I, w drugiej sondy molekularne.

Celem dobrania optymalnych warunków reakcji PCR do sY81 dokonano amplifikacji przy pomocy MasterCycler Gradient. Interpretację wyników przeprowadzono w LightTyper®, gdzie uzyskano optymalną temperaturę przyłączenia primerów wynoszącą 64°C.



Ryc nr 4.26. Raport wyników uzyskanych po amplifikacji z zastosowaniem LightTyper®, firmy Roche Diagnostics.

Badaniu poddano 108 prób z zastosowaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I. Testem LightSNiP oraz wybranymi Y-SNPs zanalizowano przede wszystkim te próby, w których nie uzyskano produktu amplifikacji barwnikiem SYBR Green I. Wykresy zostały umieszczone w rozdziale **nr 9. Spis wykresów**, str.: 110-126.

Tabela nr 4.1. Temperatury topnienia uzyskane podczas badania 108 prób metodą SYBR Green I - sY81 oraz uzyskane stężenia DNA wszystkich prób. Temperatury topnienia uzyskane z zastosowaniem testu LightSNiP oraz wybranymi Y-SNPs. W próbach, gdzie umieszczono znak (-), nie uzyskano wyniku amplifikacji. Skrót nb. wskazuje na próby, których nie poddano badaniom.

Lp.	Stężenie DNA ng/μl	Tm(°C) sY81 209pz SYBR Green I	Tm(°C) rs34442126 112 pz	Tm(°C) rs11553055 101 pz	Tm(°C) rs3900 91 pz	Tm(°C) rs17222279 77 pz	Tm(°C) rs2032604 61 pz	Tm(°C) rs17315821 60 pz	Tm(°C) rs17306671 52 pz
1	0,6	-	55,85	59,36	58,66	60,47	57,73	60,98	54,32
2	112	80,34	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
3	141,7	80,32	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
4	1,26	-	55,49	60,03	49,69	57,94	56,87	60,96	54,37
5	0,34	-	55,92	60,44	57,31	56,66	57,77	60,82	54,04
6	228,2	80,90	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
7	0,27	-	55,66	60,36	57,95	59,39	57,00	56,07	58,80
8	0,35	-	55,42	60,03	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
9	0,21	-	55,34	60,75	58,70	59,69	57,10	60,92	53,91
10	307,7	80,13	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
11	0,14	-	55,65	59,66	47,92	60,98	57,81	60,86	53,96
12	0,19	-	55,34	60,28	48,69	59,44	56,67	60,97	54,26
13	509	80,06	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
14	0,28	-	55,65	60,38	58,95	59,65	57,10	60,61	54,02
15	0,09*	-	55,48	60,49	48,97	60,33	56,70	60,58	53,98
16	1511	79,31	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
17	351	80,92	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
18	0,11	-	55,08	60,67	58,60	59,82	57,90	60,79	54,03
19	140	81,73	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
20	0,17	-	55,40	60,07	48,57	60,47	56,47	60,82	53,94
21	2025	80,12	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
22	123,4	79,96	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
23	0,09*	-	55,34	60,75	57,96	59,13	57,66	60,70	54,13
24	91,5	79,31	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
25	112,5	80,16	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
26	0,16	-	55,63	60,19	48,49	59,73	57,88	60,78	54,32
27	0,1	-	55,87	59,32	60,56	56,49	56,98	60,50	53,72
28	77,8	80,64	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
29	231,8	80,16	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
30	3180,5	79,21	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
31	1834,5	79,78	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
32	1559,9	78,88	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
33	0,3	-	55,34	59,66	58,72	59,97	57,82	55,86	54,26
34	110,7	80,75	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
35	0,4	-	-	59,54	58,63	59,08	56,49	60,09	53,88
36	1,8	-	55,24	60,55	58,68	59,89	57,30	54,81	57,91
37	0,8	-	55,67	60,74	58,82	59,74	57,61	59,92	53,80
38	1,0	-	55,27	59,72	59,49	60,45	56,89	59,47	54,21
39	0,06*	-	-	-	58,53	59,23	57,88	60,09	53,00
40	0,16	-	55,55	60,41	49,17	57,65	57,45	55,11	54,03
41	192,2	80,16	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
42	701,6	80,26	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
43	146,9	78,79	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
44	484,5	79,98	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.

45	113,6	80,49	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
46	0,14	-	55,04	59,98	57,82	59,02	56,32	55,20	58,45
47	0,11	-	55,31	-	58,24	59,69	56,24	54,87	57,53
48	131,2	80,16	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
49	123,4	79,96	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
50	125,1	80,14	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
51	1,7	-	55,35	-	59,19	59,45	57,61	54,72	57,56
52	0,04*	-	-	-	-	59,12	57,06	54,74	57,86
53	83,7	80,57	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
54	140	79,85	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
55	125,6	79,87	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
56	97,6	80,06	nb.	nb.	59,30	nb.	nb.	nb.	nb.
57	81,7	80,34	-	-	58,24	-	-	59,03	57,79
58	496,7	77,64	-	-	57,79	-	-	59,44	56,95
59	608,4	78,46	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
60	150	79,72	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
61	211,5	80,51	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
62	0,7	-	55,93	60,86	58,01	60,02	57,83	59,42	56,87
63	0,1	-	-	59,18	49,22	59,40	57,78	59,77	56,96
64	323,7	80,82	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
65	986,7	79,39	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
66	0,3	-	-	-	-	60,17	56,67	59,79	53,96
67	99,5	79,43	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
68	0,1	-	-	60,56	58,39	59,68	57,19	54,89	57,31
69	222,1	81,18	-	-	58,06	nb.	nb.	nb.	nb.
70	97,1	80,07	nb.	nb.	58,80	nb.	nb.	nb.	nb.
71	0,5	-	-	59,68	58,41	59,96	56,76	59,55	55,09
72	234,1	79,05	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
73	1,2	-	55,78	60,59	58,68	59,68	56,52	60,43	54,25
74	0,05*	-	-	-	-	59,05	57,69	62,32	54,56
75	1548,1	80,74	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
76	90,6	80,97	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
77	1364,8	79,41	nb.	nb.	49,72	nb.	nb.	nb.	nb.
78	156,7	79,72	nb.	nb.	59,28	nb.	nb.	nb.	nb.
79	232,1	80,32	nb.	nb.	58,39	nb.	nb.	nb.	nb.
80	721,6	80,74	nb.	nb.	59,38	nb.	nb.	nb.	nb.
81	0,08*	-	-	60,15	58,38	59,72	56,70	62,19	57,64
82	0,02*	-	-	-	58,96	59,04	56,80	62,20	61,32
83	0,05*	-	-	-	59,39	-	57,17	61,84	61,57
84	129	81,52	nb.	nb.	58,16	nb.	nb.	nb.	nb.
85	0,6	-	-	-	-	59,72	57,07	60,84	57,69
86	0,3	-	55,12	60,34	58,23	59,76	57,05	60,87	57,29
87	218,9	81,39	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
88	84,4	81,29	nb.	nb.	58,15	nb.	nb.	nb.	nb.
89	0,6	-	-	-	58,01	-	-	62,70	57,13
90	819,7	78,23	-	-	47,42	-	-	62,78	57,50
91	106,7	79,41	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
92	5,3	-	-	-	59,63	-	56,72	57,79	57,20
93	0,9	-	55,65	-	58,85	-	57,34	57,92	57,80
94	0,3	-	-	-	58,24	-	57,97	57,80	57,99
95	809,4	79,43	-	-	58,62	-	-	61,55	55,75
96	0,6	-	-	-	57,88	-	56,26	56,47	59,40
97	157,7	81,57	nb.	nb.	59,70	nb.	nb.	nb.	nb.
98	85,3	81,79	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
99	124,4	81,53	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.

100	563,5	80,11	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
101	766,1	79,95	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
102	0,4	-	-	-	58,84	-	-	61,57	55,36
103	0,2	-	55,15	-	58,53	-	-	61,67	55,53
104	122,7	79,88	nb.	-	59,70	-	-	61,54	55,88
105	0,8	-	-	-	58,86	60,38	55,90	61,58	55,36
106	309	77,89	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
107	0,07*	-	-	-	47,78	60,45	56,76	56,53	55,55
108	0,04*	-	-	-	58,68	59,65	56,24	61,81	59,44

*Próby rozcieńczone 100 razy celem uzyskania stężenie DNA poniżej 0,1 ng/μl.

Tab. nr 4.2. Przedstawia uzyskane temperatury topnienia podczas analizy zastosowanych Y-SNPs oraz odpowiednia do niej zmianę nukleotydową - genotyp.

Y-SNPs	Temperatury topnienia °C	Uzyskany genotyp
rs34442126	~55,48	T/T
rs11553055	~60,16	G/G
rs3900	~48,69	C/C
	~58,67	G/G
rs17222279	~57,18	A/A
	~59,75	G/G
rs2032604	~57,10	T/T
rs17315821	~55,40	C/C
	~60,64	T/T
rs17306671	~54,40	T/T
	~58,08	A/A

4.2. Analiza śladów biologicznych metodą LightSNiP.

Do badań testem LightSNiP oraz Y-SNPs rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671 wykorzystano próby ze spraw dotyczących przemocy seksualnej opracowanych w ZMS w Poznaniu, w których uzyskano trudną do interpretacji mieszaninę DNA mężczyzny i kobiety. Sprawy zostały opisane w rozdziale **3.1 - Materiał**.

Każdą sprawę przedstawiono w oddzielnej tabeli, a poszczególne wykresy zamieszczono w rozdziale **nr 9. Spis wykresów** – str.: 126-146. Skróty umieszczone w tabelach oznaczają: B.A- brak amplifikacji, N.B- nie badano i W.M.- wyczerpanie materiału.

SPRAWA Nr 1	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment majtek)	B.A.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (fragment majtek)	B.A.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
C (fragment majtek)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
Test Hemophan – wynik pozytywny (w próbach A i B) Test PSA – wynik negatywny (w próbach A i B)							

SPRAWA Nr 2	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
C (materiał porównawczy)	genotyp G/G	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
Test Hemophan – wynik negatywny (w próbach A i B) Test PSA – wynik pozytywny (w próbach A i B)							

SPRAWA Nr 3	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	genotyp T/T	genotyp G/G	genotypy C/C G/G	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z odbytu)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
C (materiał porównawczy)	B.A.	genotyp G/G	genotyp C/C	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 4	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	B.A.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	B.A.	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
C (wymaz z pochwy)	B.A.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	B.A.	genotyp T/T
D (materiał porównawczy)	genotyp T/T	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp A/A

SPRAWA Nr 5	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment majtek)	B.A.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp C/C	B.A.
B (fragment majtek)	B.A.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	B.A.	B.A.
C (materiał porównawczy)	B.A.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp C/C	genotyp A/A
Test Hemophan – wynik negatywny (w próbach A i B) Test PSA – negatywny (w próbach A i B)							

SPRAWA Nr 6	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A(wymaz pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.
C (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 7	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
Wymaz z pochwy	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 8	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	W.M.	W.M.	W.M.	W.M.	W.M.
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	W.M.	W.M.	W.M.	W.M.	W.M.

SPRAWA Nr 9	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z przedsonka pochwy)	N.B.	B.A.	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
B (wymaz z pochwy)	N.B.	B.A.	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
C (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	genotyp C/C	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
D (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	genotypy C/C G/G	N.B.	N.B.	genotyp y C/C T/T	genotyp A/A
E (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	Genotyp C/C	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A

SPRAWA Nr 10	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.

C (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.
D (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.

SPRAWA Nr 11	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315851	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
B (wymaz z pochwy)	N.B.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A

SPRAWA Nr 12	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment stanika)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (fragment stanika)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
Test Hemophan – wynik pozytywny (w próbach A i B) Test RSiD-Semen – wynik negatywny (w próbach A i B)							

SPRAWA Nr 13	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
Wymaz z pochwy	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
Test RSiD-Semen – wynik negatywny							

SPRAWA Nr 14	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment majtek)	N.B.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp A/A
B (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp A/A

C (fragment spodni)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp A/A
Test Hemophan – wynik pozytywny (w próbach A, B i C)							

SPRAWA Nr 15	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (fragment majtek)	N.B.	B.A.	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
C (fragment spodni)	N.B.	B.A.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
Test Hemophan – wynik pozytywny (w próbie C), negatywny (w próbach A i B) Test RSiD-Semen – wynik negatywny (w próbach A, B i C)							

SPRAWA Nr 16	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
Wymaz z pochwy	N.B.	N.B.	B.A.	N.B.	N.B.	B.A.	genotyp T/T

SPRAWA Nr 17	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	W.M.	W.M.	W.M.	W.M	W.M
B (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
C (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A

SPRAWA Nr 18	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

B (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
C (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
D (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
E (końcówki paznokci)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
F (końcówki paznokci)	N.B.	N.B.	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
G (materiał porównawczy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 19	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T
C (wymaz z pochwy)	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 20	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
Wymaz z pochwy	N.B.	N.B.	genotyp G/G	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 21	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	genotyp G/G	W.M.	W.M.	W.M.
B (fragment majtek)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	genotyp G/G	W.M.	W.M.	W.M.
Test PSA- wynik pozytywny (w próbach A i B)							

SPRAWA Nr 22	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T

SPRAWA Nr 23	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z odbytu)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	N.B.	genotyp C/C	genotyp A/A

SPRAWA Nr 24	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
A (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	B.A.	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
B (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
C (wymaz z pochwy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
D (wyskrobiny spod paznokci)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	B.A.	genotyp T/T	genotyp T/T
E (materiał porównawczy)	N.B.	genotyp G/G	genotyp G/G	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T	genotyp T/T
Test RSiD – semen- wynik negatywny (w próbach A, B i C)							

SPRAWA Nr 25	rs34442126	rs11553055	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
Wymaz z pochwy	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	N.B.	genotyp T/T	genotyp T/T

4.3. Analiza zdegradowanego DNA metodą LightSNiP.

Badaniom poddano 52 próby pochodzące od NN mężczyzn. Materiał genetyczny wyizolowano z fragmentów kostnych, skóry z włosami, krwi w zaawansowanym stopniu hemolizy oraz fragmentów tkanki mięśniowej. Pobrano również do badań rzepkę kolanową oraz skórę z włosami mumii znajdującej się od 1930r. w muzeum Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Poznaniu.

W badanych próbach nie uzyskano produktu amplifikacji i tym samym profilu genetycznego metodą STR- PCR prawdopodobnie ze względu na wysoki poziom degradacji materiału pobranego ze zwłok (daleko posunięte procesy gnilne) w trakcie sekcji zwłok w ZMS w Poznaniu.

Do analizy zastosowano Y-SNPs: rs3900, rs11553055, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671. Wykresy powyższych badań przedstawiono w rozdziale **nr 9. Spis wykresów**. Str.: 146-150.

Tabela nr 4.3. Temperatury topnienia oraz stężenia DNA uzyskane podczas analizy 6 prób pochodzących od NN mężczyzn testem LightSNiP – rs11553055.

Próby – materiał do badań	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs11553055 °C	Stężenie DNA ng/μl
1 (fragment kości ramiennej)	60,00	4,6
2 (fragment kości udowej)	60,01	11,7
3 (fragment kości ramiennej)	59,82	3,2
4 (4 zęby)	59,96	7,9
5 (krew)	59,85	31,7
6 (fragment skóry z włosami)	Brak produktu amplifikacji	1,6

Tabela nr 4.4. Temperatury topnienia oraz stężenia DNA uzyskane podczas analizy 6 prób pochodzących od NN mężczyzn testem LightSNiP-rs2032604.

Próby – materiał do badań	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs2032604 °C	Stężenie DNA ng/μl
6 (fragment skóry z włosami)	Brak produktu amplifikacji	1,6
7 (fragment mięśnia)	58,35	5,9
8 (fragment kości ramiennej)	58,25	4,4
9 (krew)	59,07	9,2
10 (włosy)	58,45	5,4
11 (fragment kości udowej)	58,76	24,9

Tabela nr 4.5. Temperatury topnienia oraz stężenia DNA uzyskane podczas analizy zmumifikowanych włók znajdujących się w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UM w Poznaniu. Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu testu LightSNiP oraz rs17222279 i rs2032604.

Zmumifikowane włoki	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs17222279 °C	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs2032604 °C	Stężenie DNA ng/μl
12 (fragment rzepki kolanowej)	59, 17	58, 34	5,9
13 (fragment skóry z włosami)	Brak produktu amplifikacji	Brak produktu amplifikacji	0,7

Tabela nr 4.6. Temperatury topnienia oraz stężenia DNA uzyskane podczas analizy 39 prób pochodzących od NN mężczyzn testem LightSNiP – rs17315821 oraz rs17306671.

Próby – materiał do badań	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs17315821 °C	Tm uzyskana podczas badania metodą LightSNiP – rs17306671 °C	Stężenie DNA ng/μl
14 (krew)	62,67	61,30	0,9
15 (fragment kości ramiennej)	62,75	61,52	3,2
16 (fragment kości śródstopia)	57,81	56,73	0,6
17 (krew)	57,90	55,76	23,8
18 (krew)	57,78	55,42	12,5
19 (fragment skóry z włosami)	Brak amplifikacji	Brak amplifikacji	0,4
20 (fragment mięśnia)	61,52	55,61	6,8
21 (fragment mięśnia)	61,58	55,55	9,7
22 (fragment rzepki kolanowej)	61,63	55,82	0,6

23 (włosy)	61,51	55,46	8,7
24 (krew)	61,49	55,57	2,4
25 (ząb)	61,76	55,75	0,4
26 (fragment skóry z włosami)	Brak amplifikacji	Brak amplifikacji	0,1
27 (włosy)	61,53	55,72	4,6
28 (fragment kości śródstopia)	56,45	55,62	0,9
29 (fragment mięśnia ze spalonych zwłok)	61,54	55,79	0,3
30 (krew)	Brak amplifikacji	Brak amplifikacji	0,8
31 (krew)	61,57	55,75	76,4
32 (fragment wyrostka sutkowatego potylicznego)	56,50	55,36	0,5
33 (krew)	61,62	55,60	45,3
34 (krew)	56,60	53,98	12,2
35 (fragment mięśnia)	60,76	53,94	10,5
36 (fragment kości udowej)	60,61	53,97	0,3
37 (fragment mięśnia)	60,72	54,00	2,6
38 (krew)	60,65	53,91	5,9
39 (2 zęby)	60,70	54,22	1,1
40 (fragment wyrostka sutkowatego potylicznego)	60,82	54,05	0,8
41 (fragment kości udowej)	60,97	54,35	4,2
42 (krew)	60,96	54,36	32,4
43 (3 zęby)	60,79	54,07	0,7
44 (fragment skóry z włosami)	Brak amplifikacji	Brak amplifikacji	1,2
45 (włosy)	60,78	53,82	6,3
46 (krew)	60,50	53,75	18,6
47 (fragment rzepki kolanowej)	60,54	53,80	0,7
48 (krew)	60,76	54,02	19,7
49 (krew)	60,77	53,92	12,5
50 (włosy)	60,72	58,45	34,0
51 (fragment mięśnia ze spalonych zwłok)	Brak amplifikacji	Brak amplifikacji	3,5
52 (2 zęby)	61,50	58,42	0,5

4.4. Genotypy uzyskane oraz obliczenia statystyczne.

Jednym z celów prezentowanej pracy było utworzenie bazy populacyjnej w zakresie 6 badanych loci Y-SNPs w województwie wielkopolskim. W tym celu zgenotypowano 108 mężczyzn. Analizie poddano genotypy uzyskane podczas badania

prób przedstawionych w tabeli 4.1, to jest 23 kompletne profile – w 6 badanych loci SNPs (rozdział 4.1) oraz dodatkowo poddano reakcji amplifikacji testem LightSNiP i wybranymi Y-SNPs 85 prób. Przeprowadzono analizę biostatystyczną wszystkich 6 opracowywanych Y-SNPs, usytuowanych w regionie niekodującym białko, traktując je jako zestaw.

Tabela nr 4.8. Haplotypy uzyskane podczas badania zastosowanych Y-SNPs w populacji wielkopolskiej. Ht – ilość uzyskanych haplotypów, n – ilość badanych mężczyzn.

Ht	n	częstość	rs34442126	rs3900	rs17222279	rs2032604	rs17315821	rs17306671
1	41	0,379	T	G	G	T	T	T
2	4	0,037	T	C	G	T	C	A
3	12	0,111	T	G	G	T	C	A
4	1	0,009	T	C	A	T	T	T
5	1	0,009	T	G	A	T	T	T
6	9	0,083	T	G	G	T	T	A
7	2	0,018	T	C	G	T	T	A
8	8	0,074	T	C	G	T	T	T
9	12	0,111	T	G	G	T	C	T
10	10	0,092	T	G	A	T	T	A
11	1	0,009	T	C	A	T	C	T
12	3	0,027	T	C	G	T	C	T
13	1	0,009	T	C	G	T	C	A
14	1	0,009	T	G	A	T	C	A
15	1	0,009	T	C	A	T	C	A
16	1	0,009	T	C	A	T	C	T
DC=0,1500								
HD=0,8200								

Tabela nr 4.9. Polimorfizm, częstość występowania danego allelu w poszczególnych Y-SNPs oraz GD (wskaźnik różnicowania haplotypowego lub allelicznego). Średnia wartość GD obliczona została bez GD rs34442126 i rs2032604.

Y-SNPs	polimorfizm		Częstość		$GD = 1 - \sum p_i^2$	Średnia wartość GD
rs34442126	C	T	0,000	1,000	0,0000	38,5%
rs3900	C	G	0,204	0,796	0,3248	
rs17222279	A	G	0,150	0,850	0,2550	
rs2032604	G	T	0,000	1,000	0,0000	
rs17315821	C	T	0,450	0,550	0,4950	
rs17306671	A	T	0,370	0,630	0,4662	

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Obecnie w genetyce sądowej badania śladów biologicznych są przeprowadzane przy pomocy markerów STR poprzez elektroforezę kapilarną w analizatorach genetycznych. Markery te pozwalają na analizę fragmentów DNA w zakresie od 100 pz do 500 pz, co może ograniczyć interpretację wyników lub uzyskanie profilu genetycznego badanych śladów. Spotykamy się z taką sytuacją wtedy, kiedy do opracowywania mamy materiał o wysokim stopniu degradacji oraz trudne do analizy mieszaniny DNA.

W sprawach dotyczących przemocy seksualnej, w większości przypadków, ilość DNA kobiety jest dużo większa od ilości DNA podejrzanego w sprawie mężczyzny. Analiza śladów do sprawy o gwałt z zastosowaniem markerów STR w regionie autosomalnym wskazuje na niekompletną, trudną do interpretacji mieszaninę DNA dwóch osób, w której nawet marker amelogeniny prezentuje profil kobiety - X,X (ryc. nr 4.8.). Mając do analizy materiał porównawczy sprawcy lub sprawców, istnieje duże prawdopodobieństwo dokonania kompletnej interpretacji uzyskanych mieszanin DNA kobiety i mężczyzny, natomiast w sytuacji braku powyższych materiałów porównawczych napotykamy na trudności w analizie wyników [115].

Badania SNPs w zakresie poniżej 150 pz umożliwiają uzyskanie profilu genetycznego ze zdegradowanego materiału genetycznego [43] oraz w analizie mieszanin DNA mężczyzny i kobiety. Wybór SNPs, w tym przypadku na chromosomie Y, może dostarczyć brakujących informacji genetycznych niezbędnych do analizy takich mieszanin DNA. Ilość zastosowanych markerów SNPs o wysokim polimorfizmie pozwoli na rozwiązanie problemu identyfikacyjnego [30, 179]. Długość amplikonu markerów SNPs ma istotne znaczenie w przypadku analizy zdegradowanego DNA. Przyjmuje się, że odcinek DNA, owinięty wokół nukleosomu o długości mniejszej niż 150 pz, jest mniej podatny na degradację w wyniku tworzenia wiązań kowalencyjnych z histonami (w ten sposób stworzy się ochrona przed działaniem nukleaz) [8, 43].

Analiza SNPs znalazła ogromne zastosowanie w diagnostyce medycznej chorób genetycznych [60]. Przyszłość w genetyce sądowej ściśle związana jest z analizą SNPs ze względu na możliwość badania krótkich fragmentów DNA. Podczas badań należy wziąć jednak pod uwagę charakterystyczny dla markerów SNPs niski polimorfizm. Aby uzyskać siłę dyskryminacji na poziomie 12 loci STR z bazy CODIS, należy do badań

użyć co najmniej 40 markerów SNPs [30], co wiąże się z trudnościami projektowania eksperymentu oraz wysokimi kosztami analizy.

Istnieją różne metody analizy SNPs, w zależności od projektu badań oraz poziomu automatyzacji laboratorium. W tej pracy wykorzystano technikę real-time PCR z zastosowaniem barwnika SYBR Green I - sY81 oraz testu LightSNiP zawierającego sondy molekularne działające na bazie procesu FRET [23, 41]. Wielkość fragmentów Y-SNPs zastosowanych w tej pracy znajduje się między 112 pz a 52 pz, co umożliwiło uzyskanie produktów amplifikacji ze zdegradowanego materiału oraz w dużym stopniu rozwiązało problem interpretacji mieszanin DNA, w których dominuje materiał genetyczny kobiety w stosunku do materiału genetycznego mężczyzny.

Przydatność testu LightSNiP nie została wcześniej sprawdzona pod kątem badań śladów biologicznych w genetyce sądowej i to skłoniło nas do podjęcia działań w tym kierunku.

Ważnym aspektem w genetyce sądowej, jest stężenie DNA dodanego do reakcji PCR. Wiadomo, że ilość otrzymanego materiału genetycznego po izolacji DNA ze śladów biologicznych przekazanych do badań jest bardzo mała, a dodatkowo należy wziąć pod uwagę ewentualne działanie inhibitorów reakcji PCR [66, 228]. Te wszystkie czynniki skłaniają nas do udoskonalania oraz wprowadzania coraz czulszych oraz bardziej specyficznych metod, biorąc pod uwagę reguły walidacji metod w genetyce sądowej opracowywane przez SWGDAM - Naukową Grupę Roboczą do Metod Analizy DNA (ang. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) [26, 28, 44, 233].

Innym napotykanym problemem przy opracowywaniu śladów biologicznych w sprawach o przemoc seksualnej jest etap wstępnych badań identyfikacyjnych obecności nasienia. Metody zastosowane w tym celu nie zawsze dają jednoznaczny wynik, a mała ilość materiału biologicznego do badań nakazuje ominięcie tego etapu badań aby pozyskać jak największej ilości materiału do analizy.

W dostarczonym przez firmę TIB® Molbiol protokole badań [160-166], wprowadzono drobne zmiany w teście LightSNiP celem otrzymania jak największej ilości produktów amplifikacji z materiału genetycznego opracowywanego w naszym laboratorium.

Stężenia polimerazy i $MgCl_2$ pozostawiono bez zmian. Zredukowano o połowę objętość mieszaniny reakcyjnej dodając do każdej reakcji 7,5 μl oraz 2,5 μl DNA oraz w etapie amplifikacji zwiększono ilość cykli do 50.

Przygotowano różne rozcieńczenia zawierające materiał genetyczny mężczyzny i kobiety w postaci krwi w celu sprawdzenia testu LightSNiP z wybranymi Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671. Uzyskano produkt amplifikacji w przygotowanych mieszaninach DNA w postaci krwi mężczyzny i kobiety w stosunku 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100, 1:1000 i 1:10000 z zastosowaniem najmniejszych co do wielkości Y-SNPs - rs17222279 (77 pz), rs2032604 (61 pz), rs17315821 (60 pz) i rs17306671 (52 pz) (ryc. nr 4.4. – 4.7.), natomiast przy użyciu Y-SNPs: rs34442126, rs3900 oraz rs11553055 uzyskano produkt amplifikacji w powyższych mieszaninach DNA mężczyzny i kobiety tylko w proporcjach 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 oraz 1:50 (ryc. nr 4.1. – 4.3.). Wybór Y-SNPs o wielkości poniżej 80 par zasad umożliwia przy zastosowaniu metody real-time PCR detekcję DNA pochodzenia męskiego w mieszaninie, gdzie ilość DNA kobiety jest o 10000 razy większa od ilości DNA mężczyzny.

Dodatkowo poddano badaniom techniką STR-PCR oraz zestawem PowerPlex®ESX17 powyższe próby o rozcieńczeniu 1:30 i 1:50 (ryc. nr 4.8 – 4.9.), w których uzyskano mieszaninę DNA mężczyzny i kobiety. Takie elektroforegramy są trudnym zadaniem do analizy w sprawach dotyczących przemocy seksualnej, w których można zaobserwować brak allelu Y w markerze amelogeniny oraz dodatkowe allele w pojedynczych markerach. Analiza markerów STR na chromosomie Y w powyższym przypadku daje wynik negatywny, ponieważ w próbce stężenie męskiego DNA jest niskie.

W tym samym celu przygotowano mieszaniny DNA w postaci nasienia męskiego i krwi kobiety w trzech rozcieńczeniach: 1:30, 1:50 i 1:100, rozlanych na różnym podłożu. Przeprowadzono analizę testem LightSNiP oraz Y-SNPs: rs34442126, rs11553055, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671. Uzyskano produkt amplifikacji we wszystkich badanych próbach (ryc. nr 4.10. – 4.16.). Analiza uzyskanych elektroforegramów podczas badania powyższych mieszanin metodą STR-PCR wskazuje na mieszaninę DNA dwóch osób (ryc. nr 4.17. – 4.18). W markerze amelogeniny można zaobserwować obecność allelu Y we wszystkich badanych

mieszaninach. Podłoże, na którym zostały rozlane przygotowane mieszaniny, nie utrudniło etapu oceny wyników.

Otrzymano wynik amplifikacji w przygotowanych mieszaninach mężczyzny i kobiety w postaci wyizolowanego DNA w proporcjach 1:100, 1:1000 i 1:10000 testem LightSNiP oraz rs2032604, rs17315821 i rs17306671 (ryc. nr 4.19. – 4.21.), natomiast nie uzyskano produktu amplifikacji podczas analizy powyżej przygotowanych mieszanin w proporcjach 1:5000 i 1:20000, co potwierdza wcześniej badaną granicę czułości tej metody – mieszanina DNA ♂1:10000♀.

Obecnie na rynku istnieją różne metody, które można zastosować do wykrycia obecności męskiego DNA w badanej próbce. Zestaw Quantifiler™ Y Human Male DNA firmy Applied Biosystems do ilościowego oznaczania DNA pochodzenia męskiego jest jedną z nich. Technologia ta pozwala na wykrycie stężenie DNA w zakresie między 0,023 ng/μl a > 50 ng/μl z zastosowaniem real-time PCR i opiera się na działaniu sond TaqMan® [168]. Przed wyborem powyższej metody zaleca się przeprowadzenie dyferencjalnej ekstrakcji DNA (ang. differential lysis), która w sprawach o przemoc seksualnej pozwoli na selektywną izolację męskiego i żeńskiego DNA w badanej próbce. Jednakże nie zawsze rezultaty tej izolacji są specyficzne, w związku z tym pozostaje problem interpretacji mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety. Ekstrakcja ta jest również czasochłonna oraz pracochłonna [85].

Dodatkowo należy wziąć pod uwagę fakt, że nasienie poddane badaniom może pochodzić od mężczyzny cierpiącego na azoospermię lub będącego po zabiegu wazektomii. W takiej sytuacji zastosowanie izolacji dyferencyjnej jest zbędne, natomiast użycie zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA może dostarczyć informacji o ilości męskiego DNA w mieszaninie, w której stężenie DNA pochodzenia żeńskiego jest dużo większe tak, aby w następnym etapie – amplifikacji zestawem markerów znajdujących się na chromosomie Y, uzyskać pełen profil mężczyzny [170].

Badania przeprowadzone w tym kierunku wykazują, że analiza zestawem AmpFℓSTR® Yfiler™ firmy Applied Biosystems pozwala na uzyskanie pełnego profilu mężczyzny podczas analizy mieszaniny DNA mężczyzny i kobiety w proporcji nawet powyżej 1:1000 oraz również wtedy, kiedy stężenie DNA męskiego wynosi tylko 62,5 pg [85, 136]. Inne badania wskazują na możliwość pełnej detekcji profilu genetycznego mężczyzny w mieszaninie, w której dominuje materiał genetyczny kobiety w proporcji do 1:1200 zestawem PowerPlex®Y System firmy Promega®

Corporation [110]. Podobne badania techniką real-time PCR systemem PowerPlex® HY firmy Promega® pozwoliły na wykrycie DNA pochodzenia męskiego. Analizowano mieszaniny w postaci wyizolowanego DNA mężczyzny i kobiety w różnych proporcjach. Metodą tą uzyskano produkt amplifikacji również w maksymalnej badanej proporcji ♂1:10000♀ [109].

W badaniach, gdzie uzyskujemy trudną do interpretacji mieszaninę DNA mężczyzny i kobiety zastosowanie Y-SNPs może mieć potencjalne znaczenie w kierunku rozwiązania problemu obecności allelu Y w markerze amelogeniny.

Wybrane w tym celu SNPs na chromosomie Y mogą charakteryzować się niskim polimorfizmem, ponieważ mają służyć tylko wykryciu obecności DNA męskiego w badanym śladzie. Należy natomiast wziąć pod uwagę ilość zastosowanych Y-SNPs, aby siła dyskryminacji równała się sile dyskryminacji jednego markera STR, w tym przypadku amelogeniny.

Pierwszym etapem badania techniką real-time z zastosowaniem barwnika SYBR Green I oraz sY81 było sprawdzenie optymalnej temperatury annealingu – przyłączenia starterów. W tym celu korzystano z technologii gradientu termicznego przy pomocy MasterCycler® gradient. Przewiduje się, że optymalna temperatura przyłączenia primerów oscyluje między 55°C a 72°C [27, 65, 78]. Gradient temperatur określony w naszym eksperymencie wyniósł od 60°C do 67°C. Uzyskano optymalną temperaturę annealingu wynoszącą 64°C. Teoretycznie temperatura annealingu primerów powinna być o 5°C niższa od ich temperatury topnienia [27, 65, 78]. W praktyce, aby uzyskać specyficzny produkt, temperaturę annealingu dobiera się indywidualnie [234]. Zbyt niska temperatura annealingu powoduje powstanie niespecyficznych produktów, a z kolei zastosowanie wysokiej temperatury powoduje brak produktu amplifikacji [234]. Najlepiej w takiej sytuacji przeprowadzić amplifikację przy zastosowaniu termocyklera gradientowego, aby jednoznacznie ustalić temperaturę annealingu, oszczędzając koszty i czas analizy.

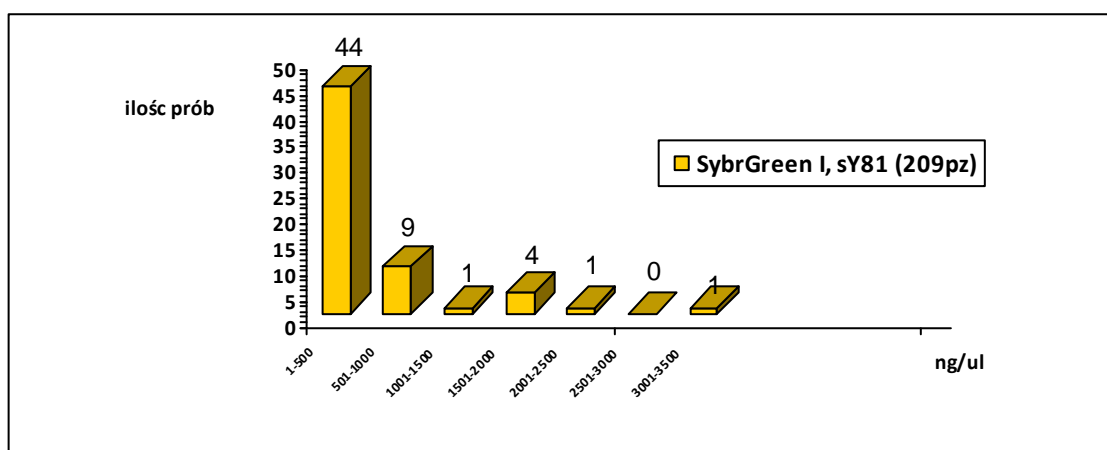
Optymalną temperaturę annealingu do badań z sY81- 64°C, sprawdzono za pomocą LightTyper®, firmy Roche Diagnostics. Technika ta jest bardzo podobna do real-time PCR. W LightTyper® można przeprowadzić analizę SNPs oraz zoptymalizować warunki reakcji PCR poprzez kalkulację stężenia primerów, jonów Mg²⁺ oraz innych składników mieszaniny reakcyjnej PCR. Dodatkowo LightTyper®

zawiera specjalny program umożliwiający projektowanie primerów oraz sond molekularnych do danego fragmentu DNA, który planujemy amplifikować.

Po amplifikacji gradientowej ta sama płytką została poddana analizie topnienia w LightTyper®. Temperaturę, w której uzyskano najwięcej specyficznych produktów, należy zinterpretować jako optymalną temperaturę annealingu starterów.

Uzyskane wyniki przy badaniu 108 prób (mężczyźni) barwnikiem SYBR® Green I oraz sY81 wskazują na jedną temperaturę topnienia wynoszącą ~80°C. Uzyskana temperatura topnienia również została potwierdzona analizą przeprowadzoną w LightTyper®.

Technika real-time PCR z zastosowaniem barwnika SYBR® Green I - sY81 pozwoliła na uzyskanie produktu amplifikacji w 60 próbach, co stanowi 55,5% badanych prób. W 44 próbach uzyskano wynik amplifikacji o stężeniu DNA do 500 ng/μl, natomiast w 16 próbach o stężeniu powyżej 500 ng/μl, (tab. nr 4.1.), (ryc. nr 5.1.).



Ryc. nr 5.1. Zakres stężenia DNA oraz próby, w których uzyskano produkt amplifikacji barwnikiem SYBR Green I oraz sY81.

Technika z barwnikiem interkalującym pozwala na szybką interpretację wyników, a dodatkowo nie wiąże się z dużymi kosztami analizy. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że zakres, w którym uzyskano najwięcej produktów amplifikacji (w 44 próbach), nie odpowiada naszym oczekiwaniom – od 78 ng/μl do 500 ng/μl, ponieważ wiadomo, że stężenie DNA izolowanego ze śladów biologicznych jest niskie. Zastosowanie tej metody może okazać się mało pomocne w rozwiązywaniu problemu wykrycia obecności DNA mężczyzny w badanym śladzie.

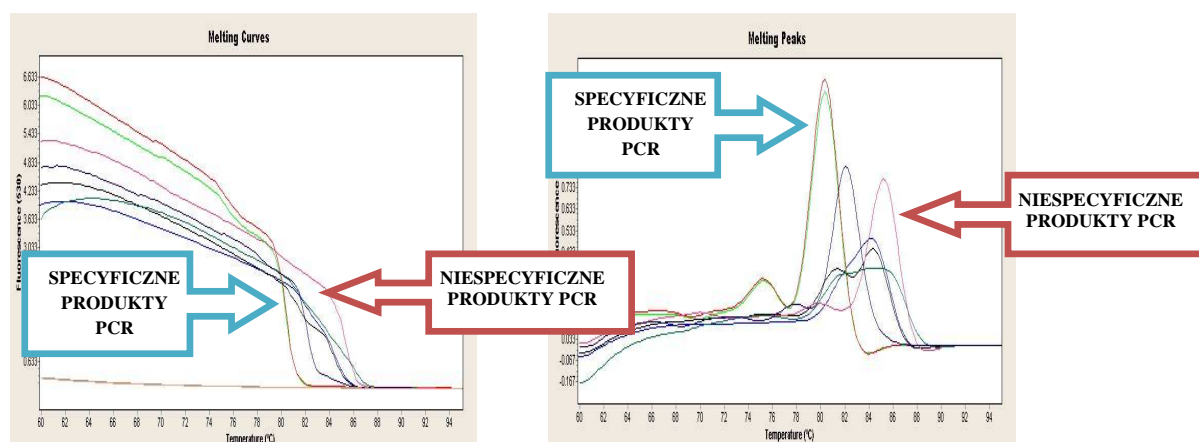
W próbach, w których wykazano stężenie DNA między 0,02 – 2 ng/μl, nie uzyskano produktu amplifikacji z zastosowaniem barwnika SYBR Green I oraz sY81.

W 16 próbach uzyskano stężenie DNA powyżej 500 ng/μl. Aby uzyskać wymagane do reakcji real-time PCR barwnikiem SYBR® Green I firmy Fermentas stężenie DNA (do 500 ng), wszystkie próby zostały rozcieńczone tak, aby móc poddać je reakcji PCR z powyższym barwnikiem.

Należy przyjąć, że badano również tą metodą DNA pochodzący ze śladów biologicznych (prawdopodobna degradacja opracowywanego DNA) oraz, że wybrany Y-SNP zawiera 209 pz, co dodatkowo wpływa na brak amplifikacji badanego materiału.

Do najczęściej stosowanych barwników w technice real-time PCR należy SYBR® Green I. Jednym z powodów jego popularności jest to, że spektrum emitowanej fluorescencji jest równoznaczny ze związaniem z podwójną nicią DNA [23]. Natomiast SYBR® Green I charakteryzuje się tym, że wiąże się z każdą podwójną cząsteczką DNA, co w efekcie może dawać niespecyficzne produkty reakcji PCR [23].

Reakcja z użyciem barwnika SYBR® Green I wymaga optymalizacji. Należy zwracać uwagę na różne czynniki, które potencjalnie mogą decydować o dokładności oraz specyficzności reakcji PCR. Cząsteczki DNA dodane do mieszaniny reakcyjnej posiadają różne temperatury topnienia w zależności od zawartości nukleotydów G - C, długości amplikonu, struktury DNA (dwurzędowej lub trzeciorzędowej) oraz zaplanowanych składników do mieszaniny reakcyjnej [23]. Analizując krzywe topnienia uzyskane w naszej pracy w wyniku zastosowania SYBR® Green I, można zaobserwować różne poziomy fluorescencji, co wskazuje na dodatkową amplifikację niespecyficznych produktów PCR. Ponieważ oczekiwana temperatura topnienia badanego fragmentu DNA wynosi ~80°C, można było wyselekcjonować nasze oczekiwane wyniki – specyficzne produkty PCR (ryc. nr 5.2), które zostały dodatkowo sprawdzone przy pomocy LightTyper®.



Ryc. nr 5.2. Uzyskano specyficzne produkty amplifikacji tylko w 2 próbach (wykresy koloru zielonego i czerwonego). Reszta to niespecyficzne produkty reakcji PCR.

Wynik amplifikacji zależy również od ilości DNA dodanego do reakcji PCR. Na przykład sekwencja o wielkości 200 pz w ludzkim genomie (3.3×10^9 pz) stanowi około 0.000006% całego DNA [23]. To znaczy, że około milion razy więcej DNA jest potrzebne, aby utrzymać równą ilość kopii w reakcji (1 μ g ludzkiego genomowego DNA = 3.04×10^5 cząsteczek) [23]. Najczęściej popełnianym błędem jest dodanie zbyt dużo plazmidowego DNA lub za mało genomowego DNA do analizy PCR [23]. Jeżeli numer cząsteczek docelowej sekwencji jest znany, wtedy analiza Real-time PCR jest niepotrzebna [23]. Niemniej jednak optymalna ilość wyjściowego DNA powinna wynosić więcej niż 10^4 kopii, generując C_t po 25-30 cyklach z końcowym stężeniem DNA nie więcej niż 10 ng/ μ l [23].

Innym wewnętrznym czynnikiem reakcji PCR, który należy wziąć pod uwagę, jest inhibicja. Izolowany DNA do badań genetyczno-sądowych pochodzi z różnych źródeł, w związku z tym może zawierać różnego rodzaju inhibitory reakcji PCR [1-3, 34, 40, 47, 102, 103, 108, 113, 114, 134, 171, 183]. Istnieją metody, które pozwalają zmniejszyć działanie tychże inhibitorów. Jedną z nich jest „FOLT” PCR (formamide low temperature), gdzie amplifikacji dokonuje się bezpośrednio z pełnej krwi bez wstępnych etapów takich jak izolacja DNA [23, 145]. Metoda ta działa na zasadzie zmniejszenia ilości białka koagulacji, pozwalając, aby jak najwięcej DNA zostało amplifikowane [23]. Inhibitory takie jak fragmentacja DNA – apoptoza (programowana śmierć komórkowa) [64, 155, 203], pozostałości antykoagulantu heparyny [12], składniki hemoglobiny lub mioglobiny strawione przez enzym proteinaza K [9] mogą negatywnie wpłynąć na wydajność reakcji PCR [9].

Istnieją inhibitory działające bezpośrednio na etap denaturacji, na funkcję primerów (annealingu) oraz enzym polimerazy [28]. Zbyt duża ilość DNA dodana do reakcji PCR dodatkowo może działać jako inhibitor reakcji PCR [28]. Ilość DNA do analizy jest zmienna i prawdopodobnie część jej wiąże się z czynnikami hamującymi reakcję w trakcie procesu oczyszczania DNA [28]. Każda polimeraza może inaczej reagować na różne inhibitory, dlatego też warto sprawdzać każdy etap analizy DNA, testując kilka enzymów polimerazy, aby zastosować najbardziej wydajny [28]. Dodatkowo faza „plateau” reakcji PCR jest efektem amplifikacji produktów DNA, które hamują enzym polimerazę [28, 36, 102]. Efekt ten może zostać wykorzystany do zwiększenia specyficzności polimerazy poprzez dodawanie oligonukleotydów, które działają podobnie jak enzym [28, 43]. Oligonukleotydy, jako bezpośrednie inhibitory

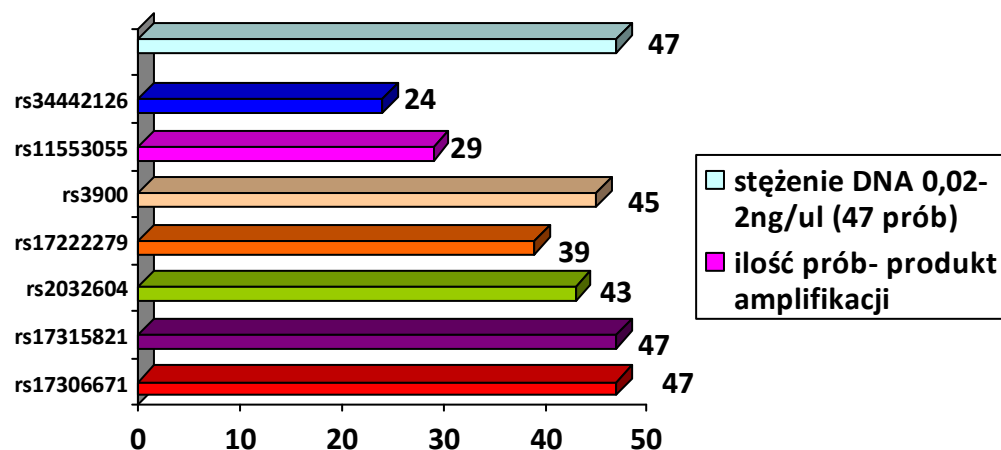
polimerazy ze stałą dysocjacją oraz z niskim zakresem pikomolowym, efektywnie blokują aktywność polimerazy do 25°C, natomiast przestają działać jako inhibitory w temperaturze powyżej 40°C [28].

Celem pozyskania lepszych wyników techniką real-time PCR można sięgnąć po nowe bardziej specyficzne znaczniki interkalujące. W ostatnich latach pojawiły się na rynku inne barwniki takie jak LCGreen® Plus, EvaGreen® i Cromofy™ m.in.. Technika Real-time z zastosowaniem LCGreen® Plus polega na działaniu oligonukleotydów nieoznakowanych fluorescencyjnie w obecności nasyczonego DNA (saturating) z barwnikiem, w tym przypadku LCGreen® Plus. Po amplifikacji uzyskujemy dwie mniejsze temperatury topnienia należące do sond oraz większą temperaturę wskazującą topnienie badanego amplikonu. Metoda nie jest kosztowna, za to jest specyficzna i przy posiadaniu odpowiedniej aparatury można w jednym eksperymencie uzyskać genotyp kilku loci SNPs [49, 249].

EvaGreen® jest barwnikiem o wysokiej stabilności opracowanym do analizy DNA metodą real-time PCR w systemie HRM (ang. High-resolution DNA melting curve analysis). Znacznik ten wiąże się z cząsteczką DNA przez mechanizm „release - on - demand” (zwolnienie na żądanie), składa się z dwóch barwników monomerycznych, które aktywują się w momencie związania się z podwójną nicią DNA. Jest bardziej specyficzny niż SYBR® Green i można go zastosować w większym stężeniu, uzyskując lepszy sygnał [104].

Analizie poddano real-time PCR testem LightSNiP zawierającym specyficzne sondy molekularne, primery oraz wybrane Y-SNPs, przede wszystkim te próby, w których nie uzyskano produktu amplifikacji barwnikiem SYBR® Green I, w celu sprawdzenia przydatności tej metody w kierunku badania śladów biologicznych.

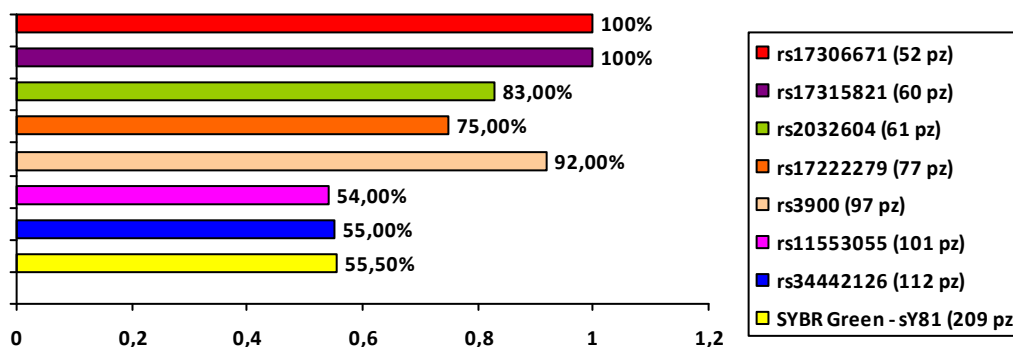
W 47 próbach otrzymano produkt amplifikacji w zakresie stężenia DNA między 0,02 a 2 ng/μl, co może mieć istotne znaczenie w analizie śladów biologicznych w genetyce sądowej. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę, że przeprowadzenie real-time PCR śladu biologicznego z zastosowaniem Y-SNPs dokonuje się po izolacji DNA, w związku z tym nie tracimy materiału do dalszych badań i na tym etapie można już wykryć obecności materiału genetycznego pochodzenia męskiego.



Ryc. nr 5.3. Przedstawia poszczególne wyniki uzyskane z zastosowaniem wybranych Y-SNPs podczas analizy próby o stężeniu DNA w zakresie między 0,02 a 2 ng/μl.

Analizując powyższą rycinę można zaobserwować, że najmniej produktów amplifikacji w zakresie stężenia DNA między 0,02 ng/μl a 2 ng/μl uzyskano przy użyciu Y-SNPs: rs34442126 (112 pz) oraz rs11553055 (101 pz). Zastosowanie mniejszych o pary zasad Y-SNPs: rs3900 (97 pz), rs17222279 (77 pz), rs2032604 (61 pz), rs17315821 (60 pz) oraz rs17306671 (52 pz) pozwoliło na uzyskanie większej ilości produktów amplifikacji w próbach o niskim stężeniu DNA, co ma istotne znaczenie w analizie śladów biologicznych. Badania nad czułością techniki real-time PCR z zastosowaniem SNPs wskazują na możliwość otrzymania pełnego profilu przy stężeniu matrycy DNA poniżej 250 pg (0,25ng) [78]. W innych eksperymentach z kolei otrzymano pełen profil z użyciem SNPs metodą pirosekwencjonowania oraz SNaPshot podczas analizy matrycowego DNA o stężeniu 500 pg [222]. Zastosowanie również techniki real-time PCR systemem Plexor® HY firmy Promega® pozwoliło na wykrycie DNA pochodzenia męskiego o stężeniu mniejszym od 3,8 pg, natomiast metodą STR-PCR z użyciem systemu PowerPlex®16 uzyskano pełen profil genetyczny mężczyzny przy stężeniu DNA wynoszącym 500 pg oraz systemem PowerPlex® Y o stężeniu DNA na poziomie 170 pg. Na podstawie uzyskanych wyników w powyższej pracy wnioskowano, że w mieszaninie DNA, w której poziom materiału genetycznego pochodzenia żeńskiego wynosi 95%, analiza STR-PCR nie dostarczy informacji o materiale genetycznym pochodzenia męskiego [110]. Ciekawą jest praca, w której przeprowadzono analizę PCR w niskich objętościach mieszaniny reakcyjnej na poziomie od 800 pg do 3 pg. Wykryto pełen

profil genetyczny mężczyzny metodą SNaPshot (Applied Biosystems) przy stężeniu DNA 50 pg [74].



Ryc. nr 5.4. Wydajność metody real-time PCR z zastosowanym barwnikiem – SYBR® Green I oraz sond molekularnych – test LightSNiP.

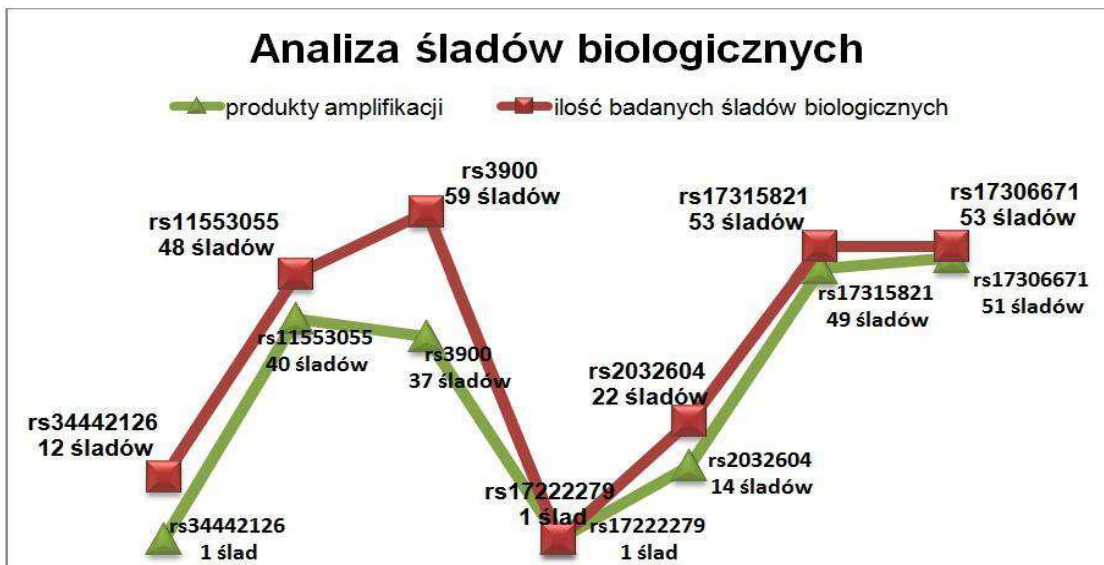
Obserwując rycinę nr 5.4. można zauważyć, że wydajność techniki real-time z barwnikiem SYBR® Green I jest procentowo zbliżona do uzyskanych wyników metodą z zastosowaniem sond molekularnych oraz Y-SNPs o długości około 100 pz. Interesujące są prace, gdzie porównywano dwie metody: jedną z zastosowaniem tego barwnika i drugą z użyciem sond molekularnych. Wnioskowano, że metoda z użyciem SYBR® Green I jest bardziej dokładna, ponieważ uzyskane wykresy wykazały większy spad liniowy, co wiąże się z większą specyficznością tej metody [23, 51, 194]. Jednakże metoda z zastosowaniem sond hybrydujących w naszej pracy okazała się bardziej specyficzna od metody z użyciem barwnika SYBR® Green I oraz pozwoliła na uzyskanie produktu amplifikacji podczas badania próby o niskim stężeniu DNA. Jeżeli warunki reakcji PCR zostały dobrane prawidłowo działanie sond oligonukleotydowych odbywa się w formie specyficznej do badanej sekwencji DNA, innymi słowy, będą hybrydować do komplementarnej nici DNA [113].

Brak amplifikacji z zastosowaniem Y-SNPs: rs34442126 oraz rs11553055 mogła być spowodowana długością badanych amplikonów (pz) oraz ewentualnymi inhibitorami reakcji PCR. Wielkość uzyskanego allelu Y w markerze amelogenu metodą STR-PCR wynosi około 100 pz, tzn. mniej niż powyższe Y-SNPs, co może tłumaczyć brak amplifikacji przede wszystkim w badanym materiale dowodowym.

Analiza temperatur topnienia (T_m) uzyskanych z reakcji real-time PCR loci Y-SNPs rs34442126, rs11553055 i rs2032604 wskazuje na jeden genotyp, natomiast uzyskano dwie T_m podczas badania rs17222279, rs3900, rs17315821 oraz rs17306671, co należy interpretować jako dwa genotypy.

W rozdziale 4.7 zostały podsumowane w formie tabeli wyniki uzyskane z użyciem testu LightSNiP oraz wybranymi Y-SNPs podczas analizy 25 spraw dotyczących przemyce seksualnej opracowywanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UM w Poznaniu, w latach 2008 - 2011. Celem było wykrycie obecności materiału genetycznego mężczyzny w trudnych do analizy mieszaninach DNA uzyskanych metodą STR-PCR. Do realizacji tego zadania wykorzystano technikę real-time PCR.

Każdy opracowany test LightSNiP w tej pracy został zaprojektowany na 96 reakcji (TIB® Molbiol). Aby zbadać jak najwięcej prób składniki mieszaniny reakcyjnej zostały zredukowane o połowę, co pozwoliło na opracowanie jak największej ilości prób. Ponieważ metoda LightSNiP nie została wcześniej sprawdzona w analizie śladów biologicznych, należało ustalić optymalne warunki oraz ilości składników potrzebnych do reakcji PCR, przez co utracono część odczynników na początku tego eksperymentu. W związku z tą sytuacją niektóre sprawy nie zostały zanalizowane metodą LightSNiP. Wyjściowa ilość DNA, jaką uzyskano do badań ze śladów biologicznych, jest stosunkowo mała, co również ograniczyło analizę wszystkich prób.



Ryc. nr 5.5. Czerwona linia przedstawia ogólną ilość badanych śladów biologicznych w poszczególnych zastosowanych Y-SNPs, natomiast zielona linia ilość śladów biologicznych, w których uzyskano produkt amplifikacji techniką real – time PCR.

Najlepsze rezultaty podczas analizy śladów biologicznych testem LightSNiP oraz wybranymi Y-SNPs otrzymano z zastosowaniem rs17315821 (60 pz) i rs17306671 (52 pz). Analizę z rs17222279 przeprowadzono tylko w jednej sprawie dotyczącej

przemocy seksualnej. Pomimo to można zauważyć, że wybór markerów SNPs o wielkości poniżej 100 pz (ryc. nr 5.5.) pozwoliło na uzyskanie produktu amplifikacji ze śladów biologicznych i tym samym stwierdzenie obecności materiału genetycznego pochodzenia męskiego w badanym śladzie. Na tym etapie należałoby wziąć pod uwagę możliwość zastosowania tej metody wraz z odpowiednimi SNPs na chromosomie Y, jako pomocne narzędzie w analizie mieszanin DNA kobiety i mężczyzny otrzymane podczas analizy markerów STR – PCR.

Najciekawsze wyniki otrzymano podczas analizy spraw nr 3, 4 i 9. Wyniki uzyskane podczas analiz sprawy nr 3 w śladzie A – wymazy z pochwy, wskazują na dwa genotypy – C/C i G/G (dwie temperatury topnienia), co można interpretować jako mieszaninę DNA dwóch mężczyzn oraz genotyp uzyskany podczas badania materiału porównawczego - C to C/C. Analizując wyniki otrzymane z zastosowaniem LightSNiP – rs17306671 podczas badania śladów biologicznych (A, B i C) w postaci wymazów z pochwy oraz materiału porównawczego (D) stanowiących sprawę nr 4 można zauważyć, że genotyp uzyskany podczas analizy próby D jest inny od genotypu uzyskanego podczas badania prób A, B i C. W sprawie nr 9 w śladzie D w postaci fragmentu majtek uzyskano również dwa genotypy – dwie temperatury topnienia używając rs3900 oraz rs17315821. W sprawie nr 24 także zauważono interesujące wyniki. Podczas analizy śladu B - wymazu z pochwy - otrzymano genotyp C/C, a w śladzie C – wymaz z pochwy oraz w śladzie D - wyskrobiny spod paznokci (tej samej kobiety, co ślad B) uzyskano genotyp G/G. Tm uzyskana podczas badania materiału porównawczego w postaci wymazów z jamy ustnej podejrzanego w sprawie mężczyzny wskazuje na genotyp G/G. Jednak, aby potwierdzić otrzymane wyniki (sprawy nr 3, 4, 9 i 24) należy przeprowadzić badania z użyciem dodatkowych, bardziej polimorficznych, Y-SNPs (co najmniej 50) [30, 204].

Analizując sprawy, w których wykonano wstępne badania stwierdzenia obecności nasienia lub hemoglobiny w śladzie biologicznym, można zauważyć, że wynik negatywny tychże testów nie wyklucza obecności materiału genetycznego pochodzenia męskiego. W sprawach nr 1, 12 i 15 uzyskano pozytywny wynik badania testem Hemophan na obecność hemoglobiny, natomiast podczas analizy śladów dotyczących powyższych spraw otrzymano wynik negatywny w testach na obecność nasienia (PSA i RSiD - Semen). Testem LightSNiP uzyskano produkt amplifikacji z zastosowaniem Y-SNPs rs11553055 (101 pz), rs3900 (97 pz), rs2032604 (61 pz), rs17315821 (60 pz)

i rs17306671 (52 pz). Test PSA jest testem niespecyficznym. Wynik dodatni obecności antygeny prostaty można uzyskać nie tylko u mężczyzn [14, 67, 191]. Wynik negatywny tego testu może być konsekwencją niskiego stężenia antygeny PSA w badanym śladzie [75]. W sprawie nr 12 otrzymano wynik negatywny testem RSiD-Semen. Test ten jest bardzo specyficzny w kierunku wykrywania białka semelogeniny w nasieniu ludzkim. Negatywny rezultat badanych śladów może powstać w wyniku zbyt małej lub zbyt dużej ilości tego białka w próbce - efekt „Hook”. Sytuacja ta może dać fałszywie negatywne wyniki spowodowane nadmierną ilością antygeny dodanego do reakcji [141]. Prace naukowe prowadzone w tym kierunku wskazują, że analizując więcej niż 3 µl płynu nasiennego, możemy uzyskać fałszywie negatywny wynik testu RSiD-Semen. Aby rozwiązać ten problem zaleca się rozcieńczyć badaną próbę 20 razy i powtórzyć test [141]. Inne ciekawe eksperymenty wskazują na negatywny wynik testu RSiD-Semen podczas analizy wymazów z pochwy pobranych od 3 do 9 dnia po stosunku seksualnym bez stosowania prezerwatywy, gdzie również nie uzyskano profilu genetycznego mężczyzny podczas analizy metodą Y-STR [141].

Okazuje się, że można otrzymać wynik pozytywny testów PSA i RSiD i nie uzyskać pełnego profilu genetycznego mężczyzny metodą STR-PCR z użyciem markerów w regionie autosomalnym oraz na chromosomie Y. Dokonane badania wskazują, że pozytywne wyniki tychże testów można otrzymać w ciągu 4 dni po stosunku seksualnym (dot. analiza wymazów z pochwy) [46]. Rezultat ten związany jest z dłuższą żywotnością plemników w porównaniu z innymi składnikami płynu nasiennego [10, 77]. Inne badania przeprowadzone na wymazach z pochwy pobranych w różnych dniach od momentu stosunku seksualnego wskazują, że kompletny profil genetyczny mężczyzny można uzyskać w ciągu 24 godzin po stosunku seksualnym. Jeżeli próba została zabezpieczona po 48 godzinach od stosunku seksualnego, otrzymanie kompletnego profilu genetycznego mężczyzny metodą STR-PCR jest trudne do osiągnięcia [10].

W analizowanych sprawach nr 1, 12 i 14 uzyskano wynik pozytywny badania testem Hemophan. Można domniemywać, że badane ślady mogły stanowić mieszaniny DNA w postaci krwi kobiety i mężczyzny lub krew jednej osoby i inny materiał biologiczny należący do drugiej osoby. W sprawach nr 2, 21 i 25 otrzymano wynik pozytywny testem PSA, co potwierdzono podczas badania tych spraw testem LightSNiP oraz rs11553055, rs2032604, rs17222279, rs17315821 i rs17306671.

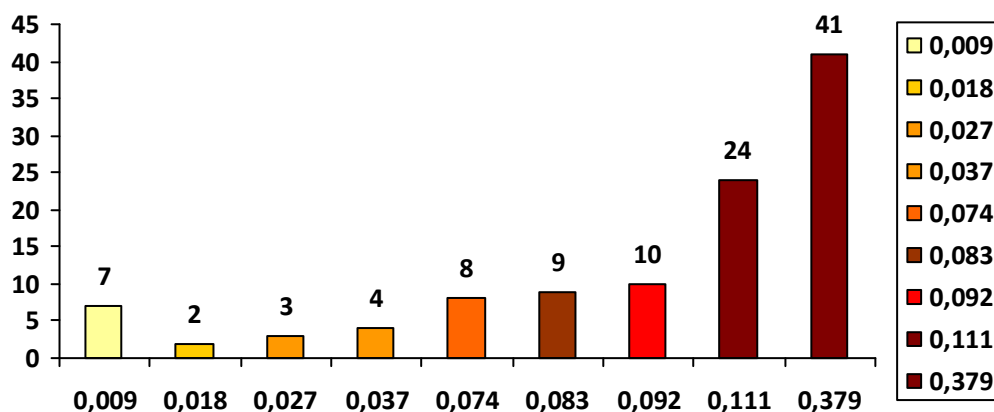
W sprawach nr 5, 13 i 24 uzyskano wynik negatywny testu Hemophan (sprawa nr 5) oraz wynik negatywny testu PSA i RSiD-Semen na obecność nasienia a mimo to otrzymano produkt amplifikacji metodą, LightSNiP oraz rs11553055, rs3900 rs2032604, rs17315821 i rs17306671.

Wyniki uzyskane podczas analizy materiału (rozdział 4.4.) w postaci różnych fragmentów kostnych, mięśnia, skóry z włosami oraz włosów i krwi techniką real-time PCR z zastosowaniem wybranych Y-SNPs pozwoliły na ustalenie płci nieznanymi osob. W powyższych próbach, ze względu na wysoki stopień degradacji badanego materiału, otrzymanie profilu genetycznego metodą STR-PCR było niemożliwe. Zaobserwowano brak produktu amplifikacji podczas analizy materiałów dowodowych w postaci fragmentów skór z włosami. Rezultat ten może być związany z obecnością inhibitorów reakcji PCR, w tym przypadku melaniny. Jej wysoki poziom w skórze oraz we włosach może hamować reakcję PCR [47]. W naszej pracy uzyskano wynik amplifikacji DNA testem LightSNiP oraz zastosowanymi Y-SNPs podczas badania materiału genetycznego NN mężczyzn w zakresie stężenia DNA między 0,1 ng/μl a 76 ng/μl, w tym od 0,1 do 0,9 ng/μl stanowiło stężenie DNA opracowywanych materiałów kostnych. Podobne prace naukowe wskazują na możliwość uzyskania pełnego profilu DNA podczas analizy materiału wysoce zdegradowanego o stężeniu ≤ 200 pg z zastosowaniem markerów SNPs oraz miniSTRs metodą spektrofotometrii gazowej - MALDI-TOF MS [42, 50, 109]. Inne prace z kolei przedstawiają pełen profil genetyczny z zastosowaniem metody SNaPshot oraz pirosekwencjonowania podczas badania prób o stężeniu DNA 500 pg [224]. Zastosowanie metody pozwalającej badać polimorfizm pojedynczego locus w materiale wysoce zdegradowanym może dostarczyć brakującej informacji genetycznej [189, 195]. Możliwość analizy krótkich amplikonów PCR oraz zastosowanie ponad tysiące markerów SNPs może mieć potencjalne znaczenie w analizie identyfikacyjnej [21, 57, 158, 203, 223]. Rekomendacja nr 8 przygotowana przez Międzynarodową Komisję Sądowo - Genetyczną (ISFG – DNA Commission of the International Society for Forensics Genetics) zaleca zastosowanie innych badań takich jak mtDNA, Y-STR oraz SNPs w sytuacji, kiedy uzyskanie profilu genetycznego metodą STR-PCR jest niemożliwe [158].

Badania populacyjne przeprowadzono na 108 próbach DNA, pochodzących od niespokrewnionych mężczyzn z województwa wielkopolskiego. Analiza real-time PCR

testem LightSNiP wykazała obecność alleli T, G/C, A/G, T, C/T i A/T odpowiednio dla rs34442126, rs3900, rs17222279, rs2032604, rs17315821 i rs17306671.

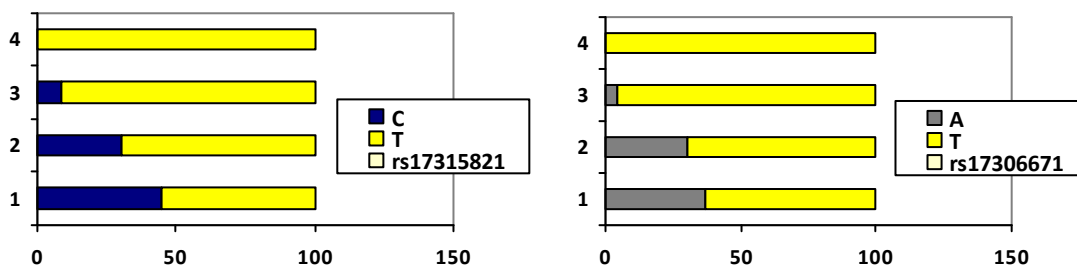
Zaobserwowano 16 haplotypów, w tym 7 pojedynczych (Ht4, Ht5, Ht11, Ht13, Ht14, Ht15 i Ht16). Najczęstszy haplotyp (Ht1) uzyskany w 41 próbach występuje z częstością wynoszącą 0,379. U 7 badanych mężczyzn otrzymano różne haplotypy z częstością występowania - 0,009 (tab. nr 4.8.) (ryc. nr 5.6.).

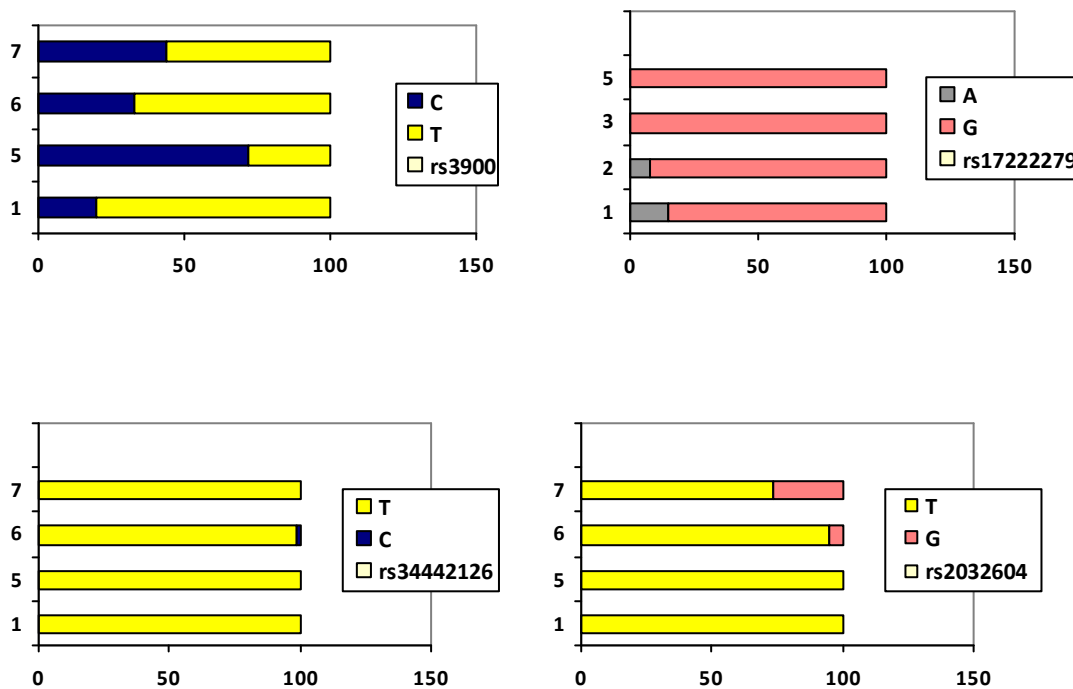


Ryc. nr 5.6. Rozkład częstości haplotypów w zakresie 6 Y-SNPs w populacji mężczyzn regionu wielkopolskiego.

Siła dyskryminacji badanego zestawu wyniosła $DC = 0,1500$, średnia wartość GD (wskaźnik różnicowania haplotypowego) wyniosła 38,5% oraz wskaźnik polimorfizmu genomowego (HD) wyniósł 82,0%.

Najmniejszymi polimorficznymi Y-SNPs w populacji wielkopolskiej okazały się rs34442126 i rs2032604, w których uzyskano jeden genotyp we wszystkich badanych próbach, co w efekcie obniżyło wartości wszystkich badanych wskaźników (GD, DC i HD). Najbardziej polimorficznym Y-SNPs okazał się rs17315821 ($GD = 0,4950$), następnie rs17306671 ($GD = 0,4662$), rs3900 ($GD = 0,3248$) oraz rs17222279 ($GD = 0,2550$).





Ryc. nr 5.7. Porównanie rozkładów częstości alleli badanych 6 Y-SNPs w populacji Polski Zachodniej (1) z populacją Europejską (2), Chińską (3), Japońską (4), Afro – Amerykańską (5), Kaukaską (6) oraz Turecką (7).

Badane Y-SNPs różnią się pod względem częstości alleli występujących w populacji Polski Zachodniej w porównaniu z innymi populacjami, np. badanymi w ramach projektu HapMap tj.: 60 niespokrewnionych Europejczyków (HapMap-CEU) [233], 46 niespokrewnionych Chińczyków z Pekinu (HapMap-HCB) [233], 46 niespokrewnionych Japończyków z Tokyo (HapMap-JPT) [233] dla rs17315821 i rs17306671 [239, 240]. Resztę badanych SNPs (rs3900, rs17222279, rs34442126, rs2032604) [236, 237, 238, 241, 242] porównano z 75 niespokrewnionych mężczyzn populacji Tureckiej [198] ze 115 niespokrewnionymi mężczyznami populacji Afro-Amerykańskiej i 114 niespokrewnionymi mężczyznami populacji Kaukaskiej [216] (ryc. nr 5.7).

Metoda real-time PCR w dużym stopniu okazała się przydatna w analizie śladów biologicznych z zastosowaniem Y-SNPs, pozwalając na uzyskanie wyniku w próbach z niskim stężeniem DNA (0,02 - 2 ng/μl). Należy również wrócić uwagę na wyniki analizy biostatystycznej 6 badanych Y-SNPs, gdzie uzyskana wartość GD (0,3850) mieści się w zakresie 0,3536 do 0,8296, odpowiednio dla markerów Y-STR: DYS393 i DYS385 a/b [86]. Rezultaty te, wskazują, że uzyskana siła dyskryminacji badanego zestawu odpowiada sile dyskryminacji 1 markera Y-STR (DYS393). Ujawniona

zmiennosc w obrębie haplotypów, wynoszącą 0,8200, świadczy o tym, że prawdopodobieństwo iż 2 niespokrewnionych mężczyzn będzie miało ten sam profil genetyczny w zakresie 6 badanych Y-SNPs wynosi 0,1800, tzn., że na 10 badanych mężczyzn 2 mogą mieć ten sam profil genetyczny.

W związku z tym należałoby wziąć pod uwagę możliwość zastosowania badanego zestawu 6 Y-SNPs tylko w badaniach przesiewowych w genetyce sądowej. Jednakże uzyskana wartość HD wskazuje na możliwość wykluczenia 82% badanych mężczyzn z użyciem powyższego zestawu tzn., że na 100 badanych mężczyzn około 80 z nich może mieć różny haplotyp i tym samym może on służyć do wstępnej oceny identyfikacji osobniczej, natomiast na podstawie uzyskanej siły dyskryminacji (porównywalna do 1 markera Y-STR) należy jednak zwiększyć tą wartość poprzez dodawanie do analizy innych polimorficznych markerów Y-SNPs. Zastosowanie krótkich loci Y-SNPs metodą real-time PCR w analizie śladów biologicznych dotyczących spraw o przemoc seksualnej dostarczyło nam jednoznacznej informacji na temat obecności materiału genetycznego pochodzenia męskiego w badanym śladzie. Dodatkowo należy pamiętać, że dokonane badania tychże śladów metodą STR-PCR dały negatywny wynik; jednakże aby przeprowadzić pełną analizę porównawczą musimy badać co najmniej 50 Y-SNPs.

Prace badawcze w tym kierunku wskazują, że siła dyskryminacji 50 markerów SNPs równa się sile dyskryminacji 12 loci STR [30]. Do przeprowadzenia badań w ustalaniu ojcostwa siła dyskryminacji jednego markera STR równa się sile dyskryminacji 5 SNPs, zaś do analizy śladów biologicznych siła dyskryminacji jednego markera STR równa się sile dyskryminacji 2,6 SNPs [30]. Inne badania populacyjne przeprowadzone we Włoszech porównano siłę dyskryminacji uzyskanej podczas analizy zestawu 8 markerów Y-STR z siłą dyskryminacji 37 Y-SNPs. Pierwszym zestawem otrzymano siłę dyskryminacji wynoszącą 99,94%, natomiast zestawem Y-SNPs wynoszącą 82,24%. Wnioskowano, że uzyskana siła dyskryminacji drugiego zestawu nie zwiększyła siły dyskryminacji pierwszego, w związku z tym główna przydatność markerów Y-SNPs w praktyce genetyczno-sądowej polega na możliwość wykorzystania uzyskanych danych w analizie pochodzenia geograficznego badanych mężczyzn [71, 142].

Markery SNPs charakteryzują się niskim polimorfizmem w porównaniu z markerami STR, natomiast niektóre z nich wykazują mniejszy współczynnik

mutacyjny w stosunku do markerów STR: $\approx 10^{-8}$ YSNPs, $\approx 10^{-3}$ Y-STR [28, 39, 97, 101, 172]. Ta ostatnia cecha SNPs - znajdujących się w regionie niekodującym, teoretycznie pozwala na uzyskanie wyników bardziej pewnych pod kątem dziedziczenia mianowicie, może pomóc w analizie pokrewieństwa takie jak identyfikacji ofiar katastrofy masowej [5, 25, 105]. Na podstawie innych badań zauważono pewne nieoczekiwane minusy korzystania z loci SNPs w genetyce-sądowej tj. uzyskano niski poziom informatyczności badanych SNPs (około 50) w porównaniu z 16 loci STRs [5, 25].

W przyszłości analiza SNPs może odgrywać istotną rolę w badaniach, takich jak mtDNA, Y-SNPs, informatycznych markerów charakteryzujących naszych przodków oraz w analizie cech fenotypowych. Badania w regionie kodującym może pomóc w oddzieleniu wspólnego miejsca HV1/HV2 mitochondrialnego DNA [25, 32, 33], natomiast Y-SNPs charakteryzują się niskim polimorfizmem – w zależności od badanej populacji, co ogranicza analizę identyfikacyjnej. Ich zastosowanie znalazło miejsce w badaniach nad pochodzeniem etnicznym [25, 216]. Możliwość przewidywania cech przodków oraz charakterystyki fenotypowe, takich jak kolor włosów [69] lub kolor oczu [209] stanowi kolejne zastosowanie SNPs, co w przyszłości może dostarczyć dodatkowej informacji w sprawach genetyczno-sądowych.

Obecnie analizy SNPs nie dokonuje się rutynowo w laboratoriach sądowych i w najbliższej przyszłości autosomalne markery STRs najprawdopodobniej nie zostaną zastąpione autosomalnymi markerami SNPs [25]. W związku z powyższym użyteczność markerów SNPs powinna być stale badana dla zrozumienia ich cech oraz przydatności i tym samym umożliwienia stworzenia wspólnej platformy technologicznej łatwo dostępnej w genetyce-sądowej [25].

Metoda real-time PCR jest jedną z metod pozwalających na badanie polimorfizmu pojedynczego locus. Wyniki uzyskane w tej pracy potwierdzają jej przydatność w analizie genetyczno-sądowej, co może być istotne w kierunku stworzenia procedur postępowania w badaniach nad SNPs.

6. WNIOSKI

- I. Metoda real-time PCR z barwnikiem SYBR® Green – sY81 okazała się mniej specyficzna w porównaniu z metodą z zastosowaniem specyficznych sond oligonukleotydowych – LightSNiP:
 - Zakres stężenia DNA, w którym uzyskano produkty amplifikacji metodą SYBR® Green I oraz sY81, znajduje się między 78 ng/μl a 3200 ng/μl,
 - Zakres stężenia DNA, w którym uzyskano produkty amplifikacji testem LightSNiP oraz zastosowanymi Y-SNPs znajduje się między 0,02 ng/μl a 5 ng/μl,
 - Metoda real-time z zastosowaniem SYBR Green I nie pozwala na genotypowanie;
- II. Warunki reakcji PCR takie jak temperatura annealingu dla SYBR Green I – sY81 ustalono na 64°C, natomiast jedyną zmianą wprowadzoną dla testu LightSNiP oraz zastosowanych Y-SNPs było zwiększenie ilości cykli amplifikacji do 50;
- III. Uzyskano produkt amplifikacji z użyciem testu LightSNiP oraz zastosowanych 7 Y-SNPs podczas analizy zdegradowanego materiału genetycznego nieznanymi osobami. Otrzymane wyniki pozwoliły ustalić tylko płeć jako męską. Powyższa metoda okazała się pomocna w wykryciu obecności materiału genetycznego pochodzenia męskiego oraz w interpretacji mieszanin DNA kobiety i mężczyzny uzyskanych metodą STR-PCR;
- IV. Wielkość produktu PCR uzyskanego z zastosowaniem Y-SNPs ma istotne znaczenie w analizie śladów biologicznych w genetyce sądowej. Im mniejszy badany fragment Y-SNPs, tym lepsze rezultaty można uzyskać podczas analizy metodą real-time PCR testem LightSNiP;
- V. Stopień polimorfizmu analizowanych markerów Y-SNPs pozwala na ich wykorzystanie w badaniach przesiewowych śladów biologicznych. Wskaźnik polimorfizmu genomowego (HD) wyniósł 82%.

7. STRESZCZENIE

W praktyce badań genetyczno-sądowych interpretacja wyników otrzymanych metodą STR-PCR, gdzie uzyskano mieszaninę DNA kobiety i mężczyzny nie należy do łatwych etapów w naszej pracy. W sprawach dotyczących przemocy seksualnej, w większość przypadków ilość DNA pochodzenia żeńskiego w porównaniu z męskim jest dużo większa. W związku z tym analiza może zostać nieprawidłowo przeprowadzona.

Wstępne badania identyfikacyjne śladów biologicznych w kierunku obecności nasienia nie zawsze wskazują na jednoznaczny wynik. Ilość materiału do badań jest tak mała, że wskazane jest ominięcie wstępnego etapu badań celem pozyskania jak największej ilości materiału do analizy. Ponadto wielkość markerów STR-PCR dostępnych na rynku znajduje się między 100 a 500 pz, co może ograniczyć analizę mieszanin DNA oraz materiału wysoce zdegradowanego (np. kości). Dobór odpowiednich SNPs, w tym przypadku na chromosomie Y, może ułatwić analizę rezultatów otrzymanych w sprawach dotyczących przemocy seksualnej.

Obecnie metody wykorzystywane do analizy SNPs są różne. W tej pracy wykorzystano technikę real-time PCR, która pozwala na szybką interpretację wyników. Zastosowano dwa systemy fluorescencyjne: SYBR Green I oraz test LightSNiP. Ten ostatni zawiera sondy typu Simple®Probe, primery oraz markery Y-SNPs o długości amplikonu od 52 pz do 112 pz. Przeprowadzono analizę celem ustalenia optymalnych warunków reakcji PCR obu systemów. Badano 108 prób z zastosowaniem tychże metod. Porównywano zastosowane metody pod względem czułości i wydajności.

Poddano analizie również testem LightSNiP oraz wybranymi Y-SNPs ślady biologiczne należących do spraw, dotyczących przemocy seksualnej oraz poddano analizie materiał genetyczny pochodzący od nieznanymi mężczyzn opracowanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej w okresie od 2008r. do 2011r.

Wyniki uzyskane z zastosowaniem powyższego testu świadczą o jego przydatności do badań identyfikacyjno-porównawczych. Markery Y-SNPs pozwoliły na wykrycie materiału genetycznego pochodzenia męskiego w mieszaninach DNA oraz na uzyskanie produktu amplifikacji podczas analizy silnie zdegradowanego materiału genetycznego.

Utworzono bazę populacyjną regionu wielkopolskiego w zakresie 6 badanych loci Y-SNPs. Siła dyskryminacji badanego zestawu wyniosła $DC = 0,1500$, średnia wartość

GD (wskaźnik różnicowania haplotypowego) wyniosła 38,5% oraz wskaźnik polimorfizmu genomowego (HD) wyniósł 82%. Choć siła dyskryminacji zestawu nie daje wystarczającej wartości dowodowej, metoda ta może być jednak dobrym narzędziem, służącym do badań przesiewowych zdegradowanego materiału dowodowego.

8. SUMMARY

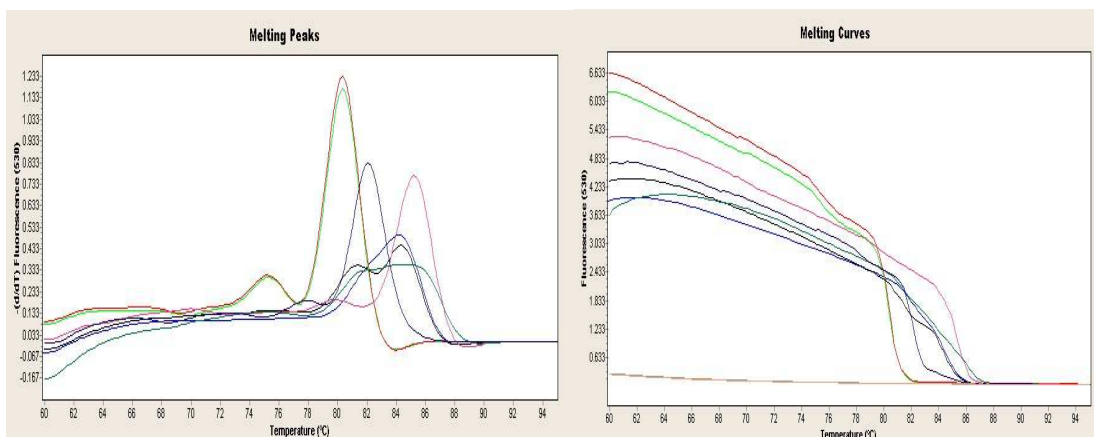
In practice forensic testing, interpretation of the results obtained by STR-PCR method, where a mixture of male and female DNA is not appeared an easy stage in our work. In most cases involving sexual violence, the amount of female DNA compared to male DNA is much larger; therefore the analysis can't be properly carried out. Preliminary studies' identifying biological traces - semen doesn't always show a clear result. The amount of test material is so small that it is desirable to bypass the initial identification test to obtain the largest possible amount of material for analysis. In addition, the size of the STR-PCR markers between 100 pb and 500 pb or highly degraded material (e.g. bone) can further limit the analysis of DNA mixture. Selection of suitable SNPs, in this case on the Y chromosome, may facilitate the analysis of results obtained in cases of sexual violence.

Currently, the methods used to analyze the polymorphism at a single locus are different. In this work the technique of real-time PCR allows for rapid interpretation of results.

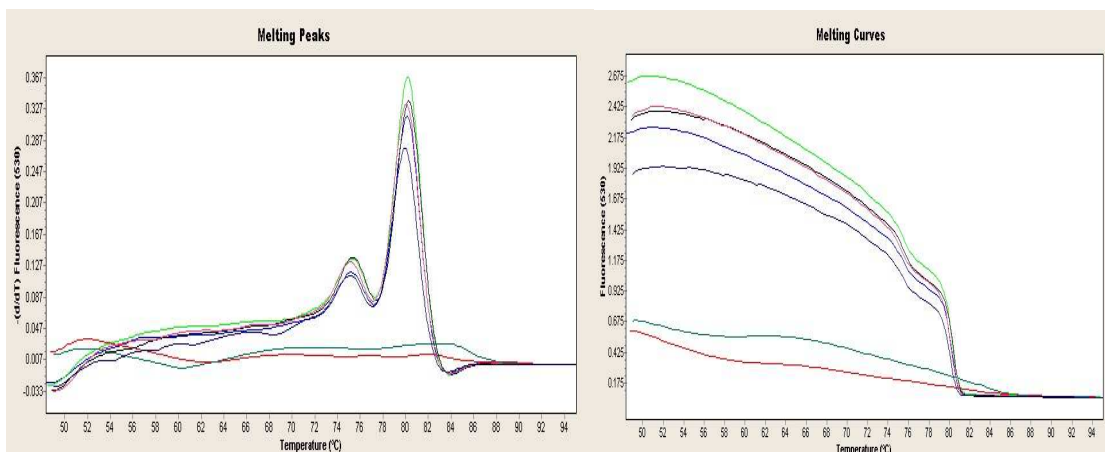
Two fluorescent systems: SYBR® Green I and a test LightSNiP containing probes Simple®Probe, primers and Y-SNPs selected for amplicon length: 52 bp – 112 pb were used. Analysis was performed to determine the optimal conditions for both PCR systems. 108 samples were tested using these methods. Methods were compared in terms of sensitivity and efficiency. Also analyzed with LightSNiP test and Y-SNPs selected biological traces belonging to the cases of sexual violence and the genetic material from unfamiliar males developed in the Department of Forensic Medicine in the period since 2008 to 2011. Results obtained using this test prove their suitability in identification and comparative studies. Y-SNPs markers allowed the detection of product of amplification highly degraded genetic material.

The database of Wielkopolska region was created testing six tested Y-SNPs loci. Discrimination power of the test set was $DC = 0,1500$, average GD (Gene diversity) was 38,5% and the rate of genomic polymorphism (HD) was 82%. Although the discrimination power of the set doesn't provide sufficient probative value, this method can be a good tool, used for the screening of degraded material.

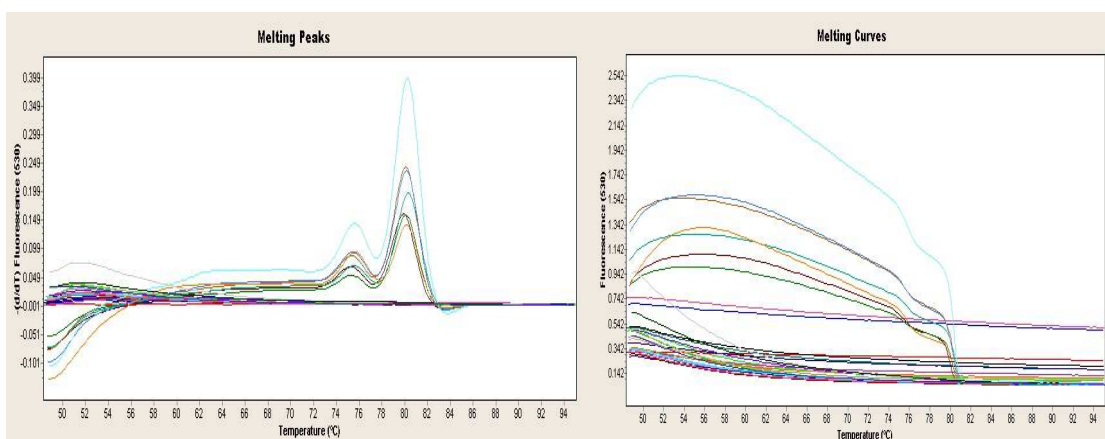
9. SPIS WYKRESÓW



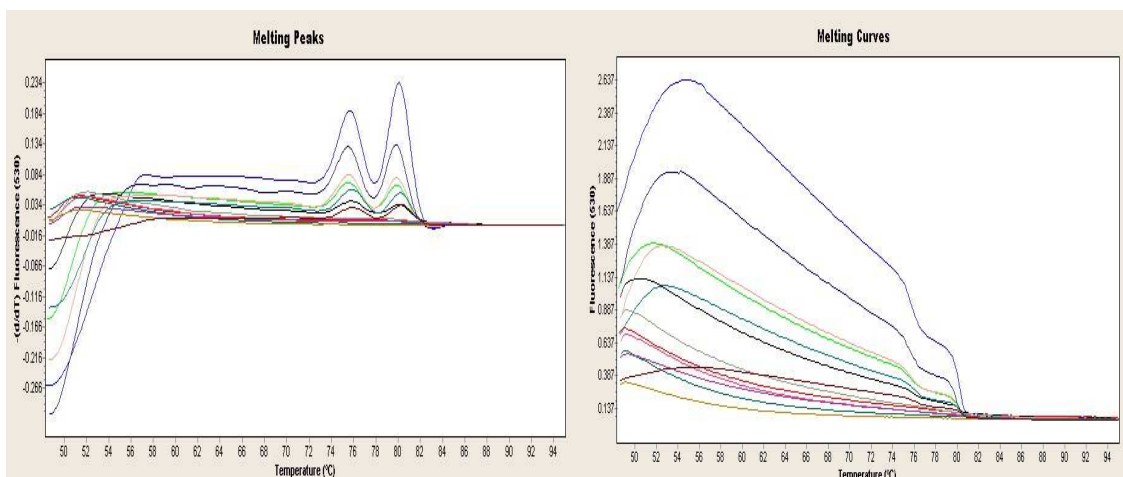
Ryc. nr 9.1. Temperatury oraz krzywy topnienia uzyskane przy badaniu prób 2 i 3 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81. Na wykresie można zaobserwować niespecyficzne produkty PCR – dodatkowe piki.



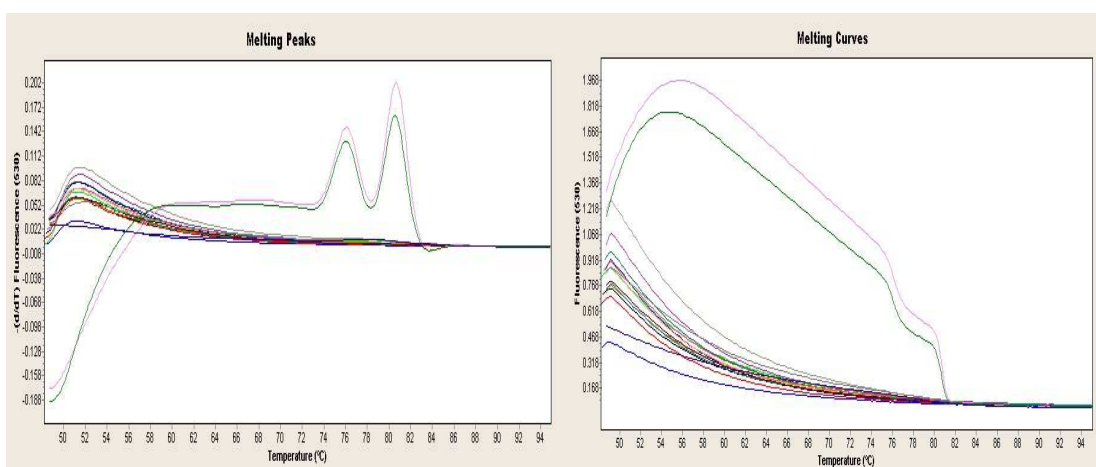
Ryc. nr 9.2. Temperatury oraz krzywy topnienia uzyskane przy badaniu prób 6, 10, 13, 16, 17 i 19 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



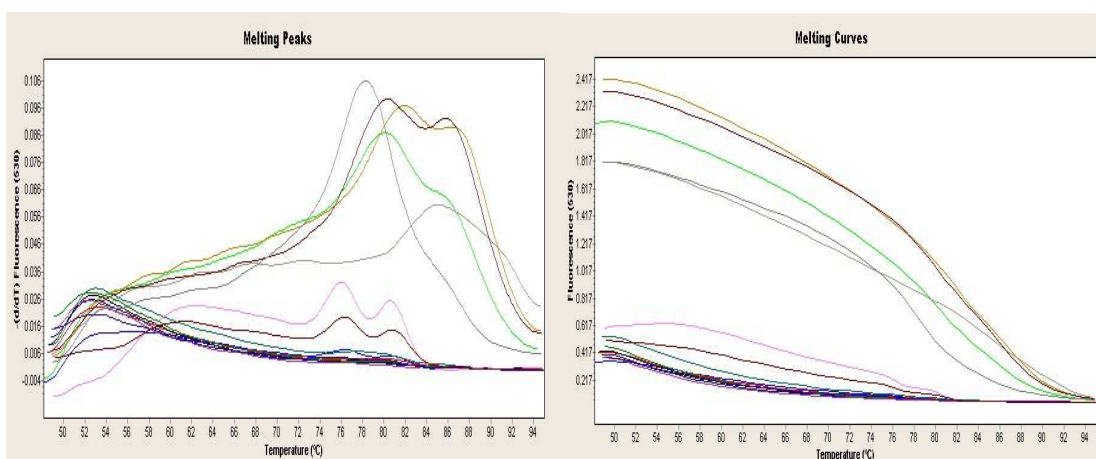
Ryc. nr 9.3. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 21, 22, 24, 25, 28, 29, 30, 31, i 32 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



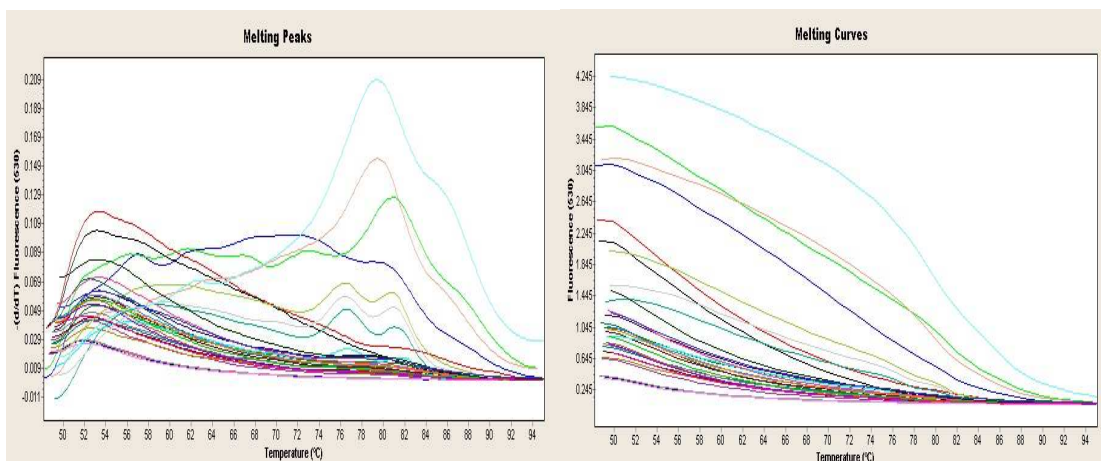
Ryc. nr 9.4. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 34, 41, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50 i 53 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



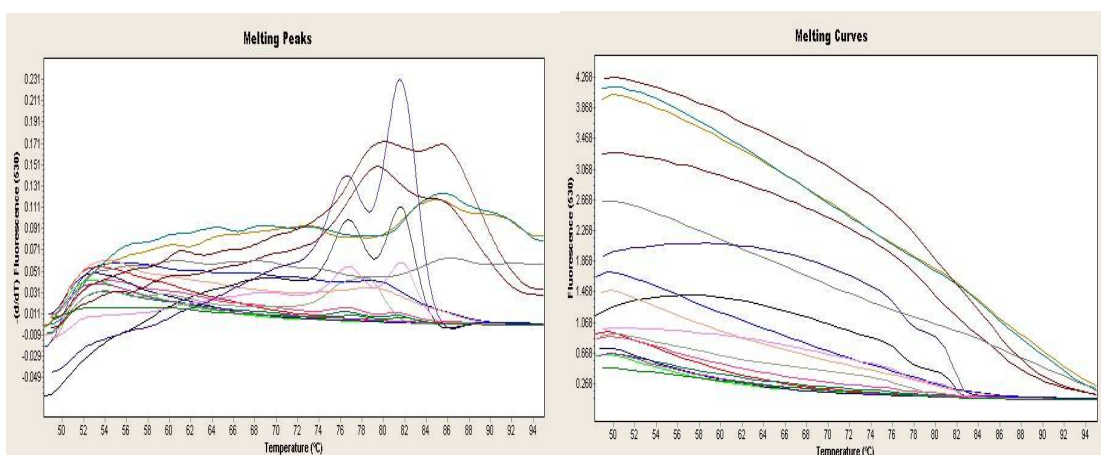
Ryc. nr 9.5. Temperatury oraz krzywe topnienia topnienia uzyskane przy badaniu prób 54 i 55 zestawem z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



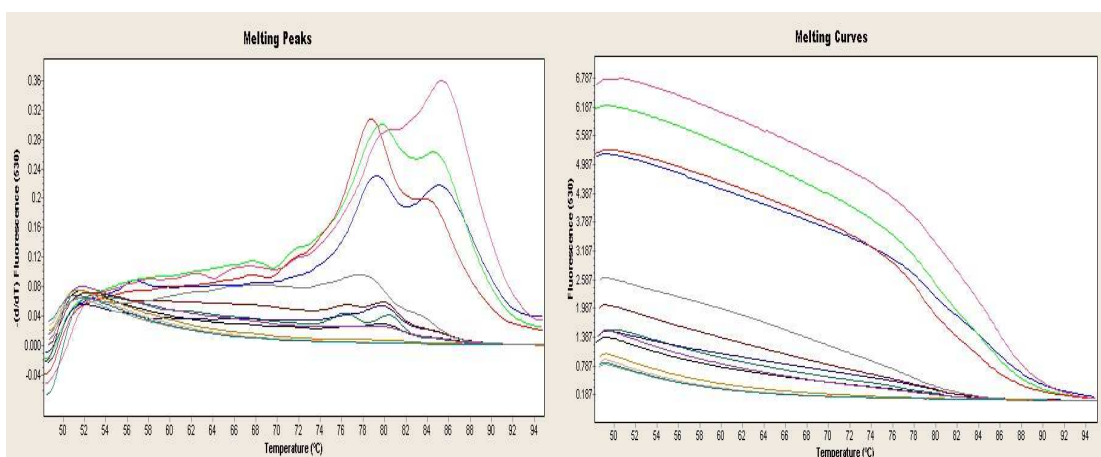
Ryc. nr 9.6. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 56, 57, 58, 59, 60 i 61 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



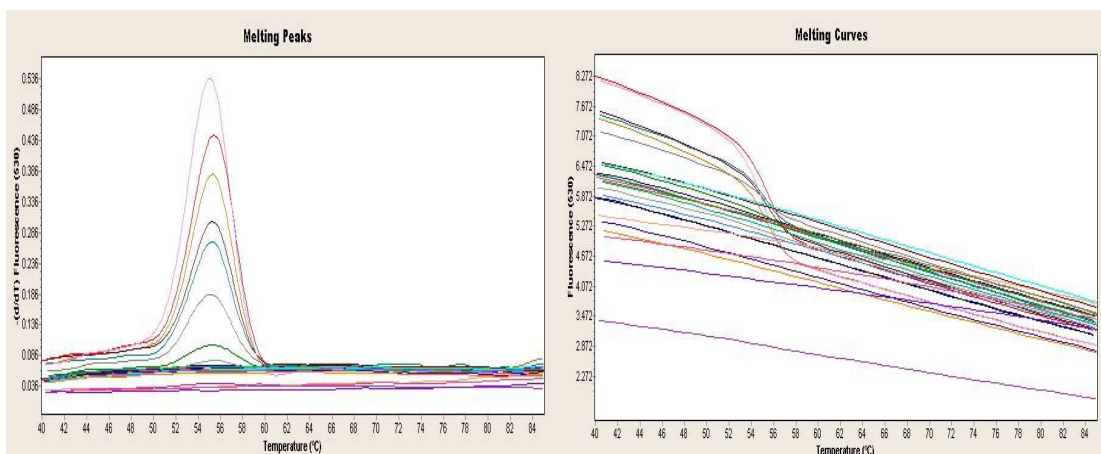
Ryc. nr 9.7. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 64, 65, 67, 69, 70, 72, 75, 76, 77, 78 i 79 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



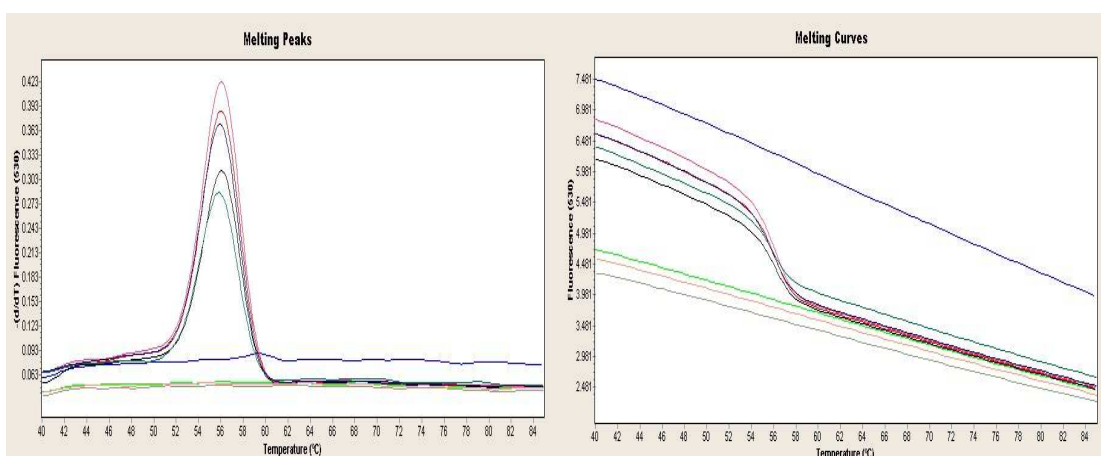
Ryc. nr 9.8. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 80, 84, 87, 88 i 90 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



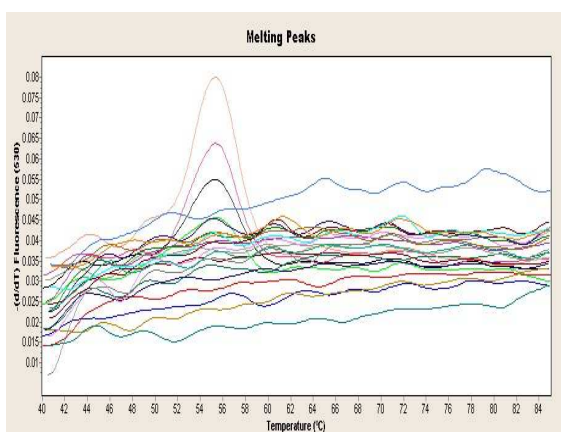
Ryc. nr 9.9. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy badaniu prób 91, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 104 i 106 z barwnikiem SYBR GreenI oraz sY81.



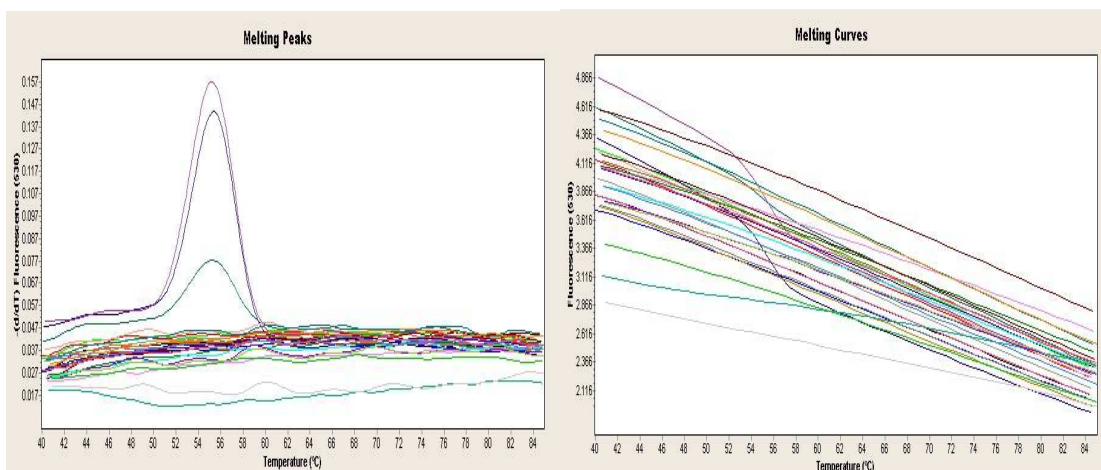
Ryc. nr 9.10. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14 i 15 przy zastosowaniu LightSNiP – rs34442126.



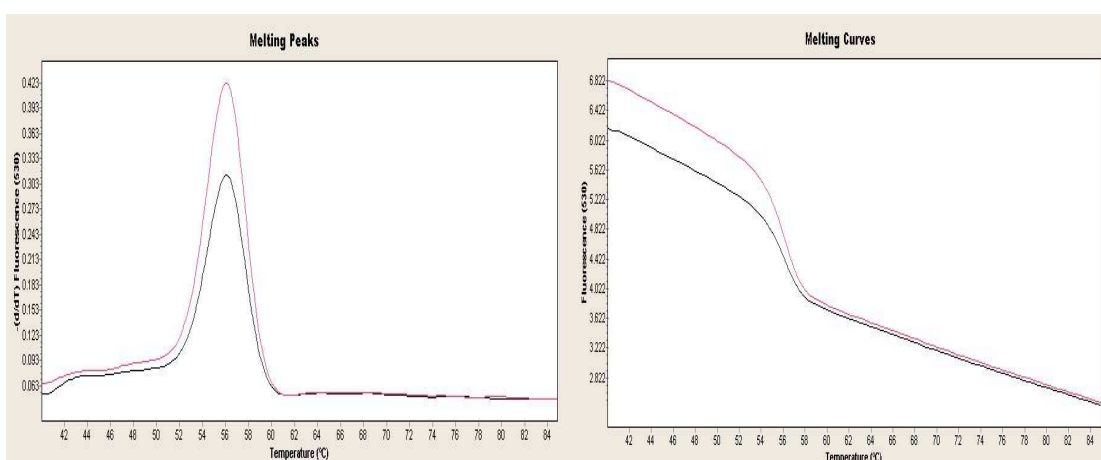
Ryc. nr 9.11. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 18, 20, 23, 26, 27 i 33 przy zastosowaniu LightSNiP- rs34442126.



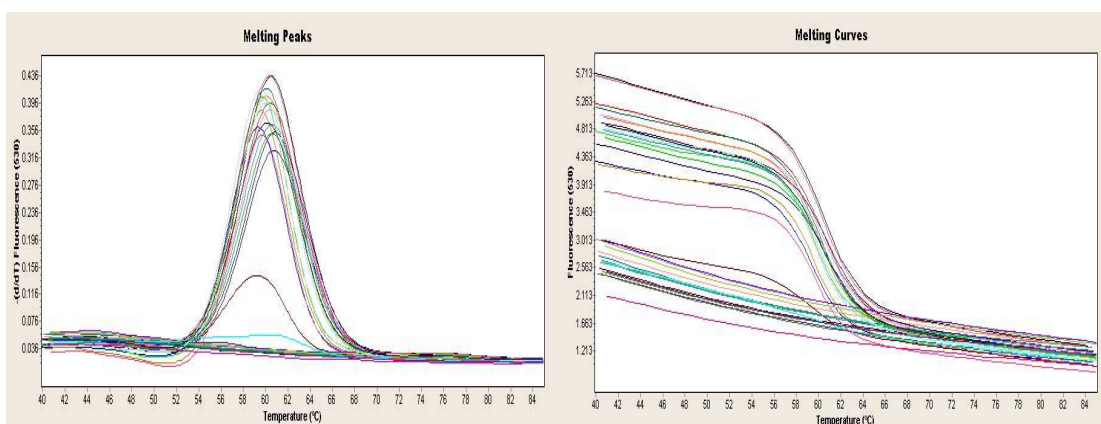
Ryc. nr 9.12. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 36, 37, 38, 40 i 46 przy zastosowaniu przy zastosowaniu LightSNiP – rs34442126.



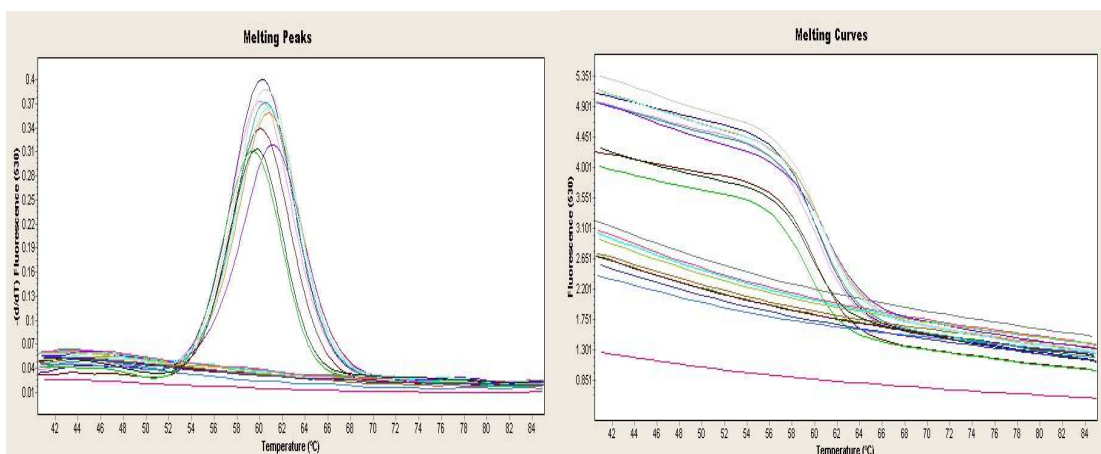
Ryc. nr 9.13. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 47, 51, 62, 73 i 86 przy zastosowaniu LightSNiP – rs34442126.



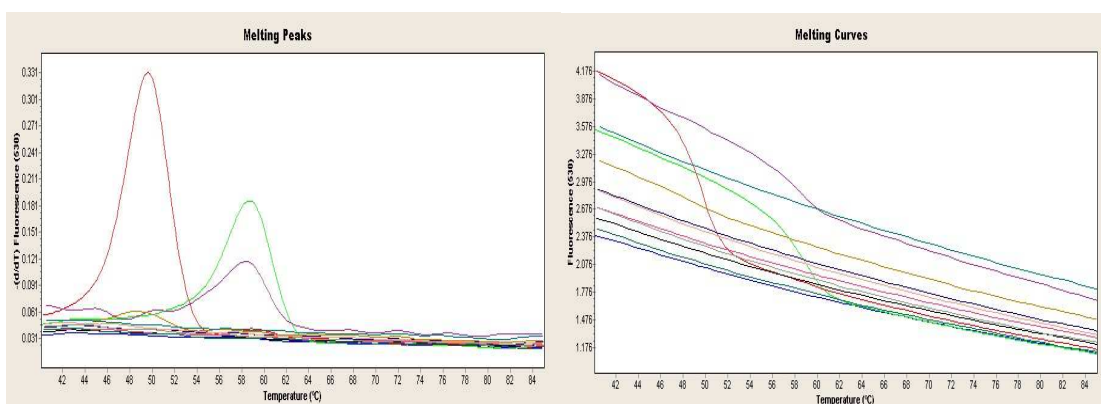
Ryc. nr 9.14. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 93 i 103 przy zastosowaniu LightSNiP – rs34442126.



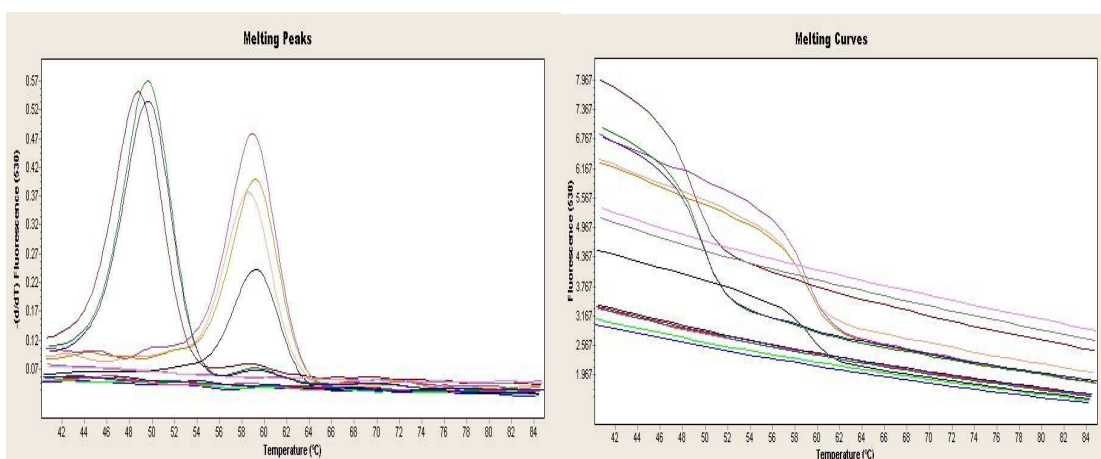
Ryc. nr 9.15. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 23, 26, 27, 33, 35, 36 i 37 przy zastosowaniu LightSNiP -rs11553055.



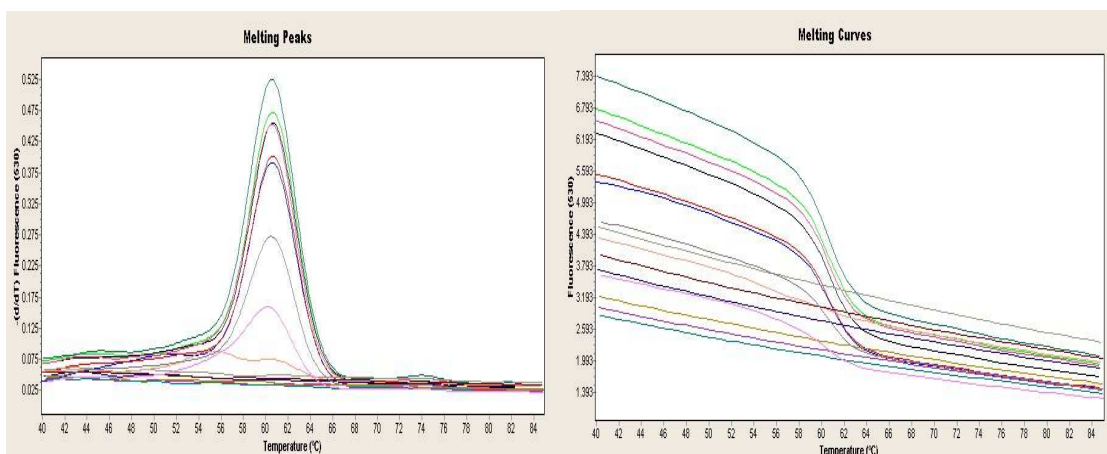
Ryc. nr 9.16. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania prób nr 38, 40, 46, 62, 63, 68, 71, 73, 81 i 86 przy zastosowaniu LightSNiP - rs11553055.



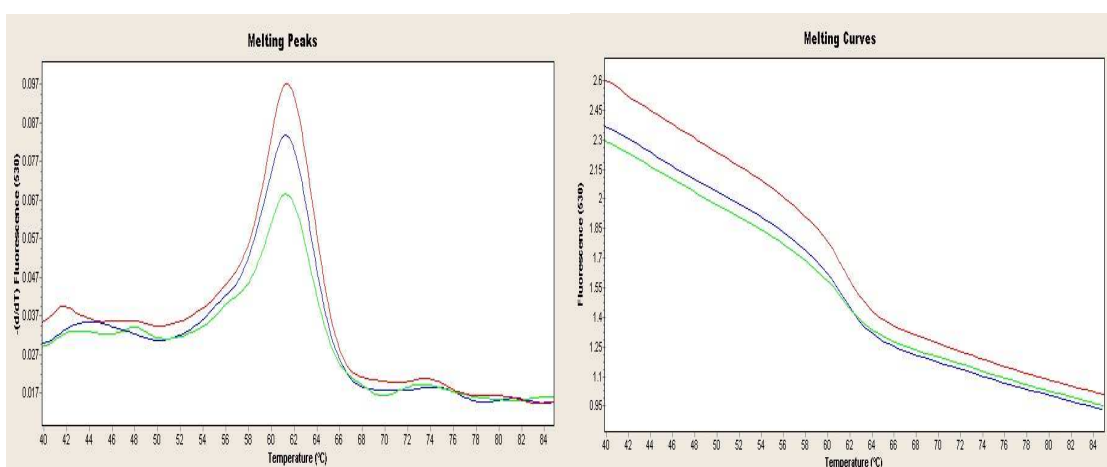
Ryc. nr 9.17. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 1, 4 i 5. Na wykresie można zaobserwować dwie temperatury topnienia, co wskazuje na dwa genotypy.



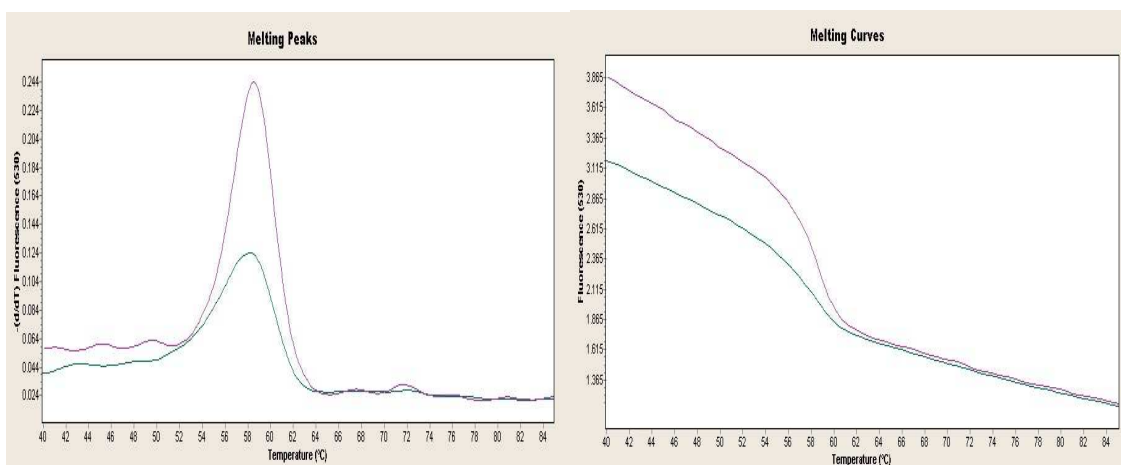
Ryc. nr 9.18. Temperatury oraz krzywe topnienia topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 7, 9, 11, 12, 14, 15 i 18. Na tej rycinie można zaobserwować dwa genotypy.



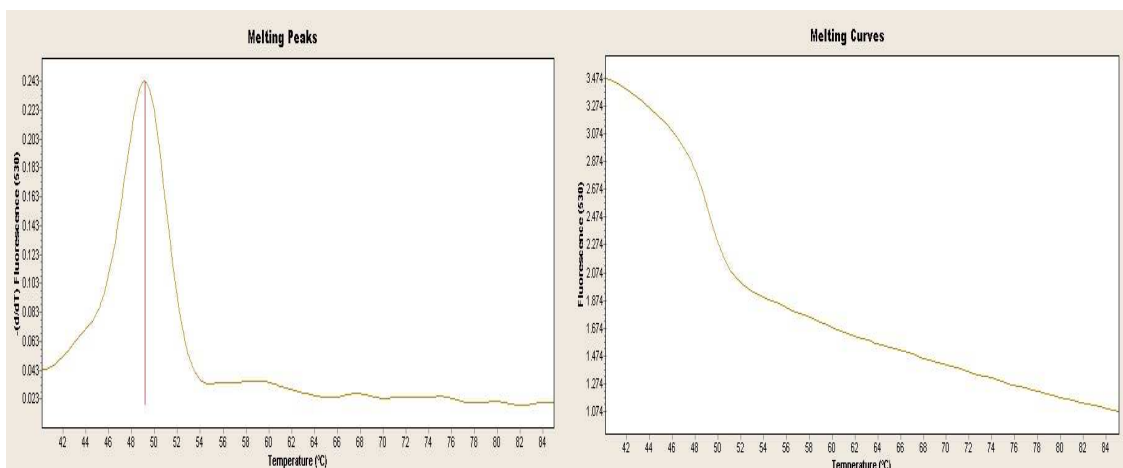
Ryc. nr 9.19. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 23, 27, 33, 35, 36, 37, 38, 39 i 46.



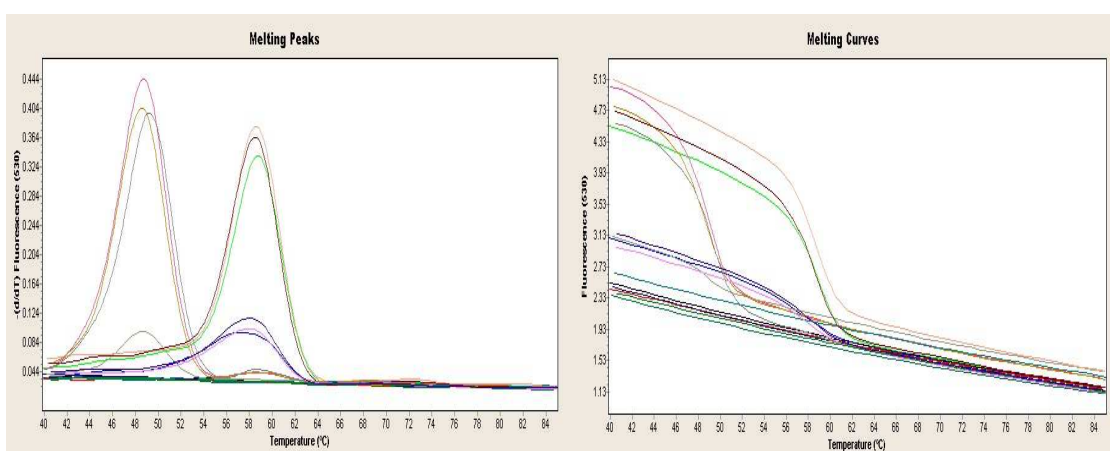
Ryc. nr 9.20. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 47, 51 i 56.



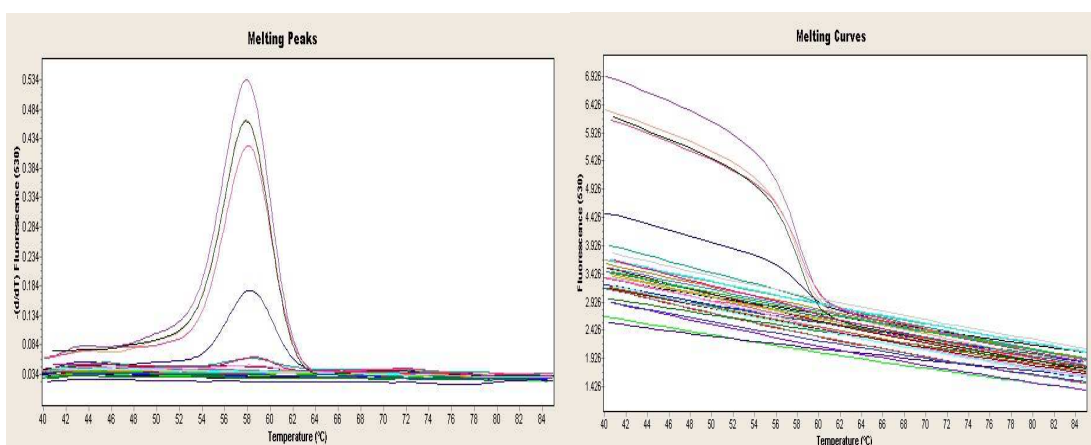
Ryc. nr 9.21. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby nr 57 i 58.



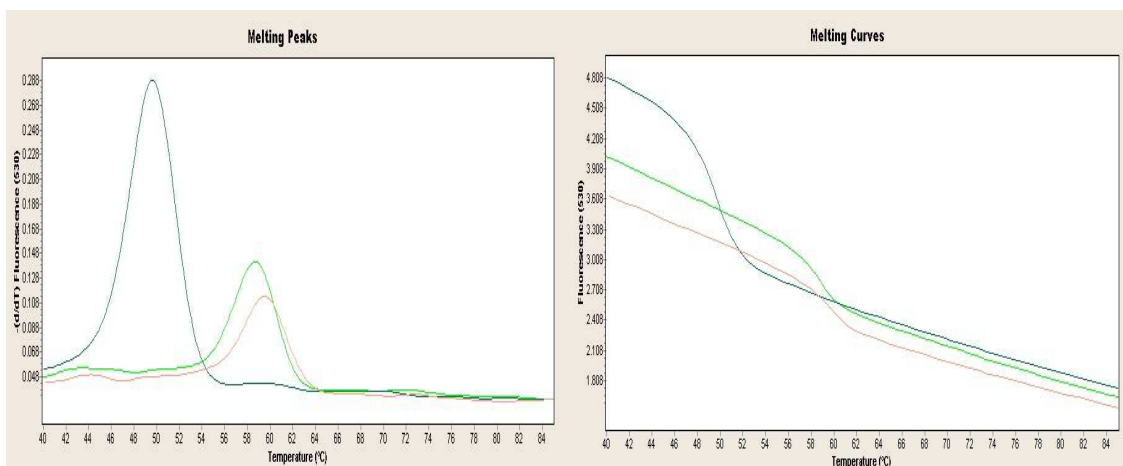
Ryc. nr 9.22. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskanych podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próba nr 20.



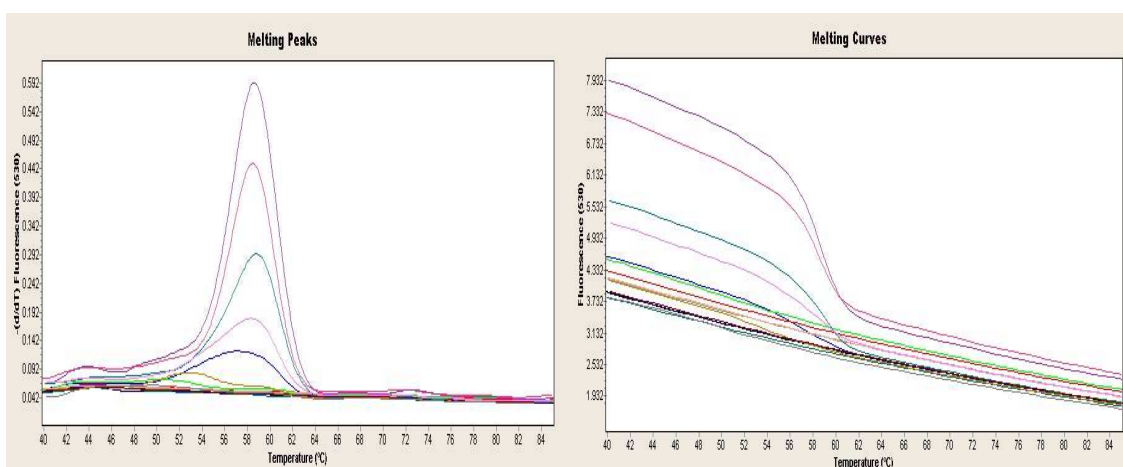
Ryc. nr 9.23. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 26, 40, 62, 63, 68, 69, 70 i 77. Na wykresie można zaobserwować dwie temperatury topnienia, co wskazuje na dwa genotypy.



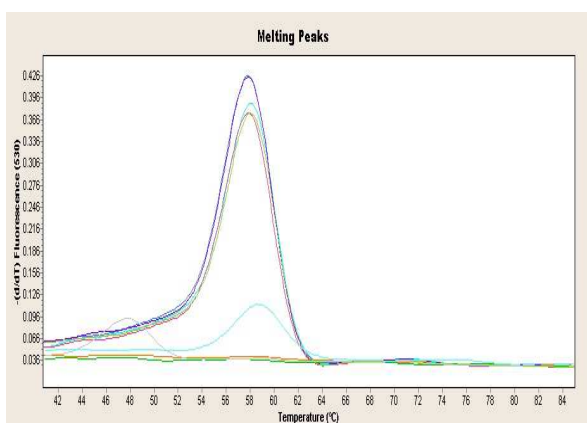
Ryc. nr 9.24. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby 71, 73, 78, 79, 80, 81, 82, 83 i 84.



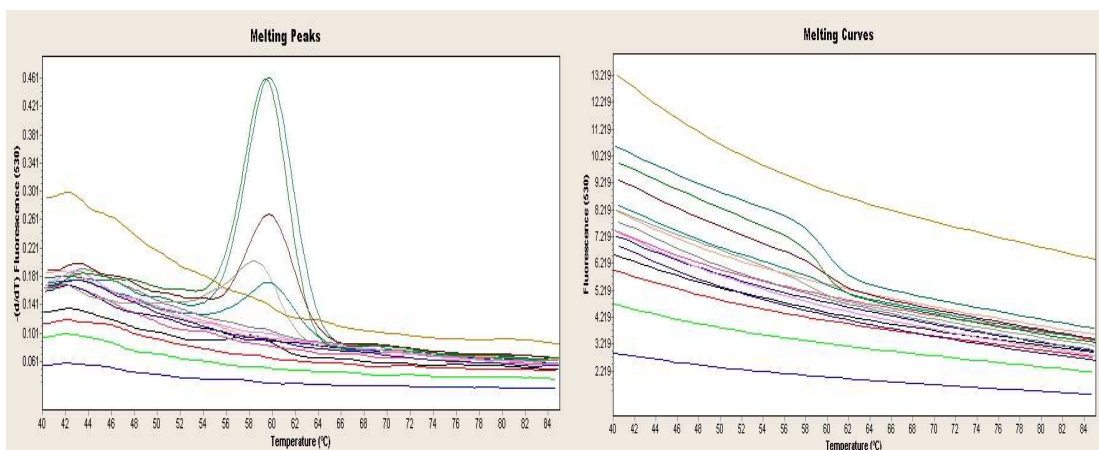
Ryc. nr 9.25. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby nr 86, 88 i 90. Na wykresie można zaobserwować dwie temperatury topnienia, co wskazuje na dwa genotypy.



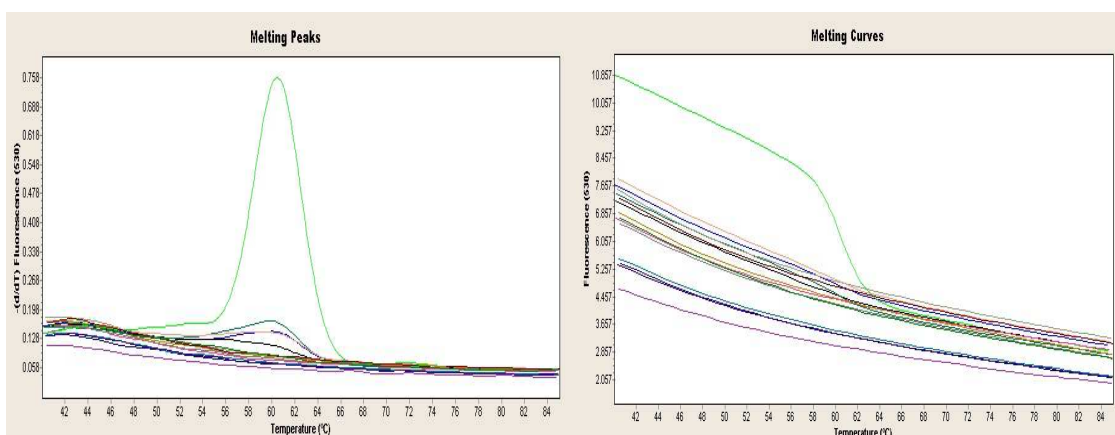
Ryc. nr 9.26. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby nr 92, 93, 97, 102 i 103.



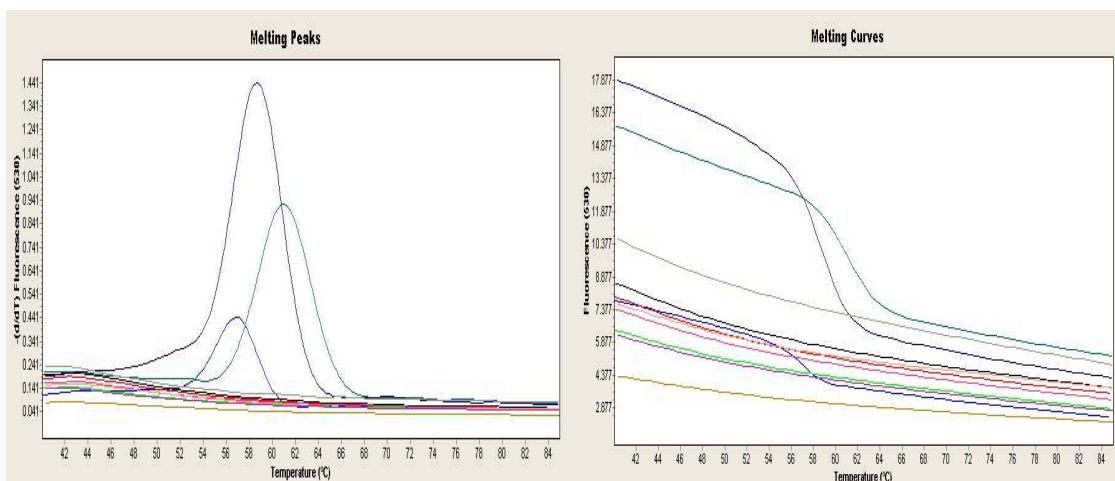
Ryc. nr 9.27. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs3900: próby nr: 104, 105, 107 i 108. Na wykresie można zaobserwować dwie temperatury topnienia, co wskazuje na dwa genotypy.



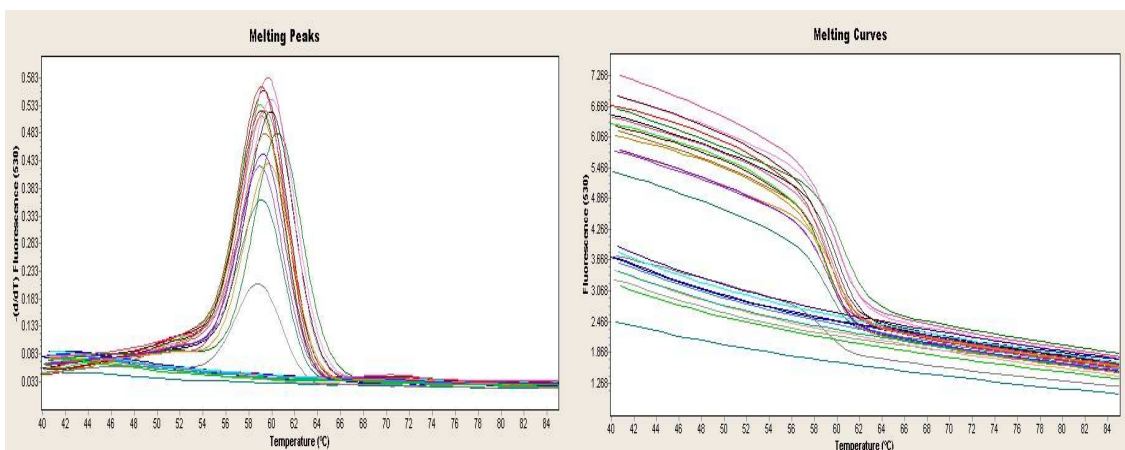
Ryc. nr 9.28. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs1722279: próby nr 1, 4, 7, 9, 11 i 12.



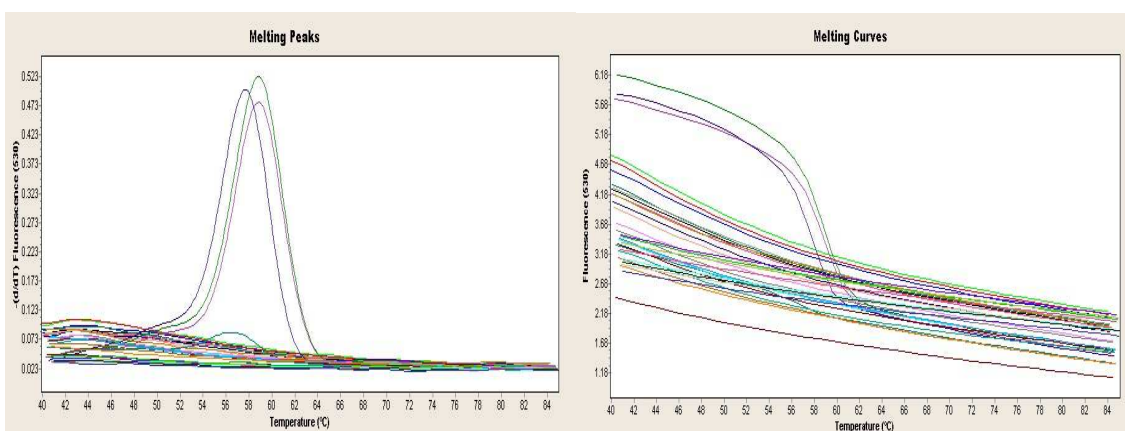
Ryc. nr 9.29. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs1722279: próby nr 14, 15, 18 i 20.



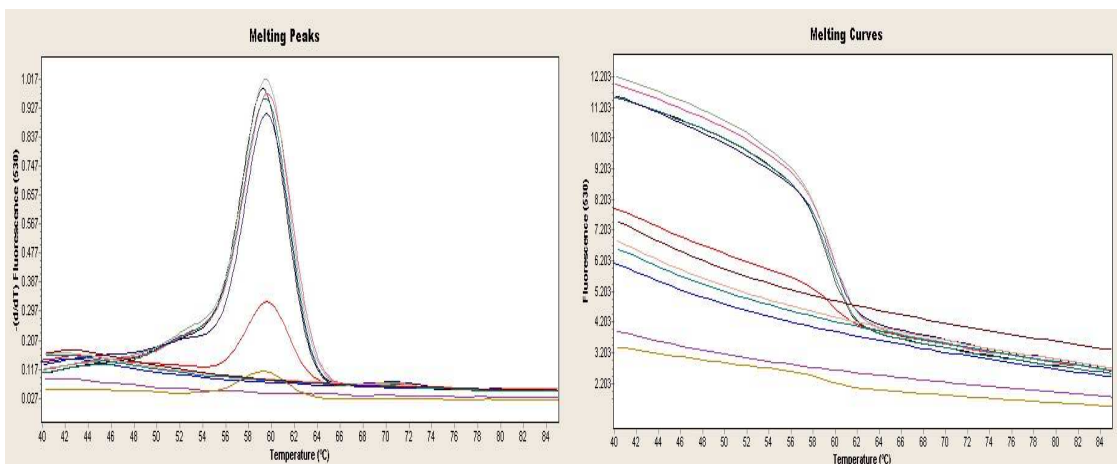
Ryc. nr 9.30. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP -rs1722279: próby nr 5, 23 i 27. Na wykresie można zauważyć dwie temperatury topnienia, co wskazuje na dwa genotypy.



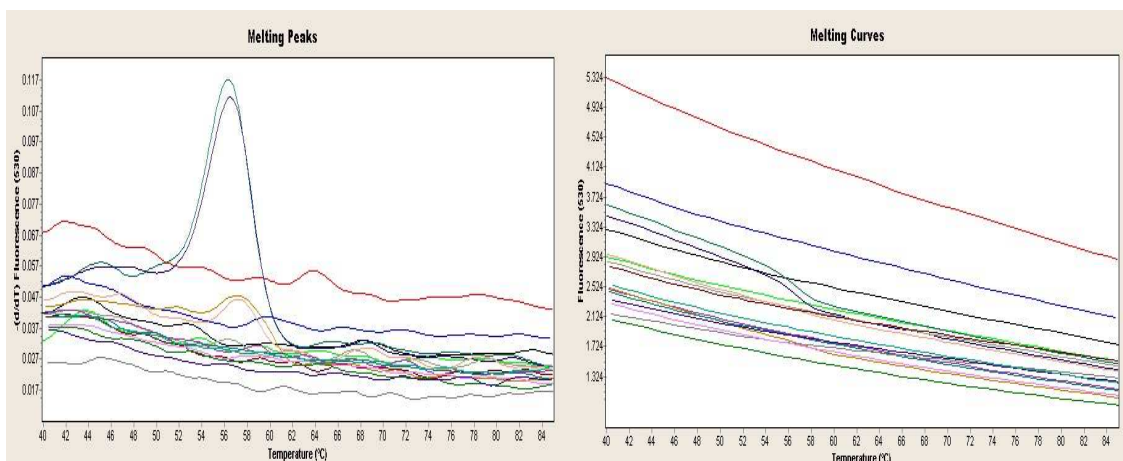
Ryc. nr 9.31. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs1722279: próby nr 26, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 46, 47, 51, 52, 62, 63, 66, 68 i 71.



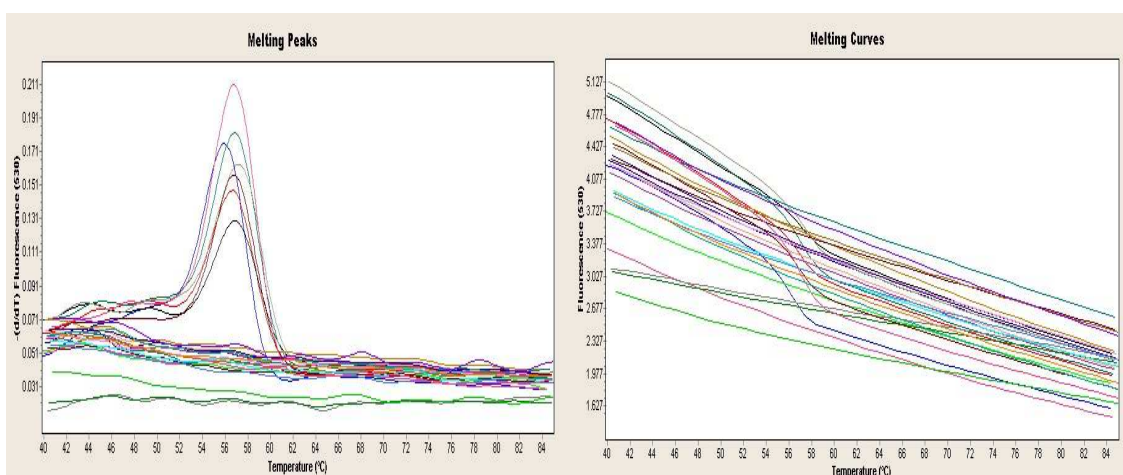
Ryc. nr 9.32. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs1722279: próby nr 40, 73, 74 i 81.



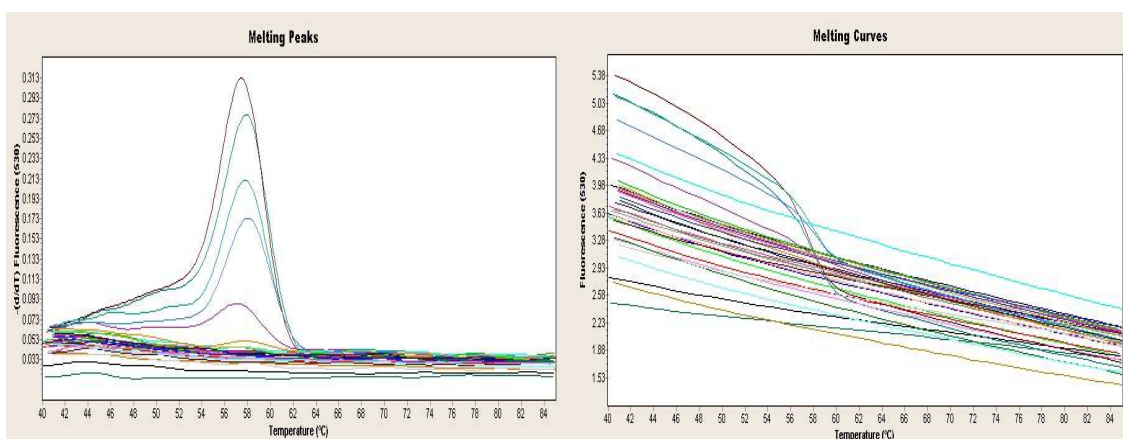
Ryc. nr 9.33. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs1722279: próby nr 82, 85, 86, 105, 107 i 108.



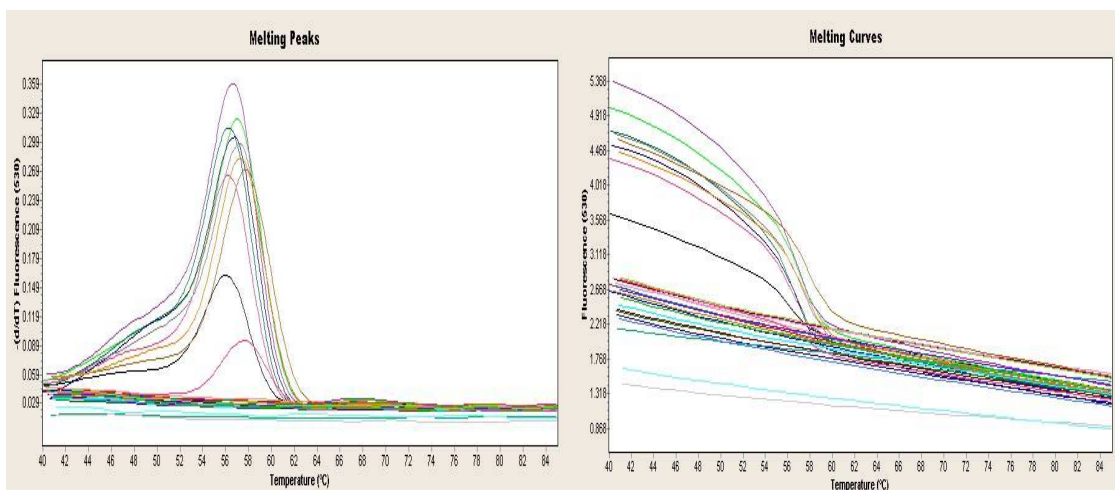
Ryc. nr 9.34. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604: próby nr 1, 4, 5, 7 i 9.



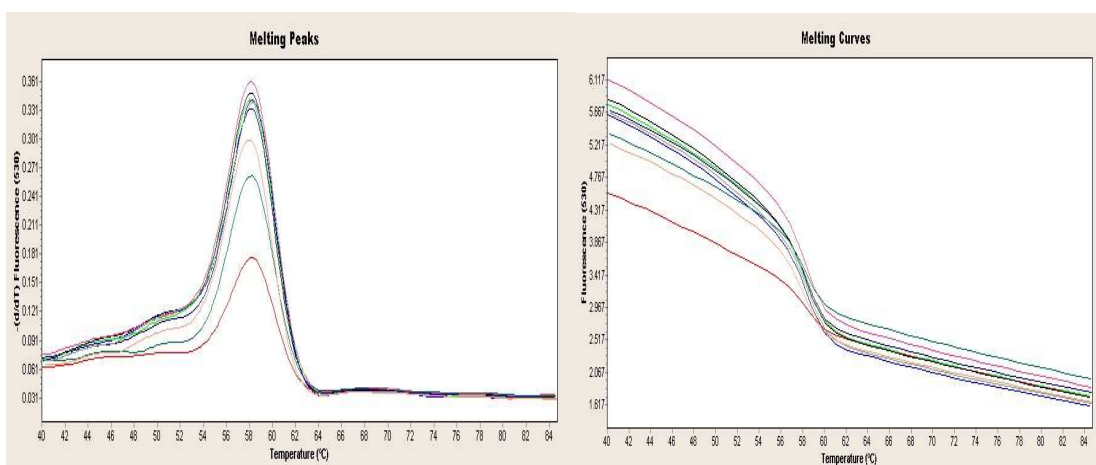
Ryc. nr 9.35. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604: próby nr 11, 12, 14, 15, 18, 20 i 23.



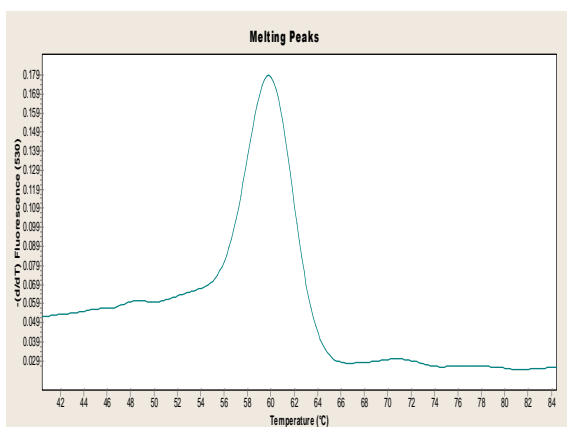
Ryc. nr 9.36. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604: próby nr 26, 27, 33, 35, 36, 37 i 38.



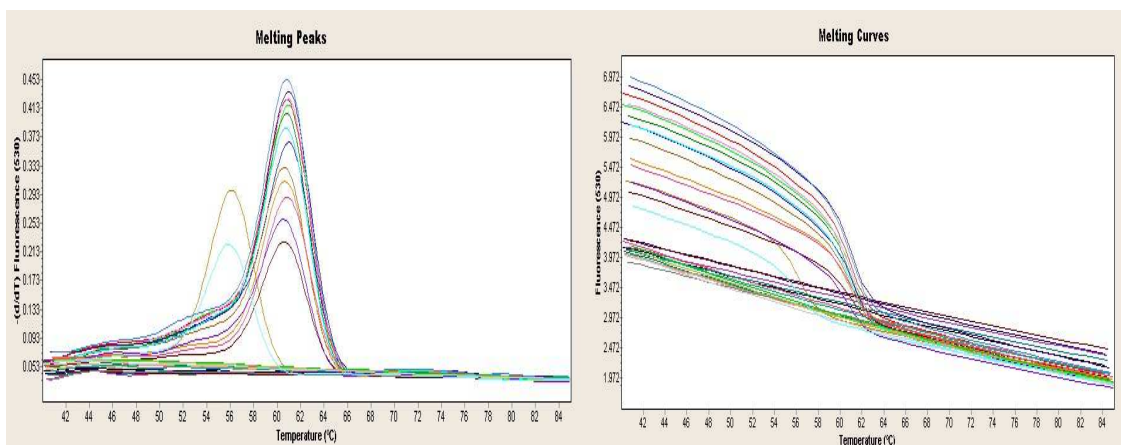
Ryc. nr 9.37. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane podczas badania przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604: próby nr 39, 40, 46, 47, 51, 52, 62, 63, 66, 68, 71, 73 i 74.



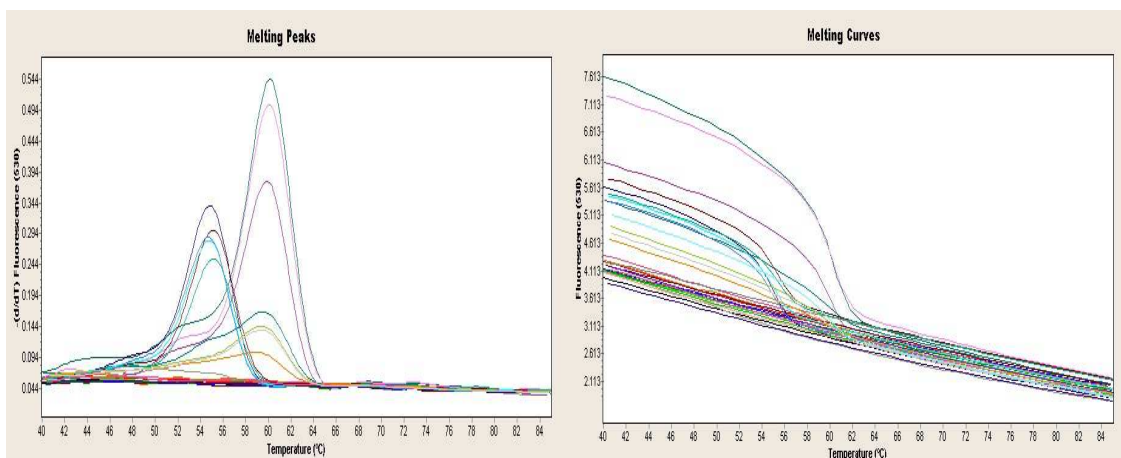
Ryc. nr 9.38. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604 podczas badania próby nr 81, 82, 83, 85, 86, 92, 93, 94, 96, 105 i 107.



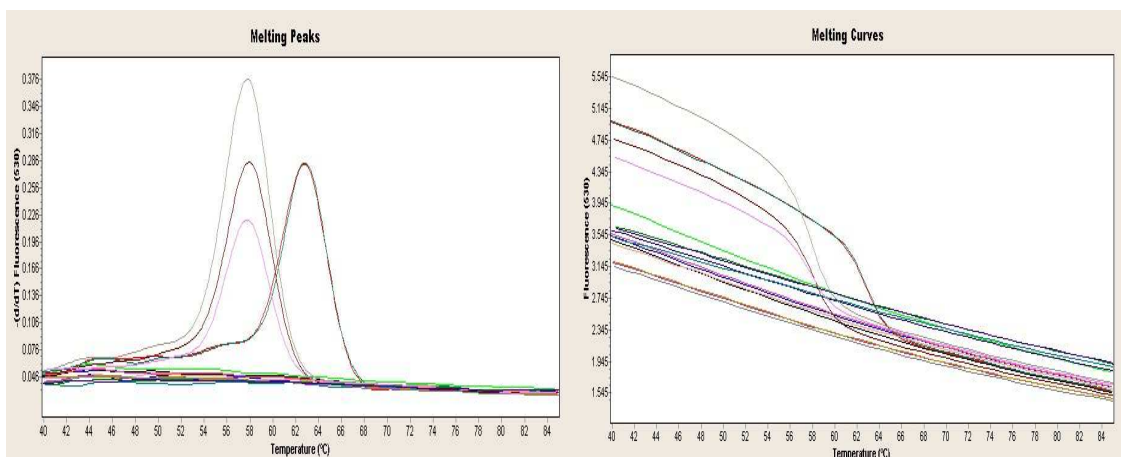
Ryc. nr 9.39. Temperatura topnienia uzyskana przy zastosowaniu LightSNiP - rs2032604 podczas badania próby nr: 108.



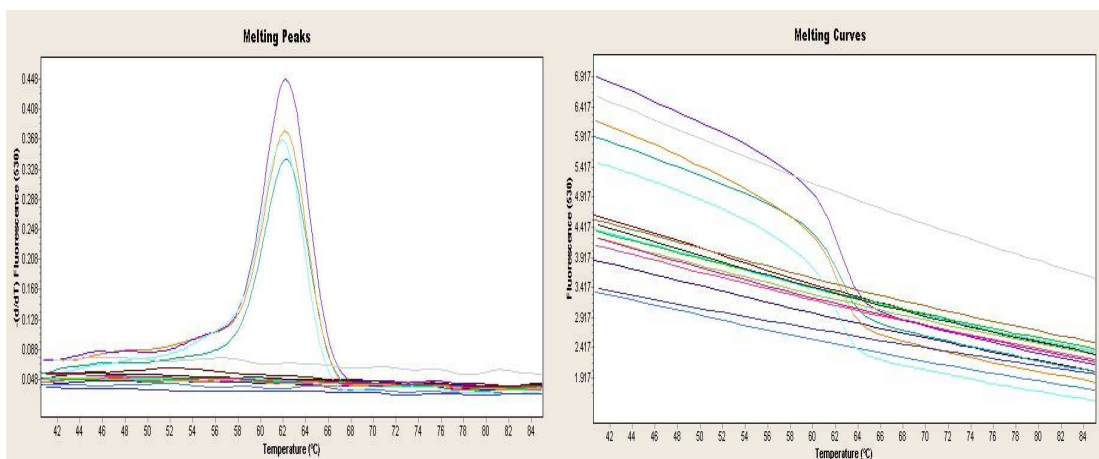
Ryc. nr 9.40. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP – rs17315821 podczas badania próby nr 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 23, 26, 27 i 33.



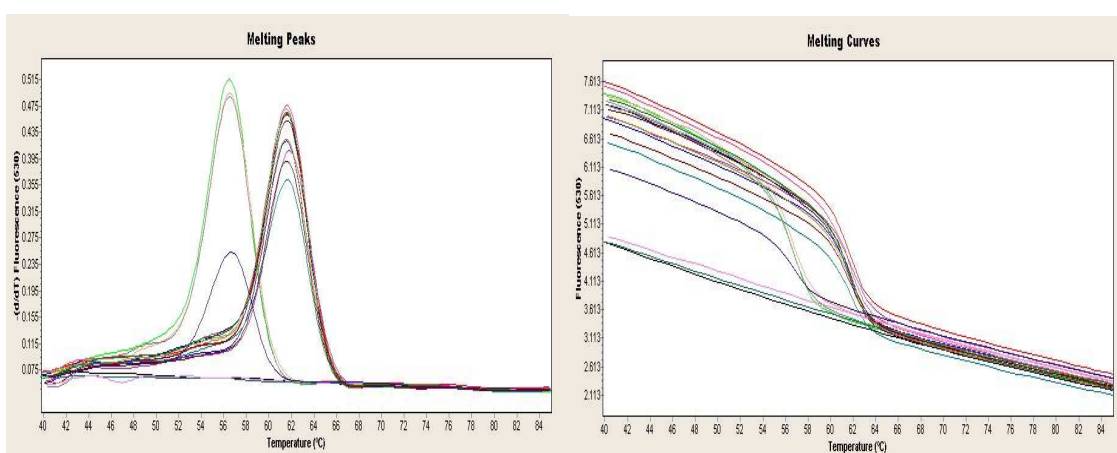
Ryc. nr 9.41. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP – rs17315821 podczas badania próby nr 35, 36, 37, 38, 39, 40, 46, 47, 51, 52, 57, 58, 62, 63, 66 i 68.



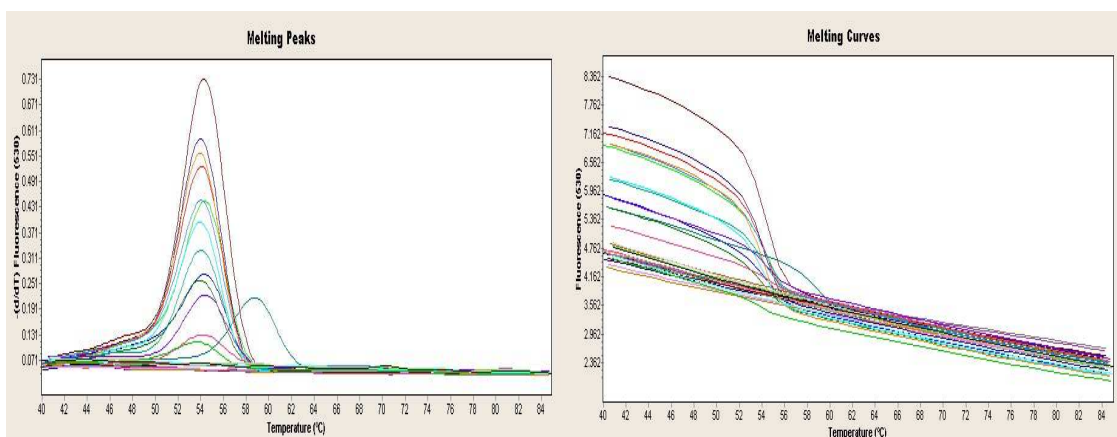
Ryc. nr 9.42. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP – rs17315821 podczas badania próby nr 71, 73, 74, 81, 92 i 93.



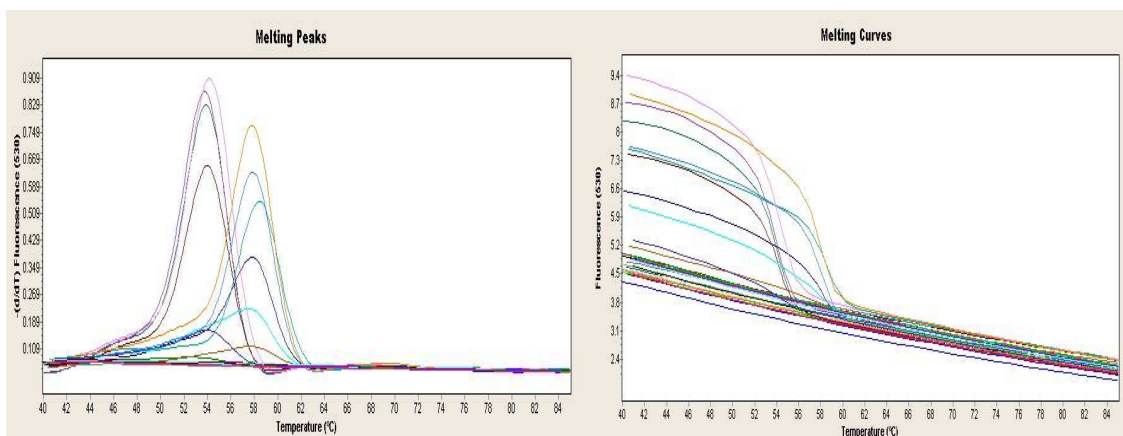
Ryc. nr 9.43. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNIp – rs17315821 podczas badania próby nr 82, 83, 85, 86, 89 i 90.



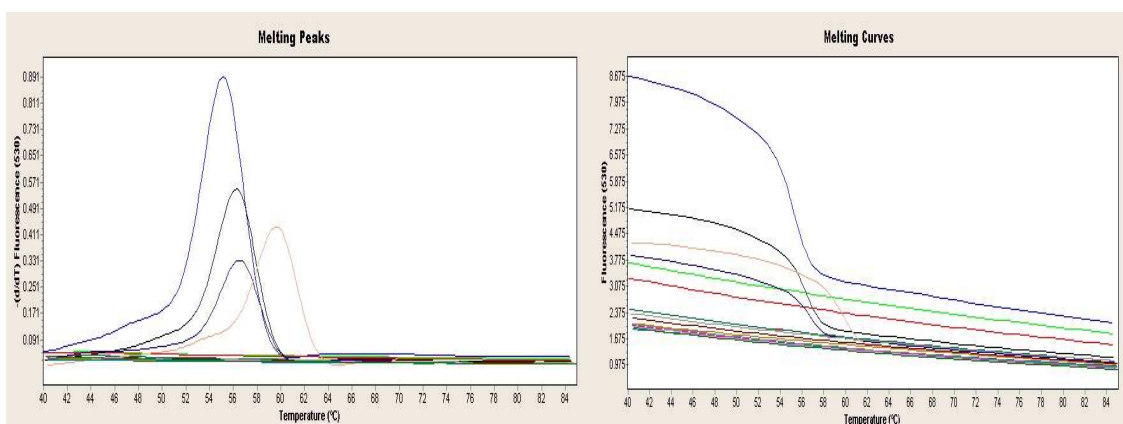
Ryc. nr 9.44. Temperatury oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNIp – rs17315821 podczas badania próby nr 94, 95, 96, 102, 103, 104, 105, 107 i 108.



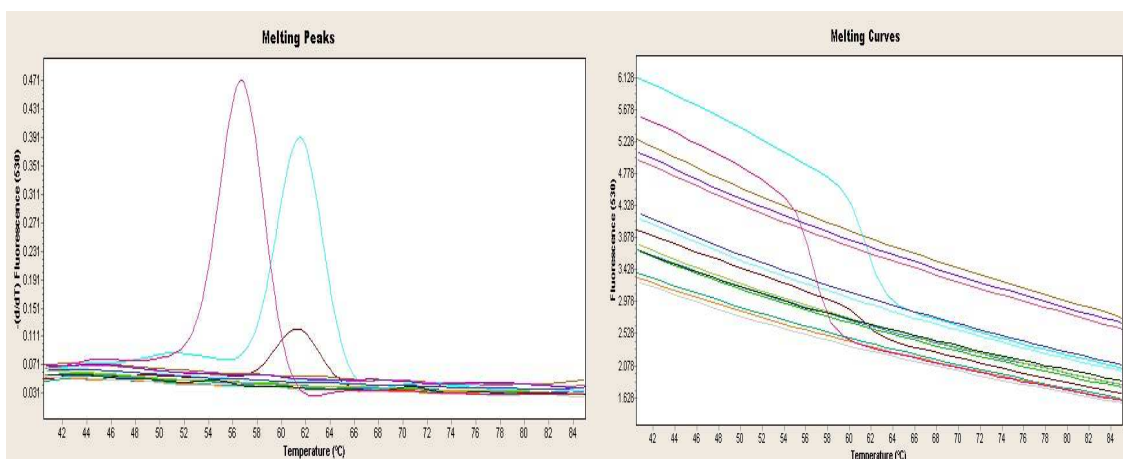
Ryc. nr 9.45. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNIp – rs17306671 podczas badania próby nr 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 23, 26, 27 i 33.



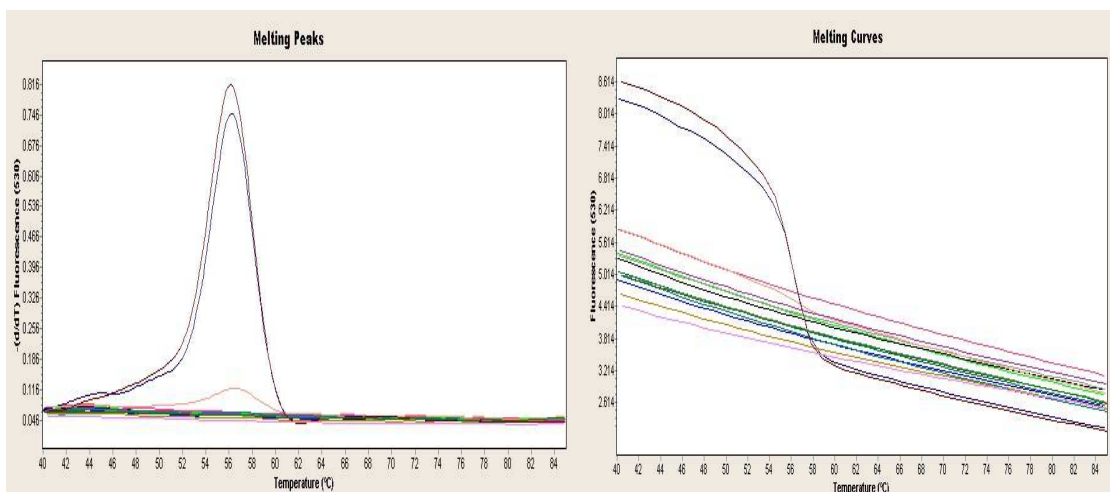
Ryc. nr 9.46. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP-rs17306671 podczas badania próby nr 35, 36, 37, 38, 39, 40, 46, 47, 51, 52, 62, 63, 66 i 68.



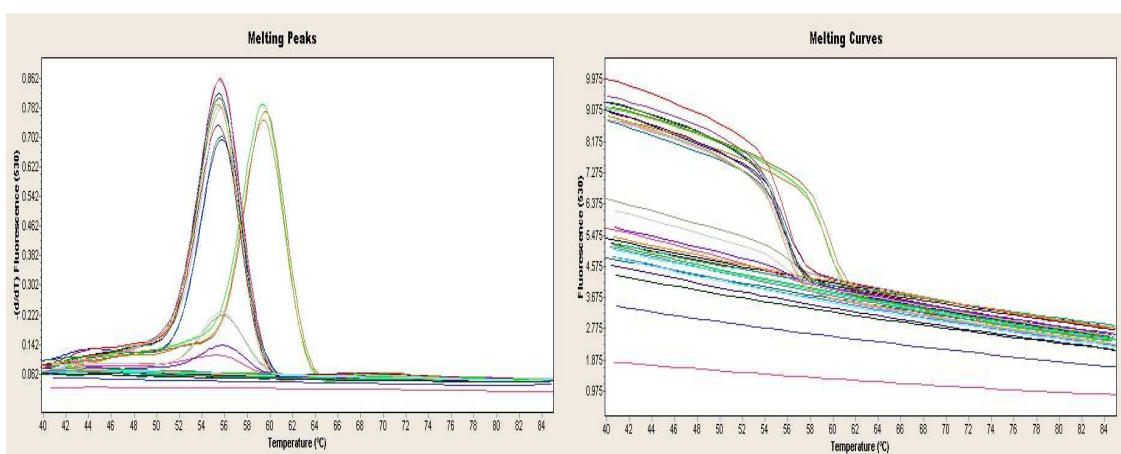
Ryc. nr 9.47. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP-rs17306671 podczas badania próby nr 71, 73, 74 i 81.



Ryc. nr 9.48. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP-rs17306671 podczas badania próby nr 82, 83 i 85.

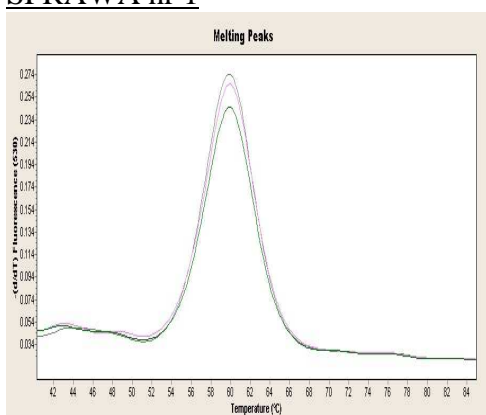


Ryc. nr 9.49. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP-rs17306671 podczas badania próby nr 86, 89 i 90.

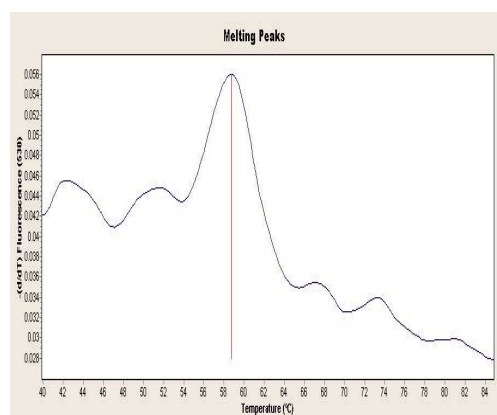


Ryc. nr 9.50. Temperatura oraz krzywe topnienia uzyskane przy zastosowaniu LightSNiP-rs17306671 podczas badania próby nr 92, 93, 94, 95, 102, 103, 104, 105, 107 i 108.

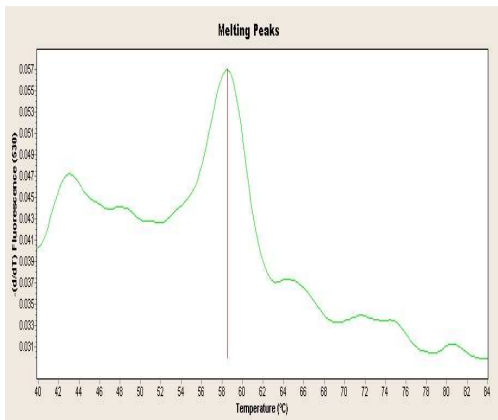
SPRAWA nr 1



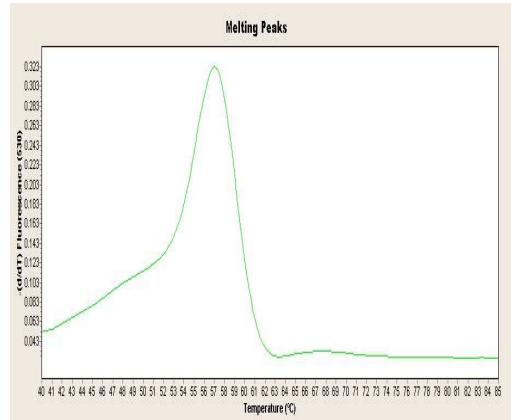
Ryc. nr 9.51. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs11553055.



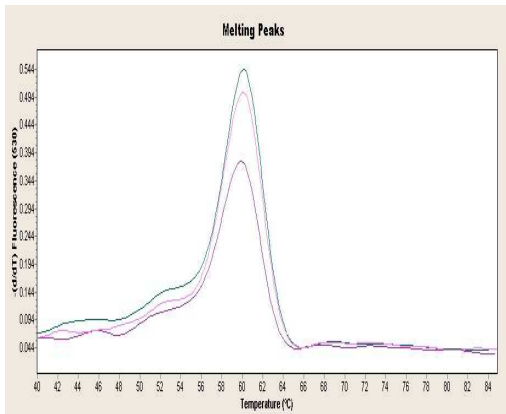
Ryc. nr 9.52. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs3900.



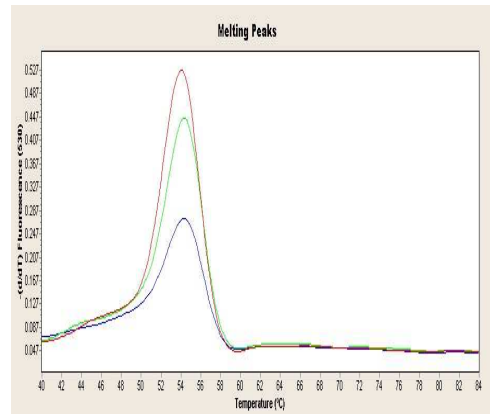
Ryc. nr 9.53. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs3900.



Ryc. nr 9.54. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs2032604.

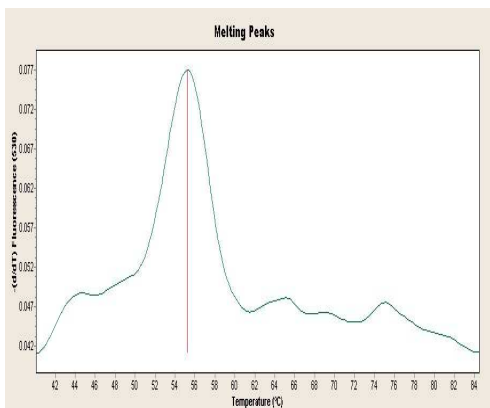


Ryc. nr 9.55. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs17315821.

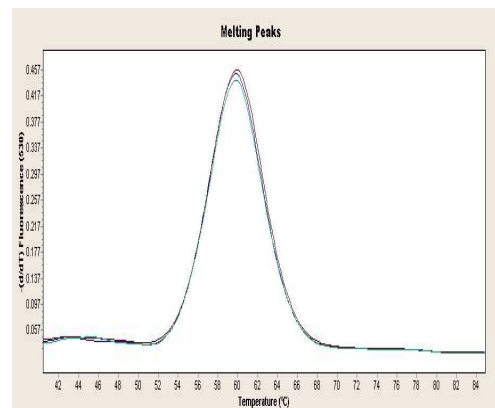


Ryc. nr 9.56. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs17306671.

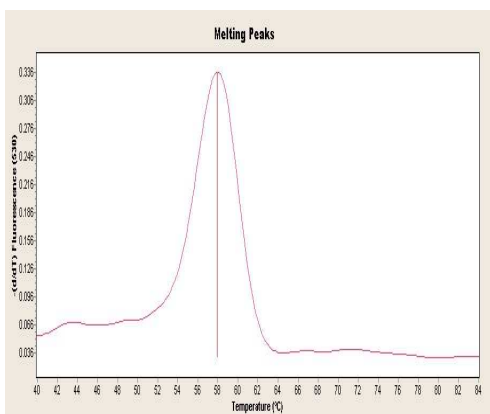
SPRAWA nr 2



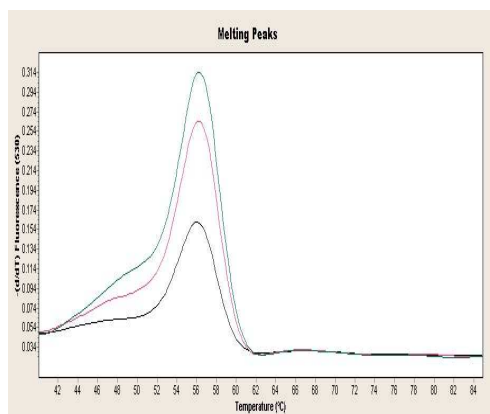
Ryc. nr 9.57. Tm uzyskana podczas badania materiału porównawczego – C z rs344442126.



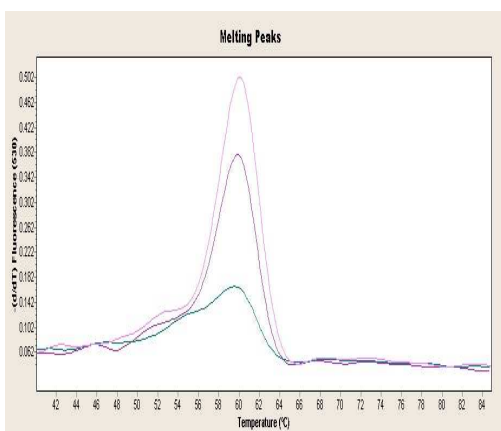
Ryc. nr 9.58. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs11553055.



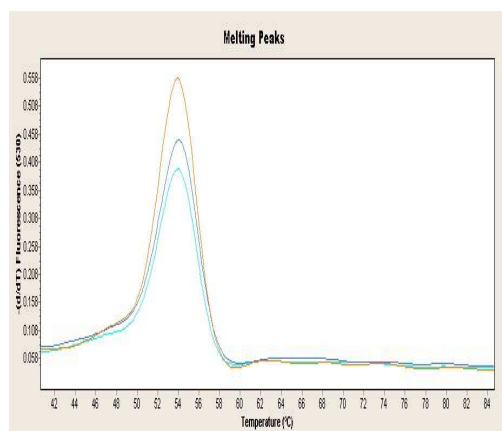
Ryc. nr 9.59. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



Ryc. nr 9.60. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs2032604.

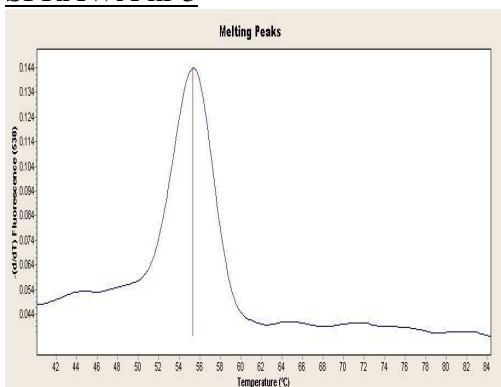


Ryc. nr 9.61. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17315821.

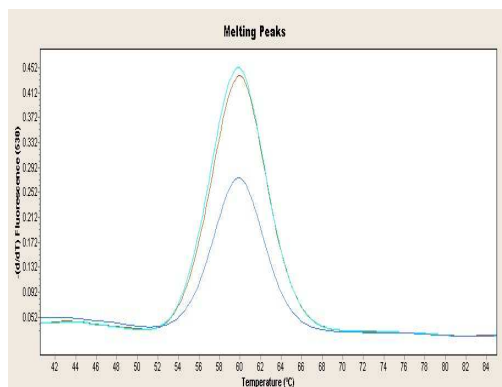


Ryc. nr 9.62. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17306671.

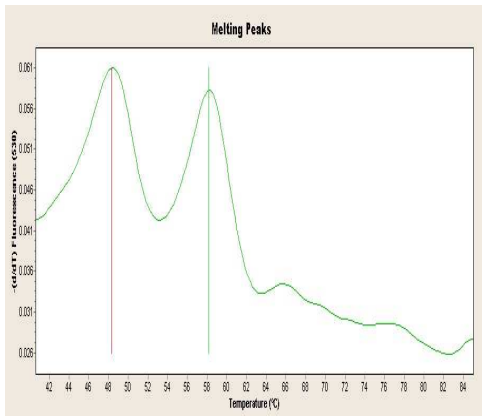
SPRAWA nr 3



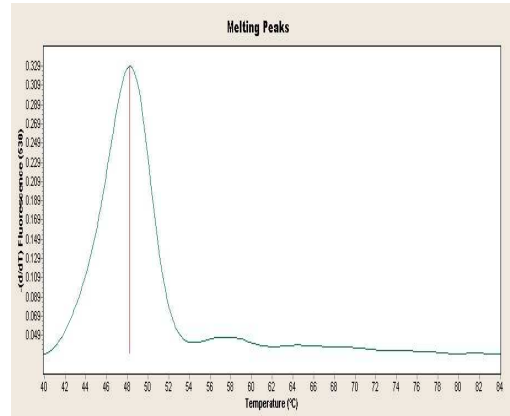
Ryc. nr 9.63. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs34442126.



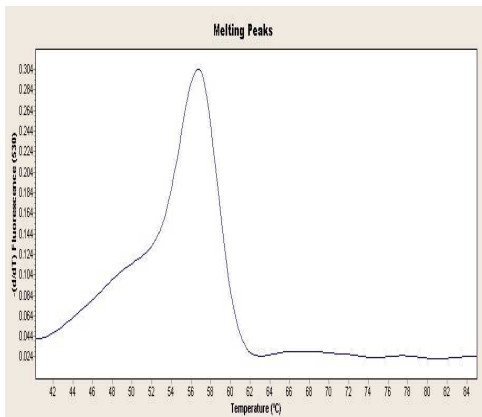
Ryc. nr 9.64. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs11553055.



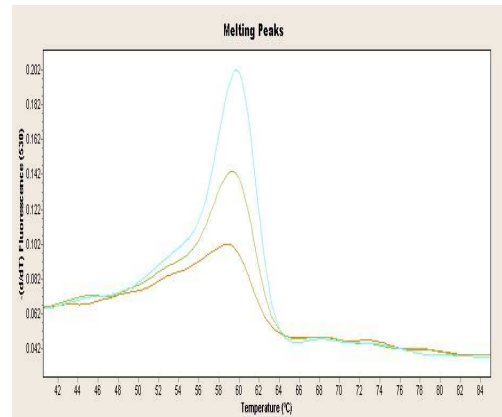
Ryc. nr 9.65. Tm uzyskane podczas badania próby A z rs3900. Dwie temperatury topnienia.



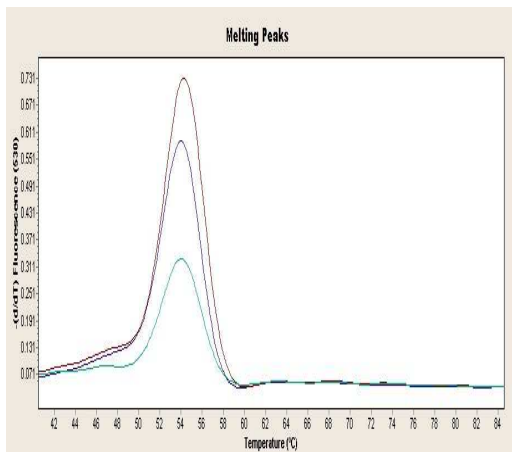
Ryc. nr 9.66. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



Ryc. nr 9.67. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs2032604.

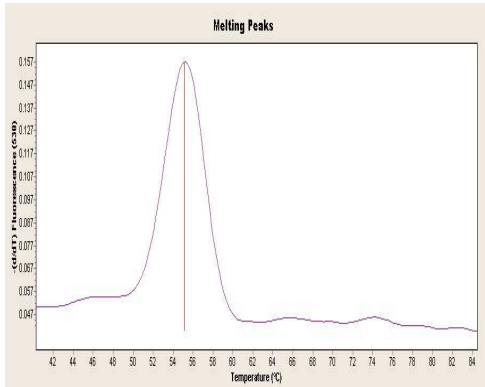


Ryc. nr 9.68. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17315821.

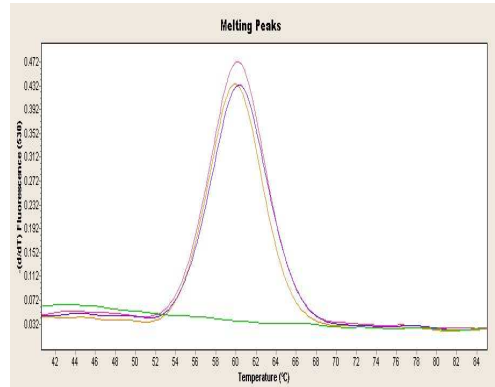


Ryc. nr 9.69. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17306671.

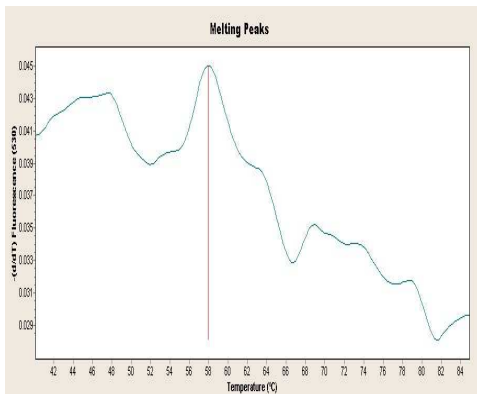
SPRAWA nr 4



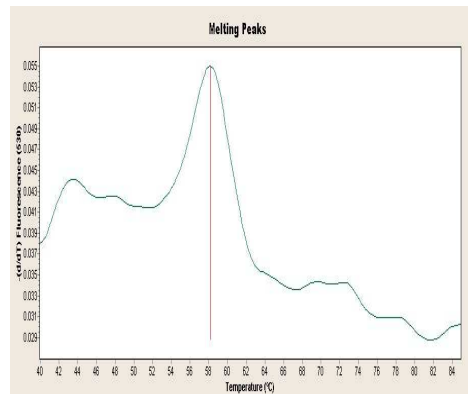
Ryc. nr 9.70. Tm uzyskana podczas badania próby D z rs34442126.



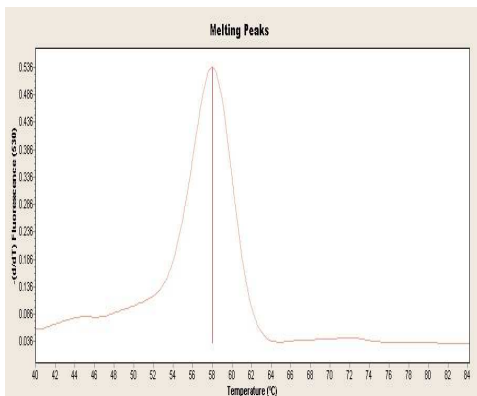
Ryc. nr 9.71. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i D z rs11553055.



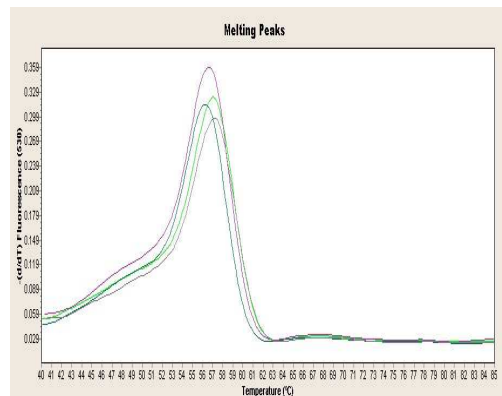
Ryc. nr 9.72. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs3900.



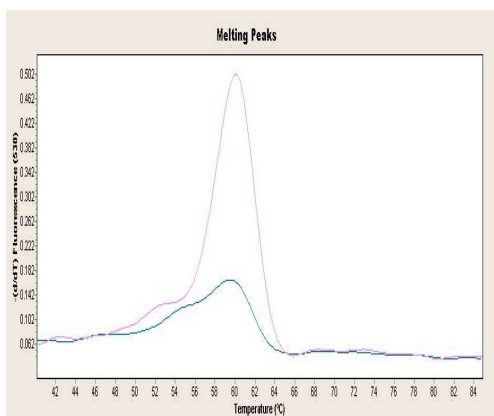
Ryc. nr 9.73. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



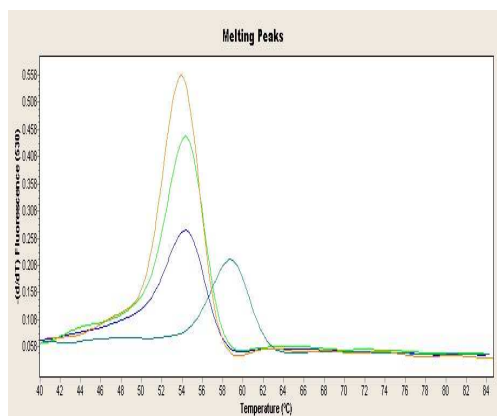
Ryc. nr 9.74. Tm uzyskana podczas badania próby D z rs3900.



Ryc. nr 9.75. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C i D z rs2032604

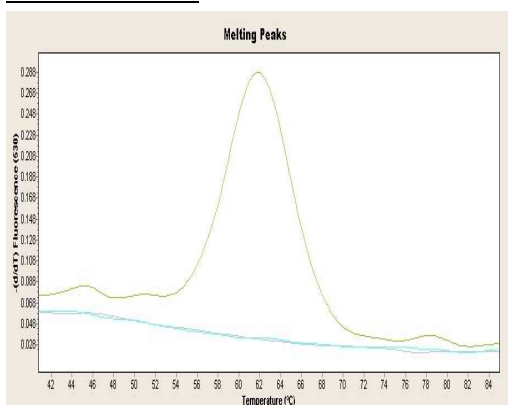


Ryc. nr 9.76. Tm uzyskane podczas badania prób B i D z rs17315821.

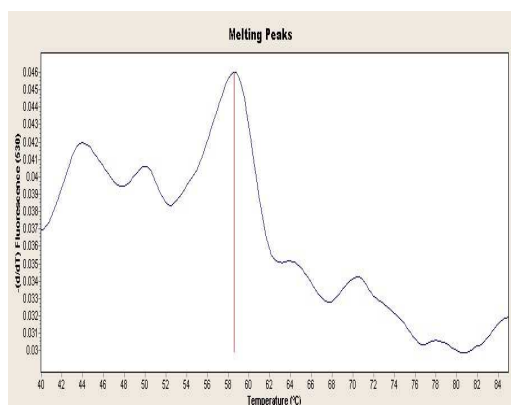


Ryc. nr 9.77. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C i D z rs17306671.

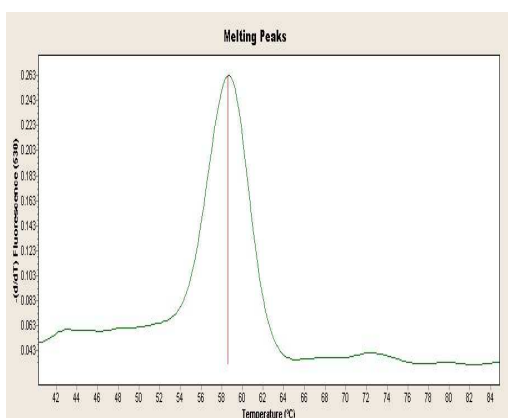
SPRAWA nr 5



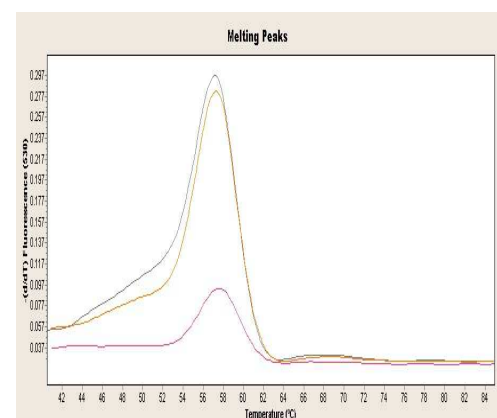
Ryc. nr 9.78. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs11553055.



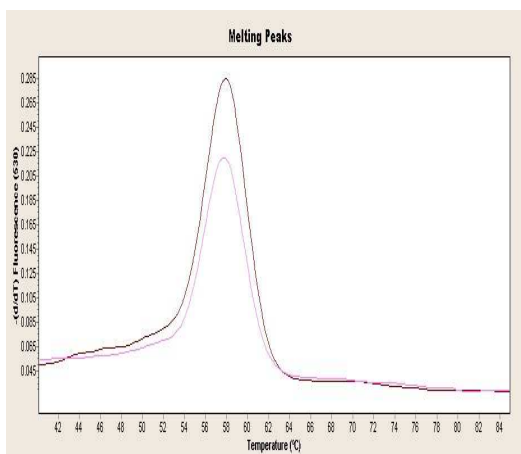
Ryc. nr 9.79. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs3900.



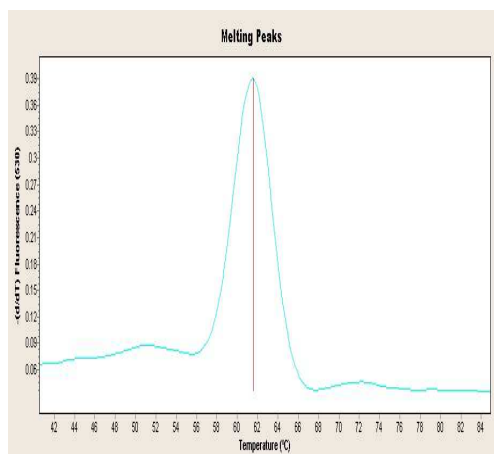
Ryc. nr 9.80. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



Ryc. nr 9.81. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs2032604.

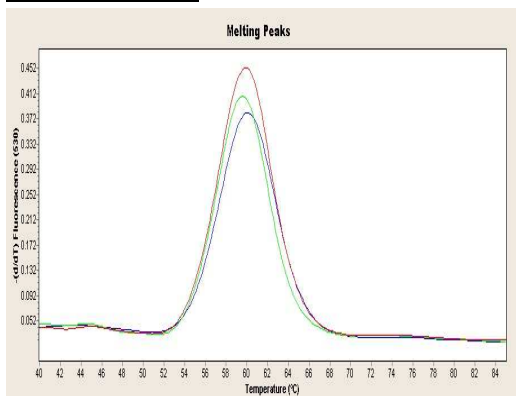


Ryc. nr 9.82. Tm uzyskane podczas badania prób A i C z rs17315821.

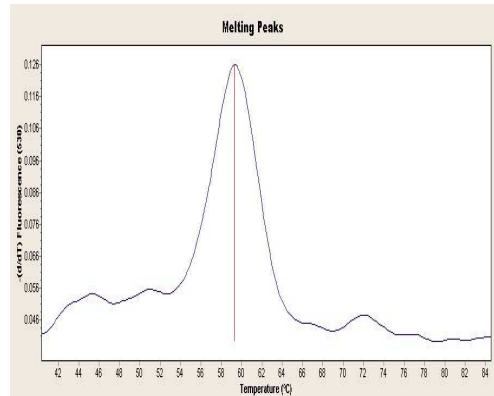


Ryc. nr 9.83. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs17306671.

SPRAWA nr 6

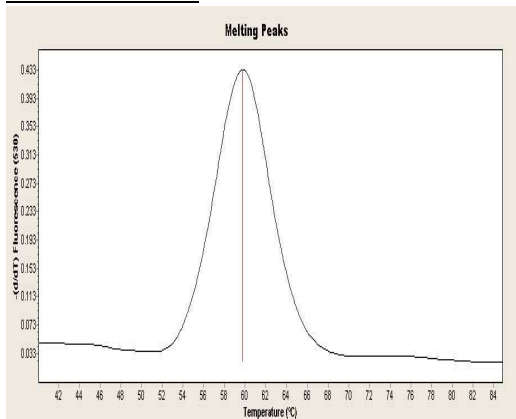


Ryc. nr 9.84. Tm uzyskane podczas badania prób A, B i C z rs11553055

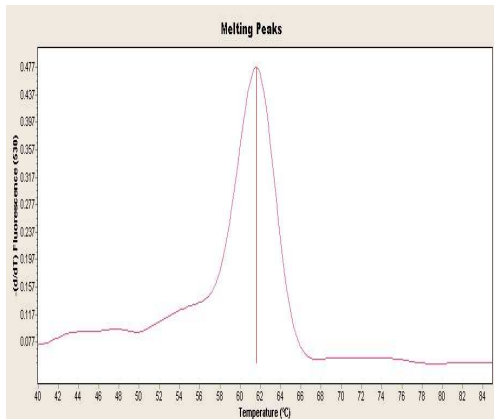


Ryc. nr 9.85. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs3900.

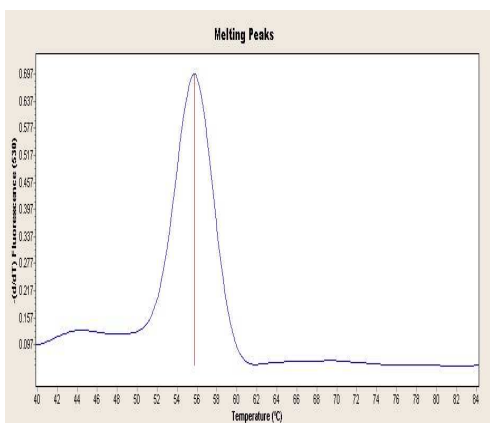
SPRAWA nr 7



Ryc. nr 9.86. Tm uzyskana podczas badania wymazów z pochwy z rs11553055.

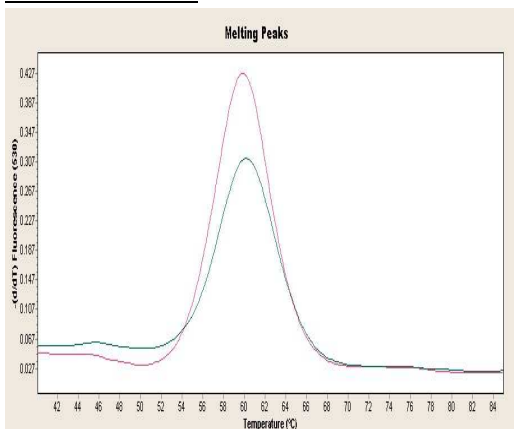


Ryc. nr 9.87. Tm uzyskana podczas badania wymazów z pochwy z rs17315821.

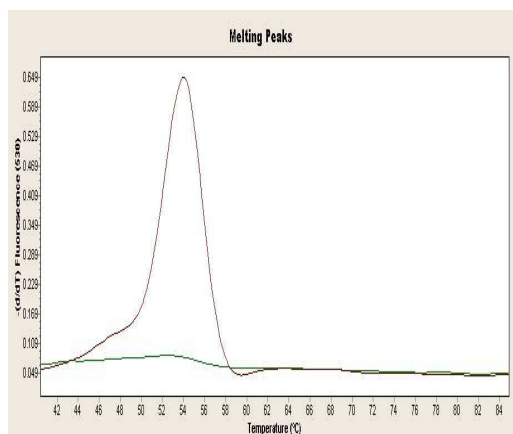


Ryc. nr 9.88. Tm uzyskana podczas badania wymazów z pochwy z rs17306671.

SPRAWA nr 8

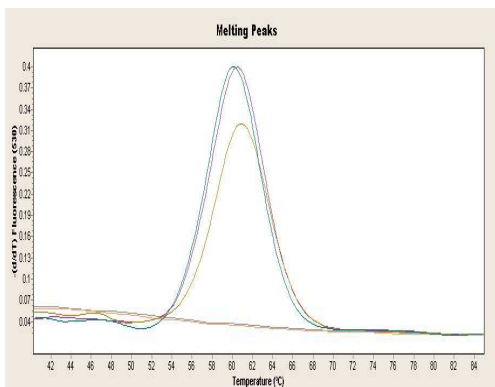


Ryc. nr 9.89. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs11553055.

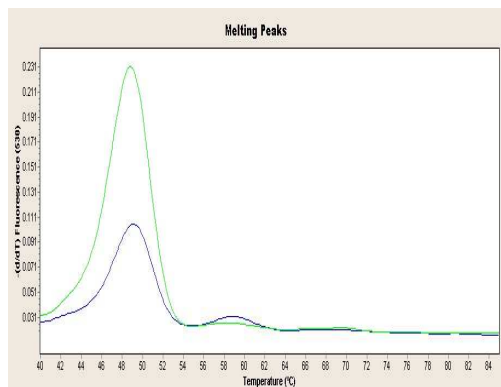


Ryc. nr 9.90. Tm uzyskane podczas badania wymazu z pochwy A i B z rs17306671.

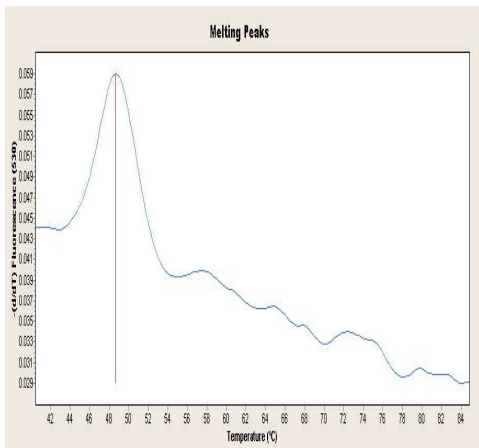
SPRAWA nr 9



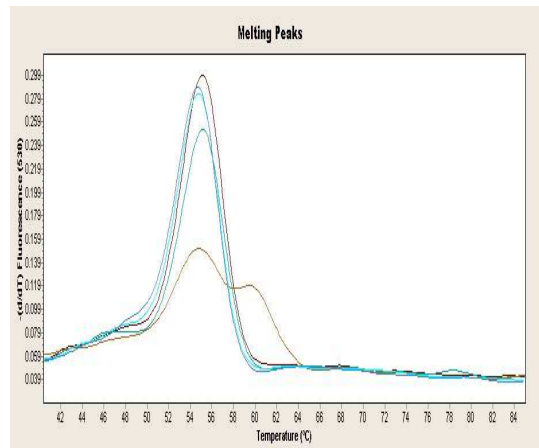
Ryc. nr 9.91. Tm uzyskane podczas badania prób C, D i E z rs11553055.



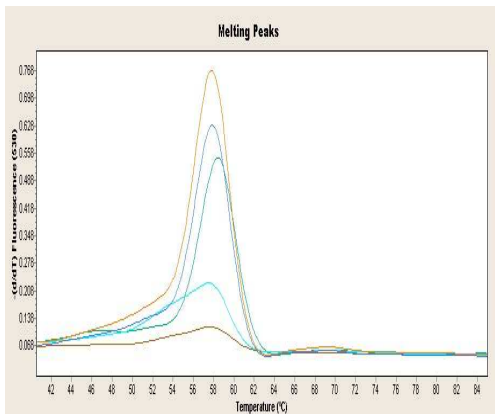
Ryc. nr 9.92. Tm uzyskane podczas badania prób C i D z rs3900. W próbie D wykazano dwie temperatury topnienia



Ryc. nr 9.93. Tm uzyskana podczas badania próby E z rs3900.

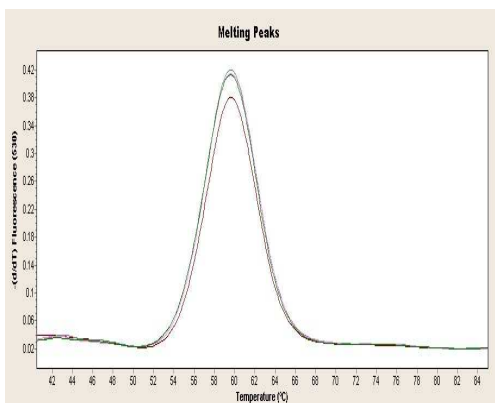


Ryc. nr 9.94. Tm uzyskane podczas badania próby A, B, C, D i E z rs17315821. W próbce D wykazano dwie temperatury topnienia

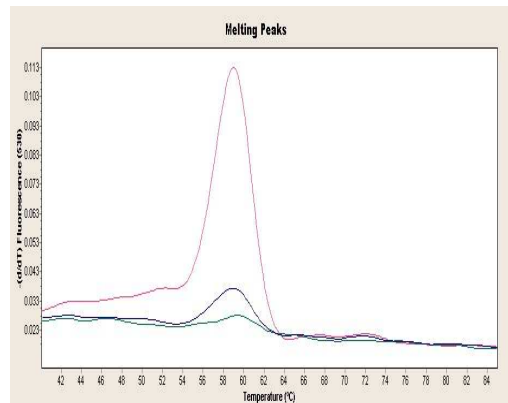


Ryc. nr 9.95. Tm uzyskane podczas badania próby A, B, C, D i E z rs17306671.

SPRAWA nr 10

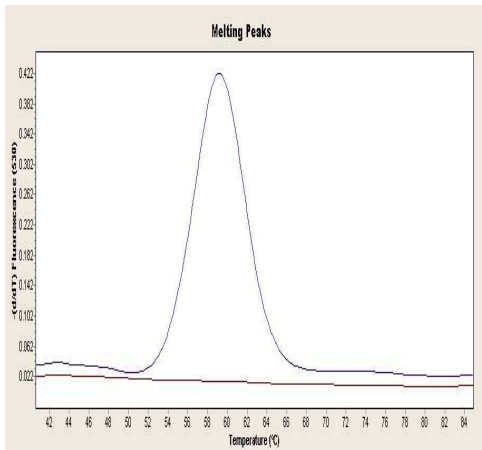


Ryc. nr 9.96. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C i D z rs11553055.

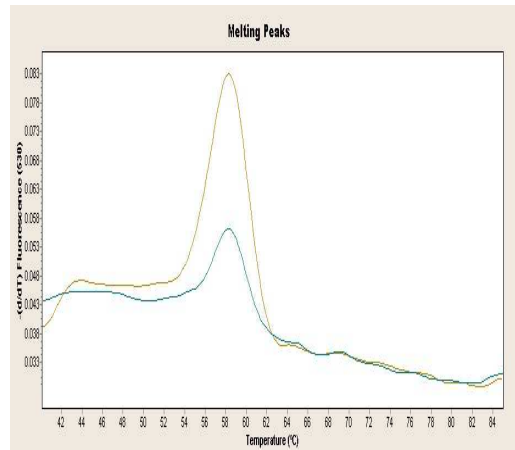


Ryc. nr 9.97. Tm uzyskane podczas badania prób A, C i D z rs3900.

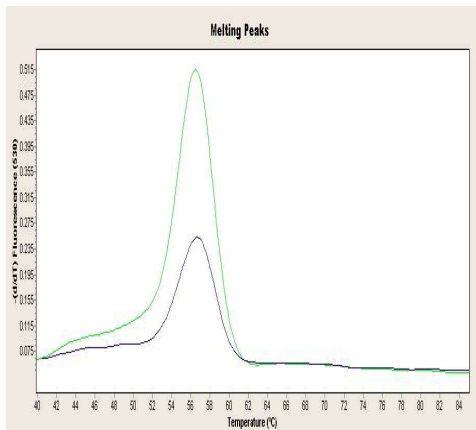
SPRAWA nr 11



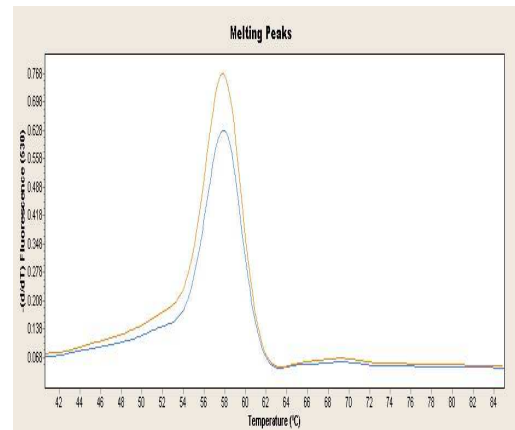
Ryc. nr 9.98. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs11553055.



Ryc. nr 9.99. Tm uzyskane podczas badania próby A i B z rs3900.

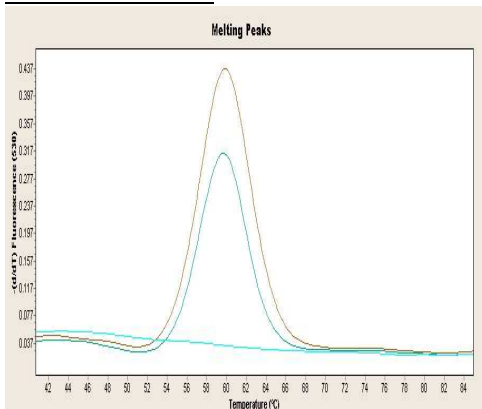


Ryc. nr 9.100. Tm uzyskane podczas badania próby A i B z

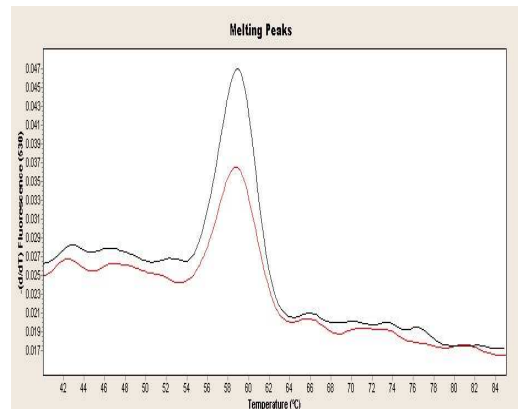


Ryc. nr 9.101. Tm uzyskane podczas badania próby A i B z rs17306671.

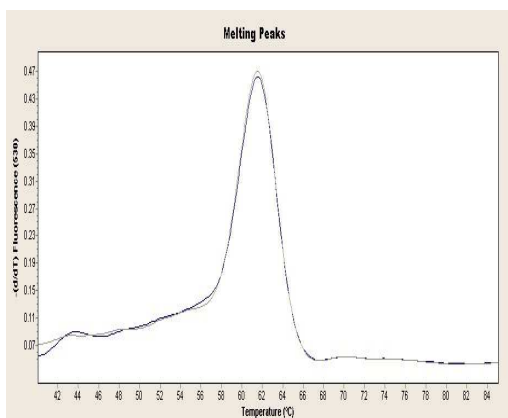
SPRAWA nr 12



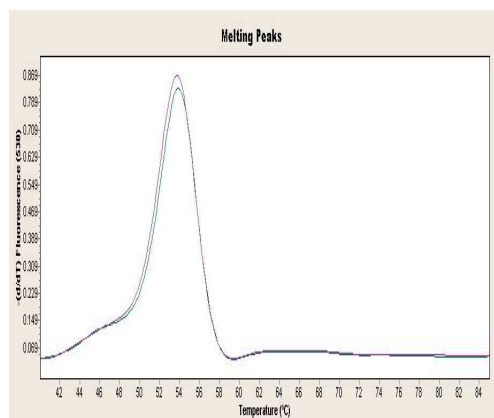
Ryc. nr 9.102. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs11553055.



Ryc. nr 9.103. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs3900.

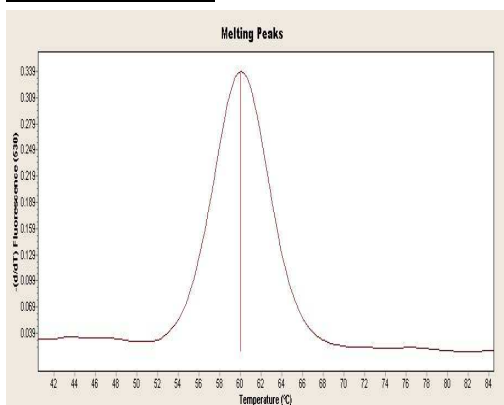


Ryc. nr 9.104. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z 17315821.

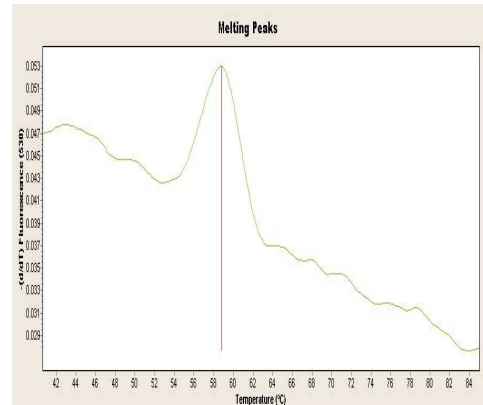


Ryc. nr 9.105. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z 17306671.

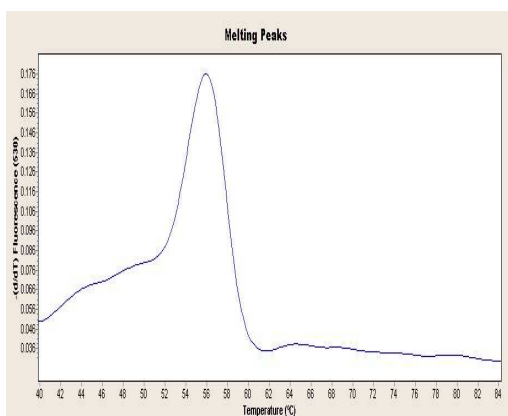
SPRAWA nr 13



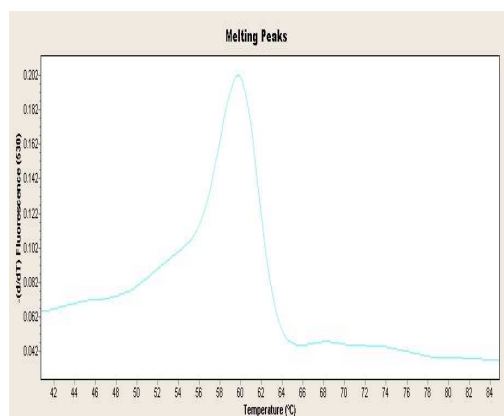
Ryc. nr 9.106. Tm uzyskana podczas badania próby ze sprawy 13 z rs11553055.



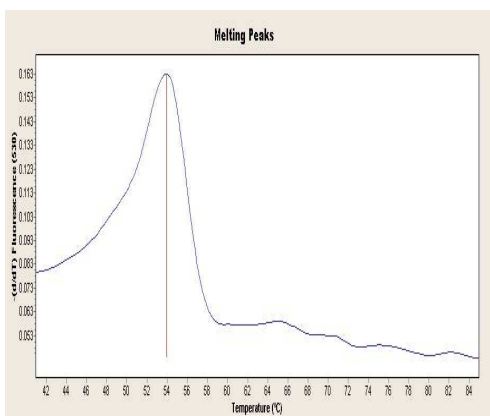
Ryc. nr 9.107. Tm uzyskana podczas badania próby ze sprawy 13 z rs3900.



Ryc. nr 9.108. Tm uzyskana podczas badania próby ze sprawy 13 z rs2032604.

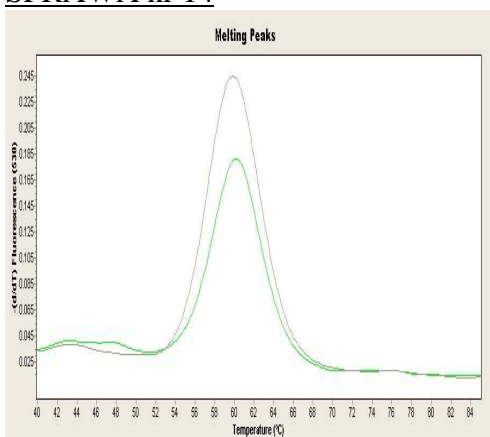


Ryc. nr 9.109. Tm uzyskana podczas badania próby ze sprawy 13 z rs17315821.

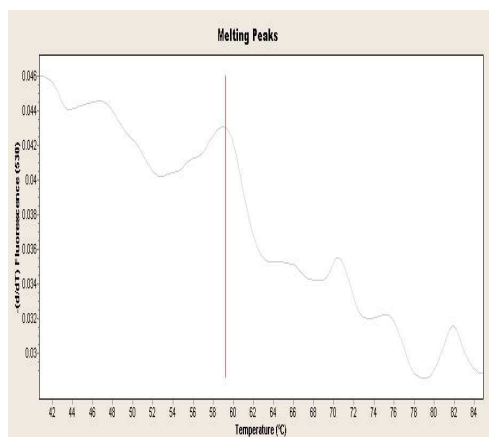


Ryc. nr 9.110. Tm uzyskana podczas badania próby ze sprawy 13 z rs17306671.

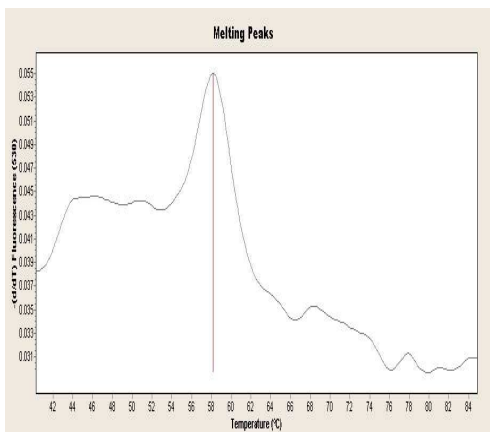
SPRAWA nr 14



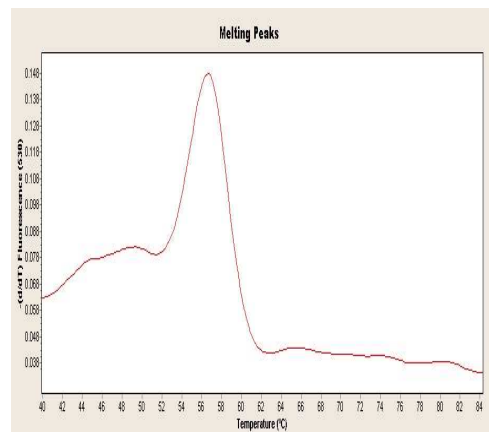
Ryc. nr 9.111. Tm uzyskane podczas badania prób B i C z rs11553055.



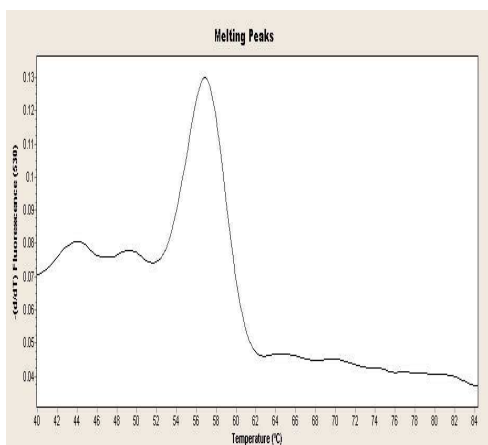
Ryc. nr 9.112. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs3900.



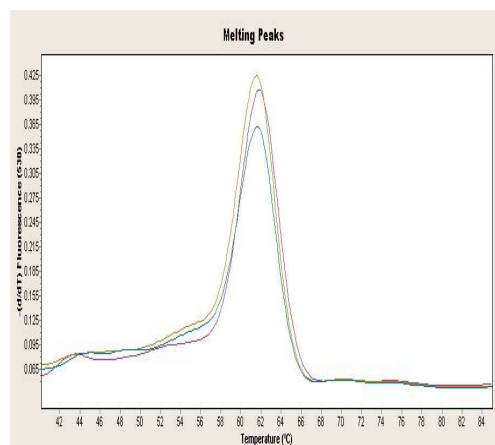
Ryc. nr 9.113. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



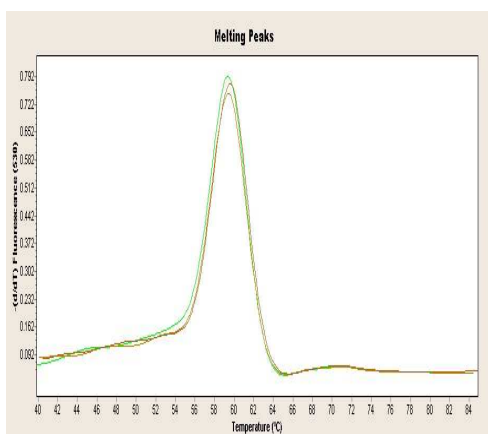
Ryc. nr 9.114. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs2032604.



Ryc. nr 9.115. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs2032604.

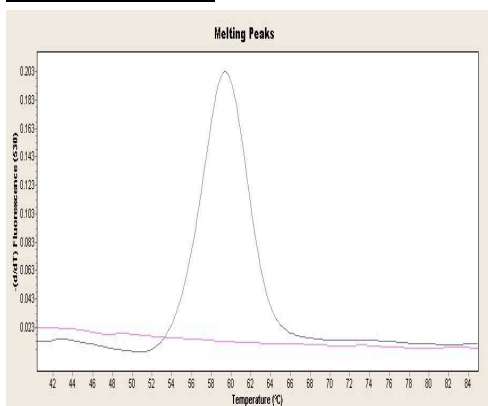


Ryc. nr 9.116. Tm uzyskana podczas badania próby A, B i C z rs17315821.

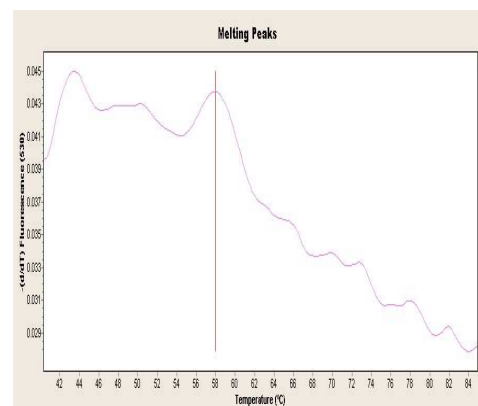


Ryc. nr 9.117. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17306671.

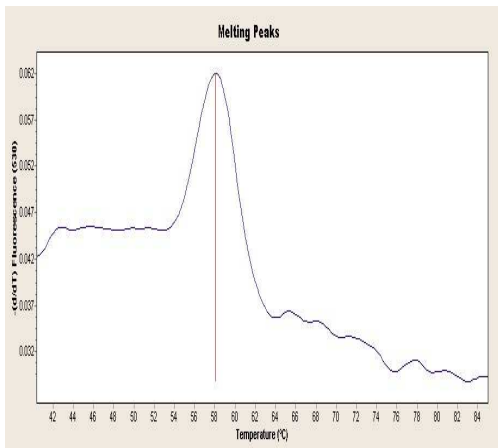
SPRAWA nr 15



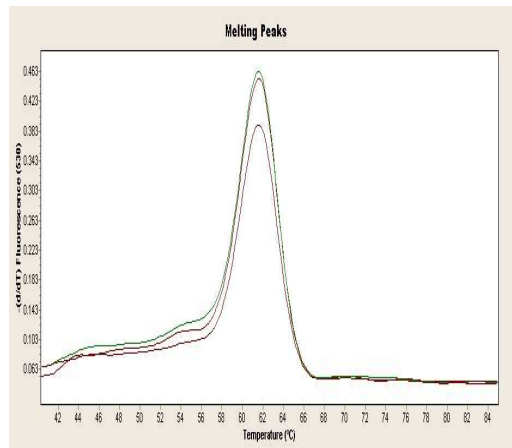
Ryc. nr 9.118. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs11553055.



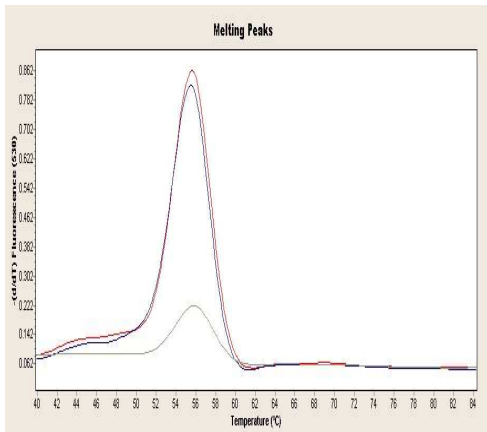
Ryc. nr 9.119. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs3900.



Ryc. nr 9.120. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.

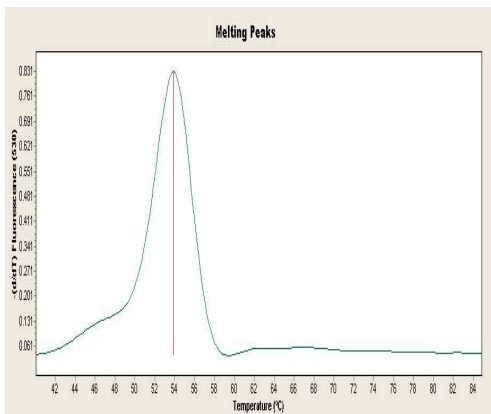


Ryc. nr 9.121. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17315821.



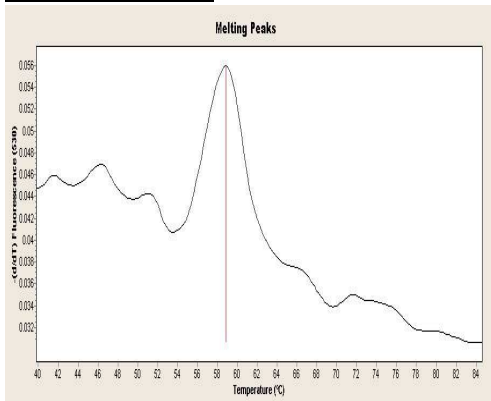
Ryc. nr 9.122. Tm uzyskane podczas badania próby A, B i C z rs17306671.

SPRAWA nr 16

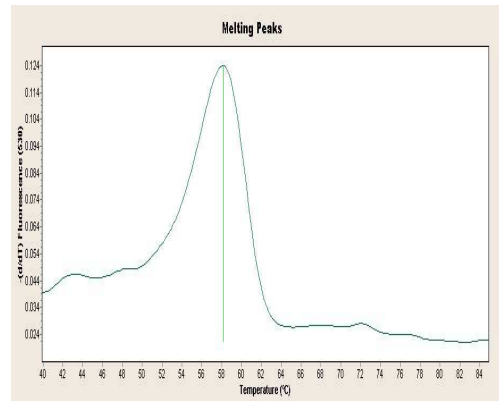


Ryc. nr 9.123. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs17306671.

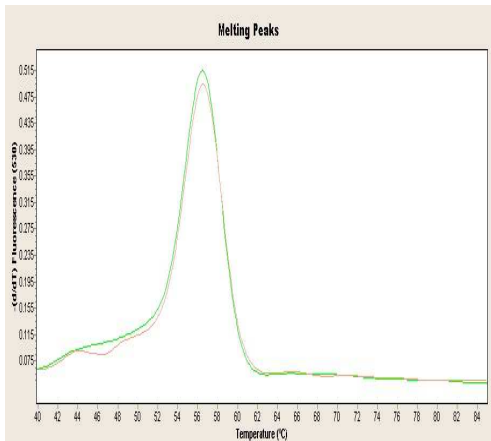
SPRAWA nr 17



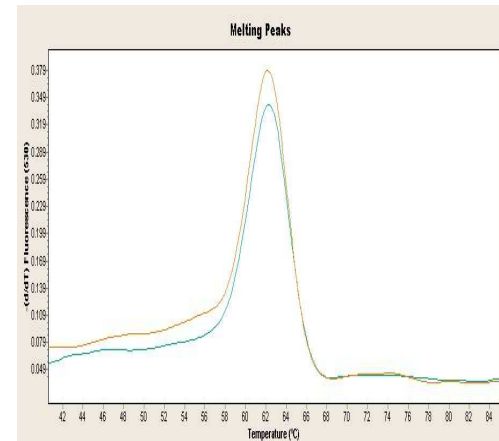
Ryc. nr 9.124. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs3900.



Ryc. nr 9.125. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.

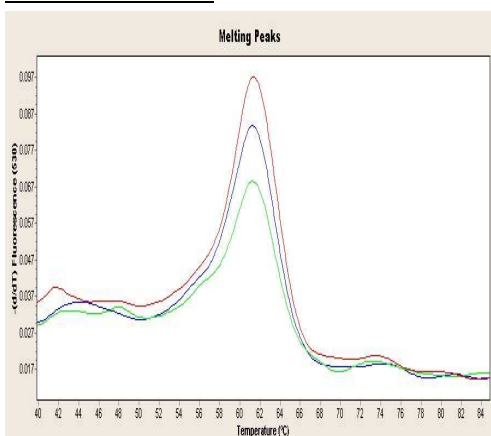


Ryc. nr 9.126. Tm uzyskane podczas badania próby B i C z rs17315821.

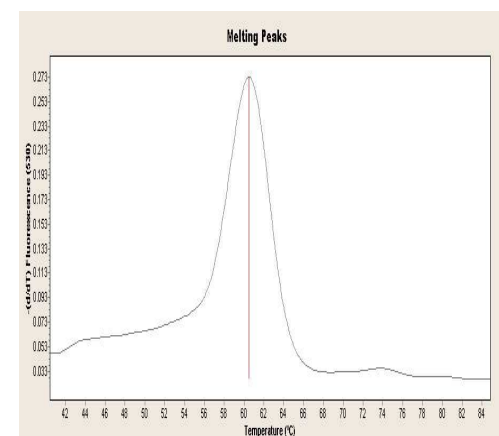


Ryc. nr 9.127. Tm uzyskane podczas badania próby B i C z rs17306671.

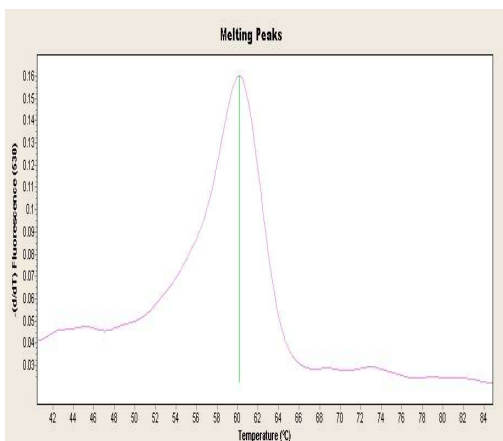
SPRAWA nr 18



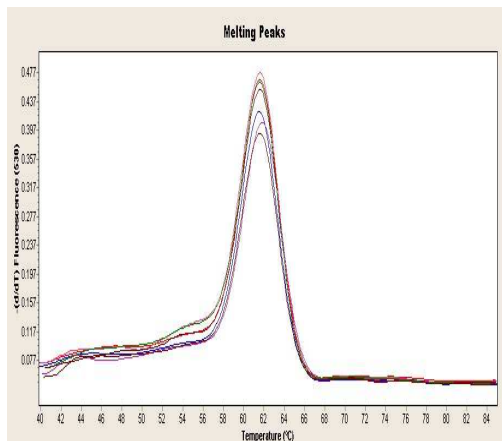
Ryc. nr 9.128. Tm uzyskane podczas analizy prób B, E i G z rs3900.



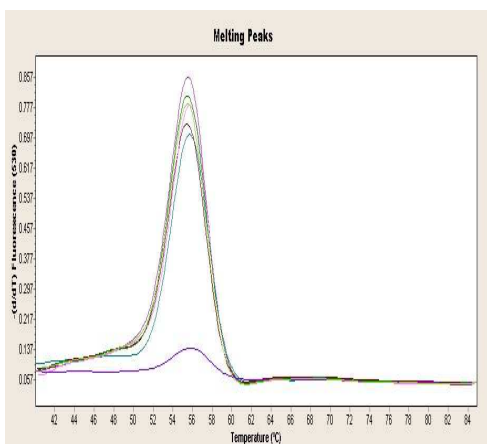
Ryc. nr 9.129. Tm uzyskana podczas analizy próby C z rs3900.



Ryc. nr 9.130. Tm uzyskana podczas analizy próby D z rs3900.

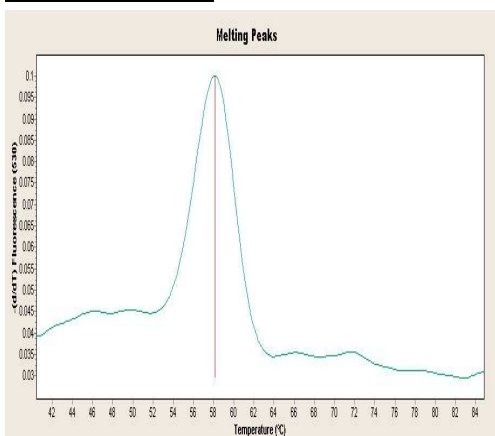


Ryc. nr 9.131. Tm uzyskane podczas analizy próby A, B, C, D, E, F i G z rs17315821.

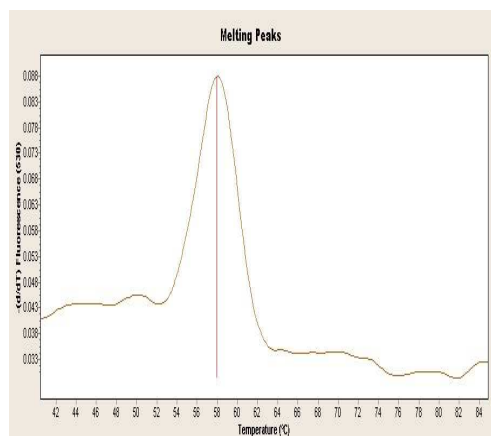


Ryc. nr 9.132. Tm uzyskane podczas analizy próby A, B, C, D, E, F i G z rs17306671.

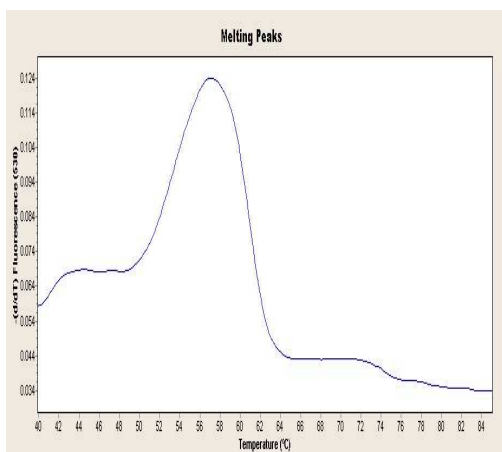
SPRAWA nr 19



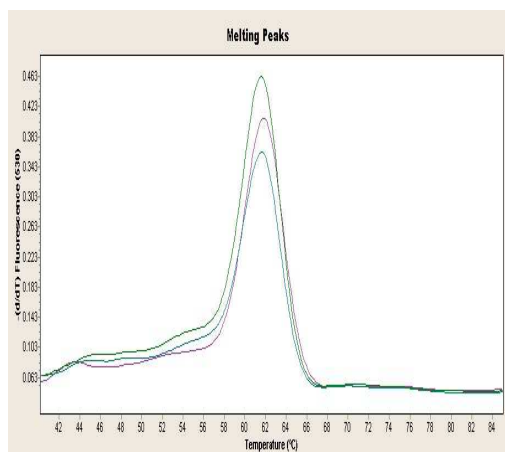
Ryc. nr 9.133. Tm uzyskana podczas badania próby B z rs3900.



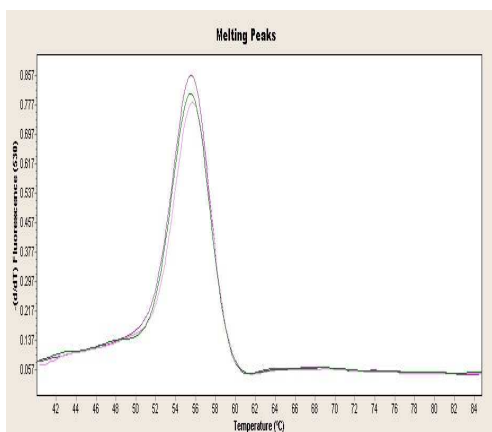
Ryc. nr 9.134. Tm uzyskana podczas badania próby C z rs3900.



Ryc. nr 9.135. Tm uzyskana podczas badania próby A z rs3900.

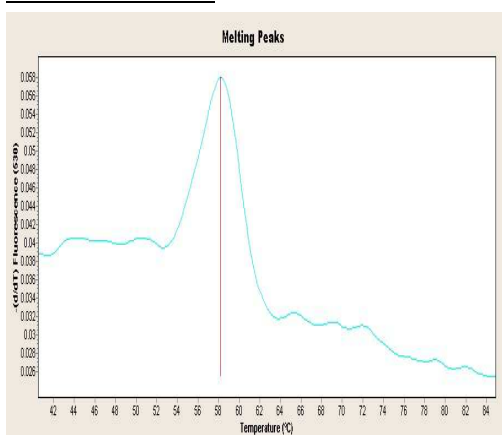


Ryc. nr 9.136. Tm uzyskane podczas badania próby A B i C z rs17315821.

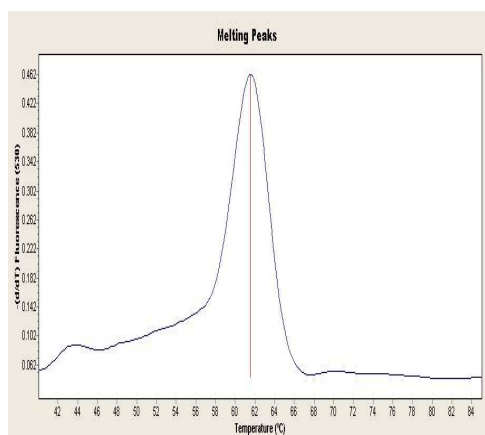


Ryc. nr 9.137. Tm uzyskane podczas badania próby A B i C z rs17306671.

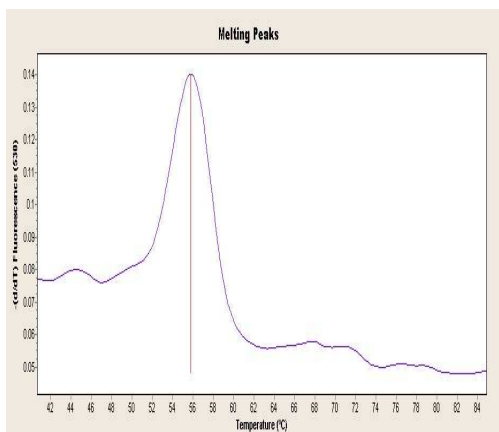
SPRAWA nr 20



Ryc. nr 9.138. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs3900.

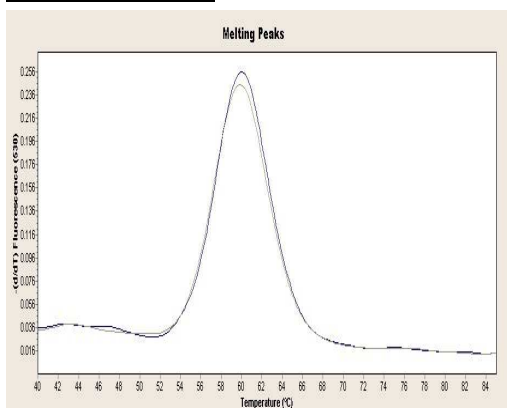


Ryc. nr 9.139. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs17315821.

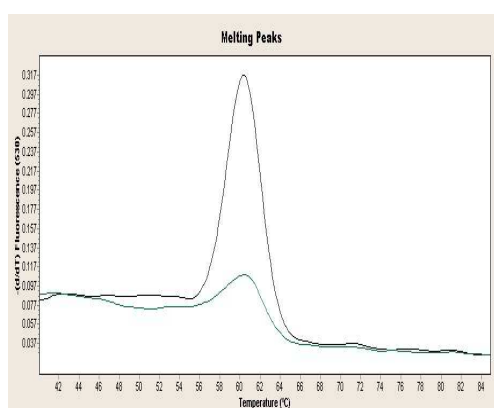


Ryc. nr 9.140. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs17306671.

SPRAWA nr 21

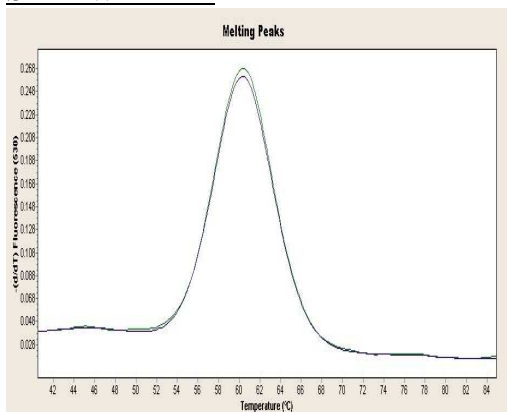


Ryc. nr 9.141. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs11553055.

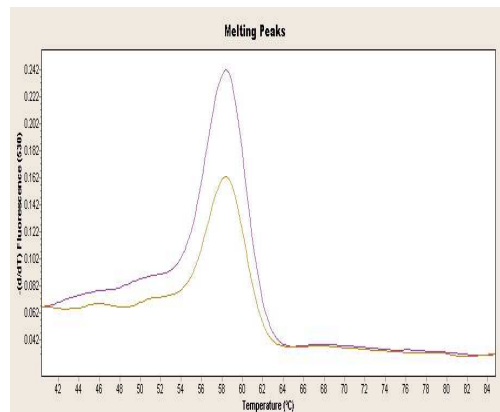


Ryc. nr 9.142. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs1722279.

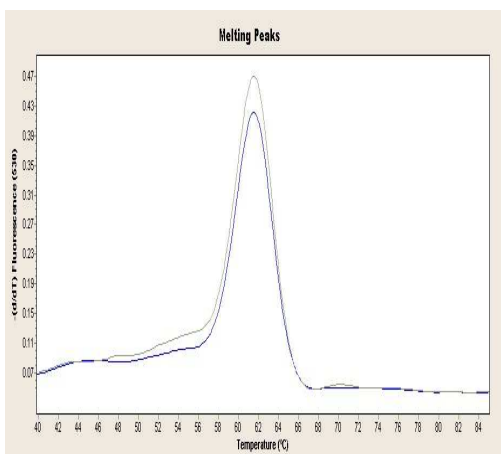
SPRAWA nr 22



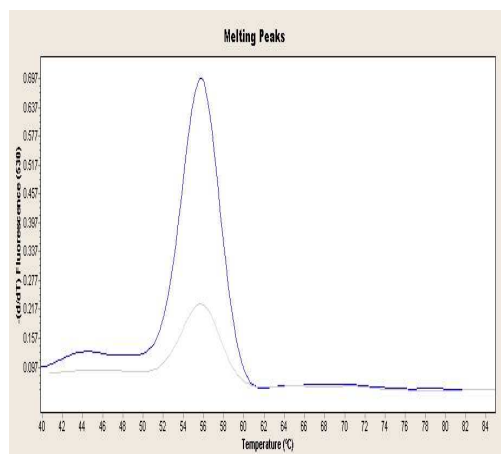
Ryc. nr 9.143. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs11553055.



Ryc. nr 9.144. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs2032604.

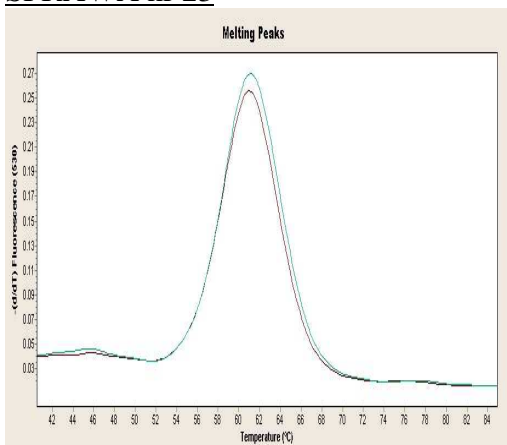


Ryc. nr 9.145. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs17315821.

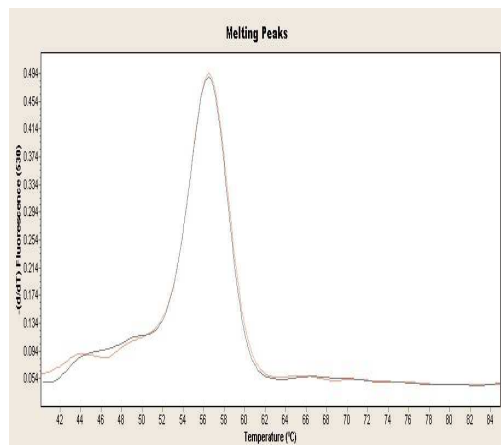


Ryc. nr 9.146. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs17306671.

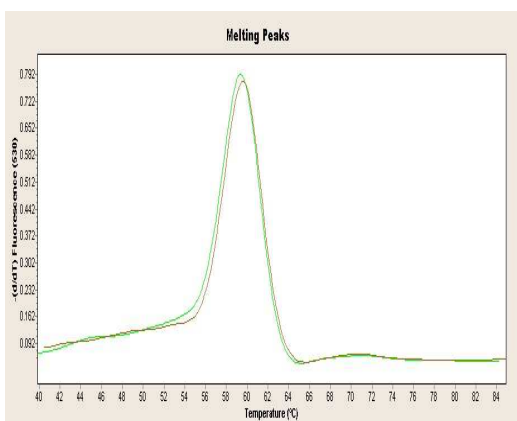
SPRAWA nr 23



Ryc. nr 9.147. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs11553055.

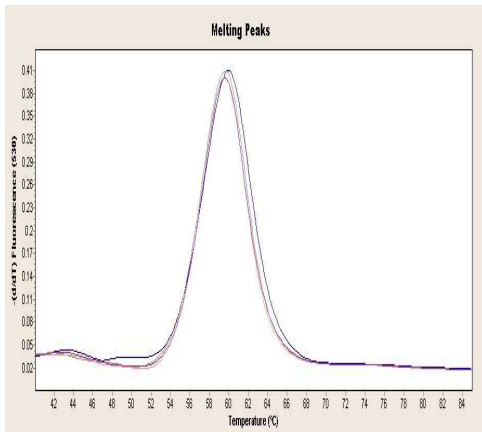


Ryc. nr 9.148. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs17315821.

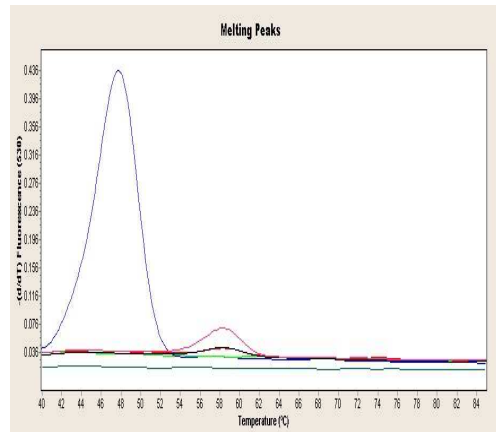


Ryc. nr 9.149. Tm uzyskane podczas badania prób A i B z rs17306671.

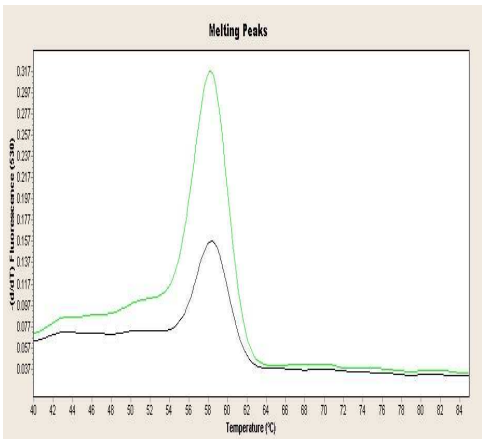
SPRAWA nr 24



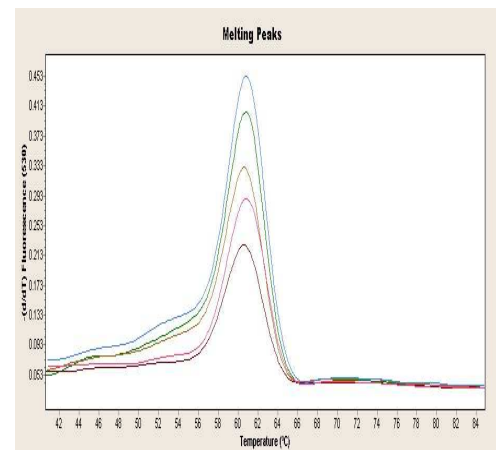
Ryc. nr 9.150. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C, D i E z rs11553055.



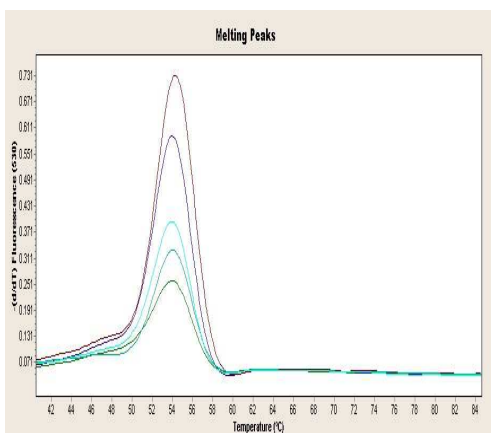
Ryc. nr 9.151. Tm uzyskane podczas badania prób B, C, D i E z rs3900.



Ryc. nr 9.152. Tm uzyskane podczas badania prób B i E z rs2032604.

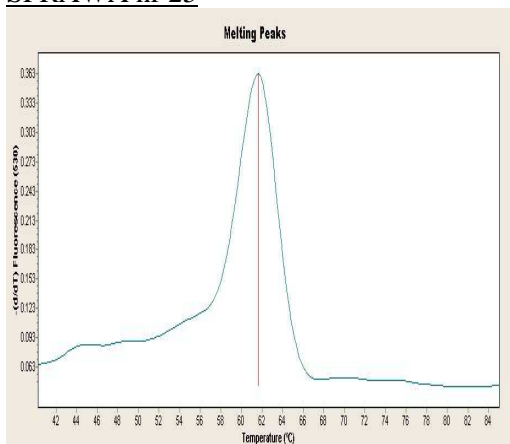


Ryc. nr 9.153. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C, D i E z rs17315821.

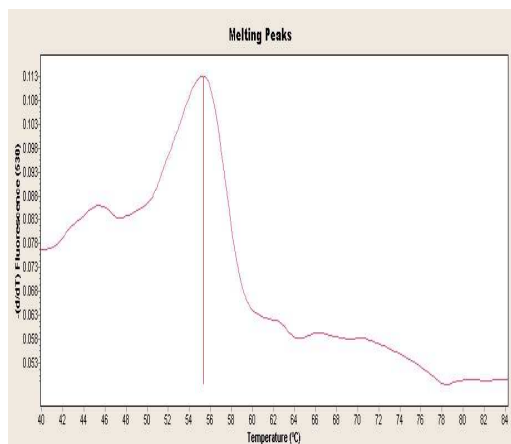


Ryc. nr 9.154. Tm uzyskane podczas badania prób A, B, C, D i E z rs17306671.

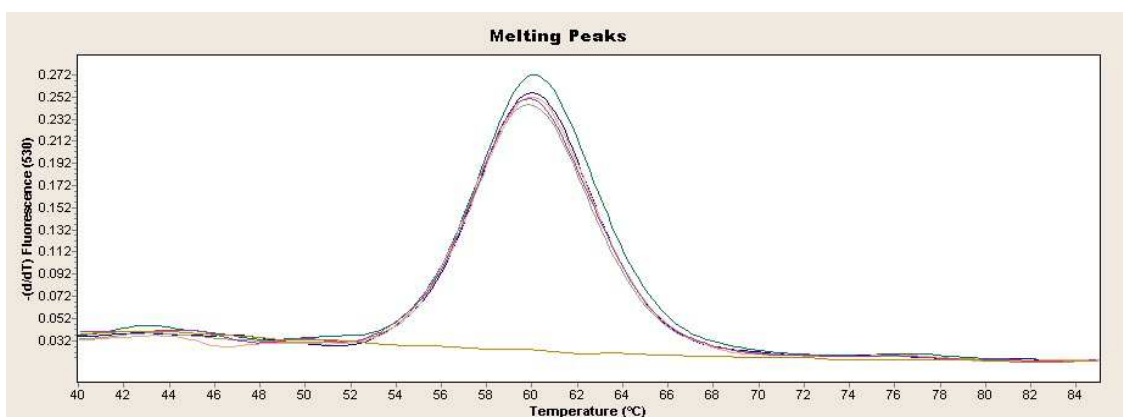
SPRAWA nr 25



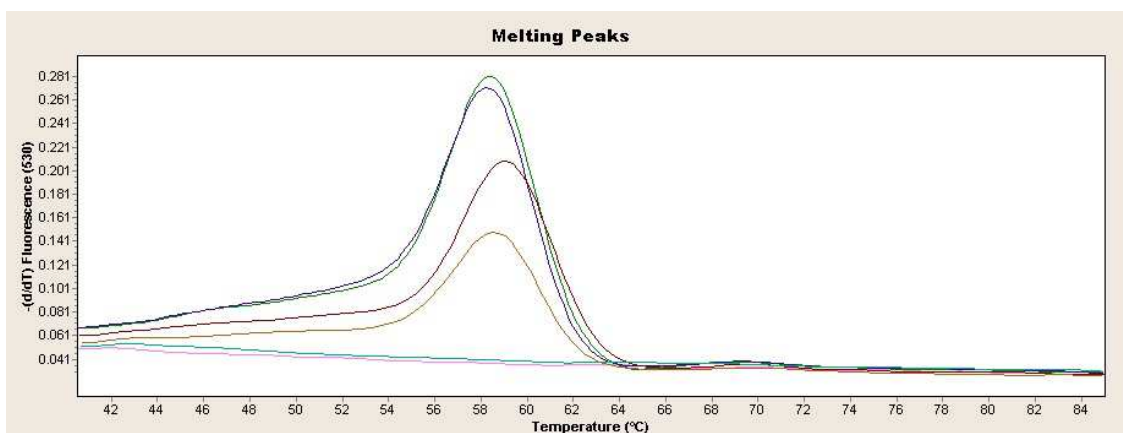
Ryc. nr 9.155. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs17315821.



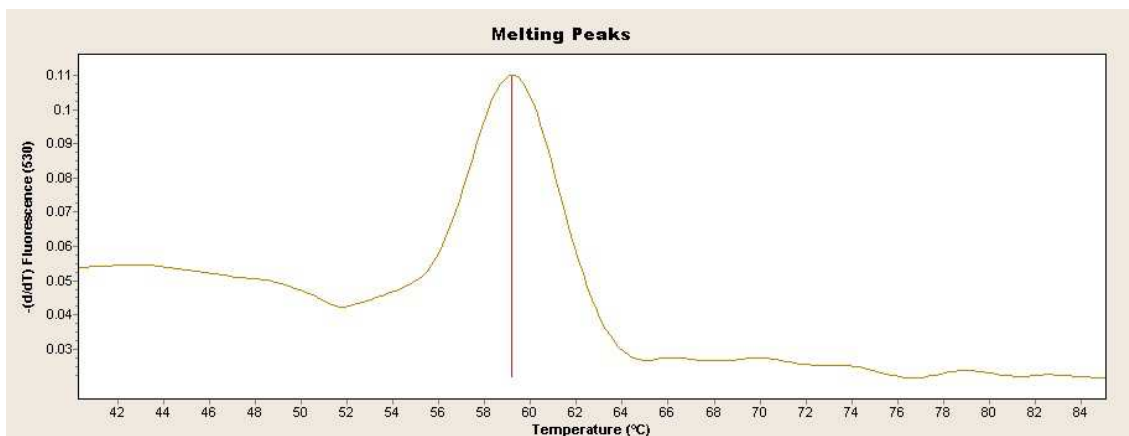
Ryc. nr 9.156. Tm uzyskana podczas badania wymazu z pochwy z rs17306671.



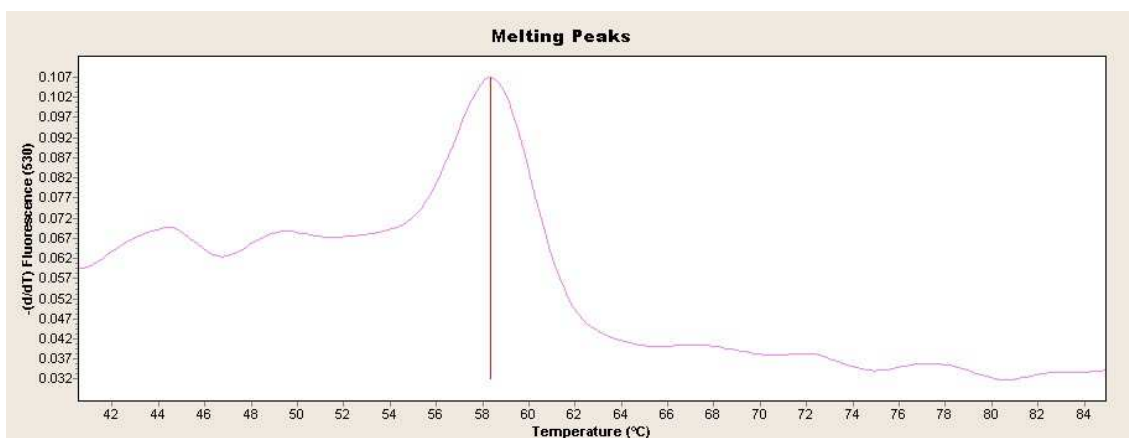
Ryc. nr 9.157. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 6 prób pochodzących od NN mężczyzn w postaci: 1- kość ramienna, 2- kość udowa, 3- kość ramienna, 4 (4 zęby), 5 (krew) oraz 5 (skóra z włosami) z zastosowaniem testu LightSNiP – rs11553055. Tabela nr 4.17.



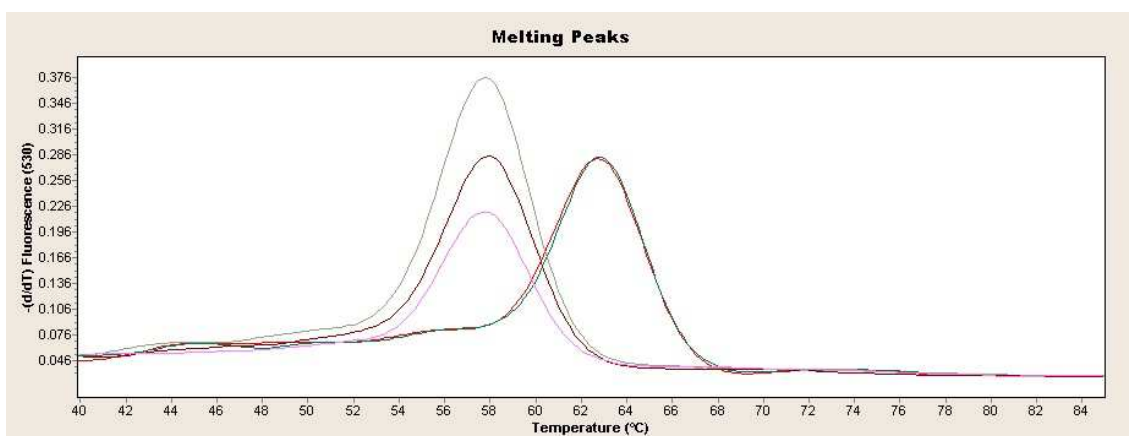
Ryc. nr 9.158. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 6 prób pochodzących od NN mężczyzn w postaci: 6- skóra z włosami, 7- fragment mięśnia, 8- kość ramienna, 9- krew, 10- włosy oraz 11- kość udowa z zastosowaniem testu LightSNiP – rs2032604. Tabela nr 4.18.



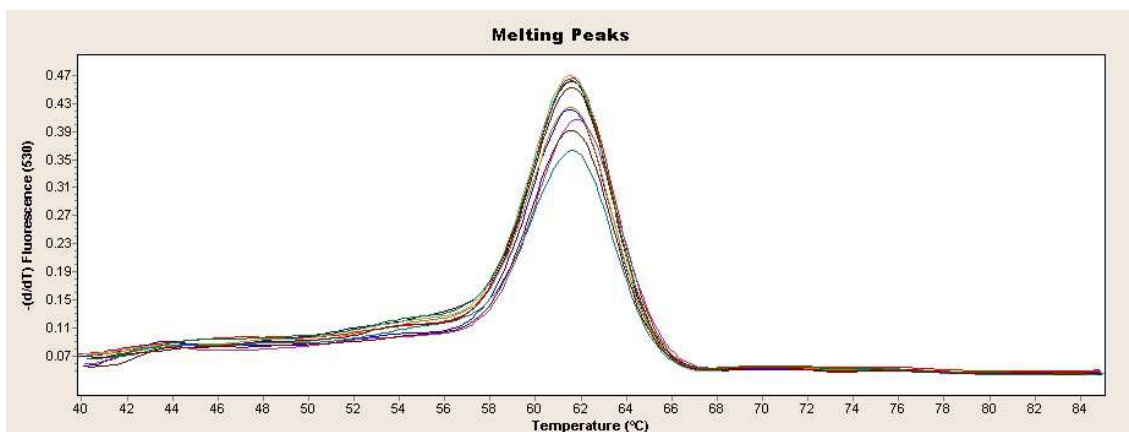
Ryc. nr 9.159. Temperatura topnienia uzyskana podczas analizy zmumifikowanych zwłok – rzepki kolanowej testem LightSNiP oraz rs1722279. Tabela nr 4.19.



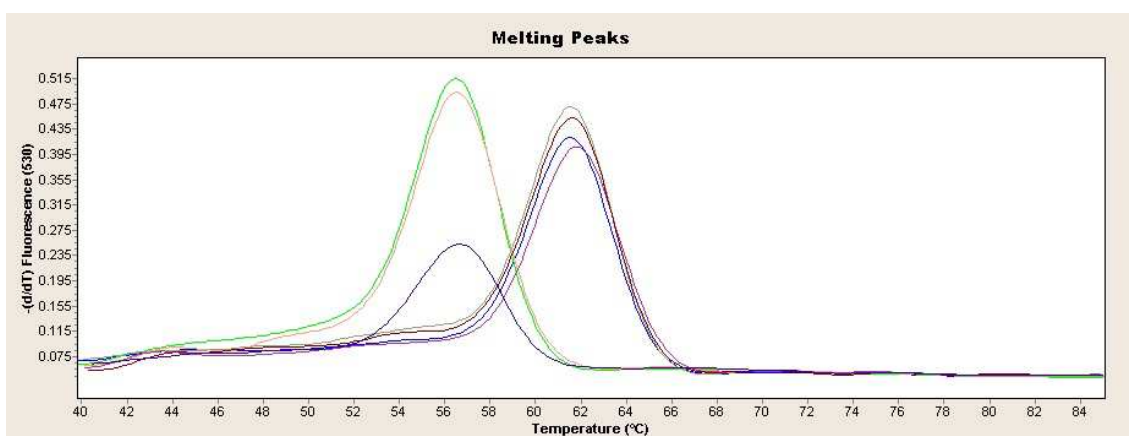
Ryc. nr 9.160. Temperatura topnienia uzyskana podczas analizy zmumifikowanych zwłok – rzepki kolanowej testem LightSNiP oraz rs2032604. Tabela nr 4.19.



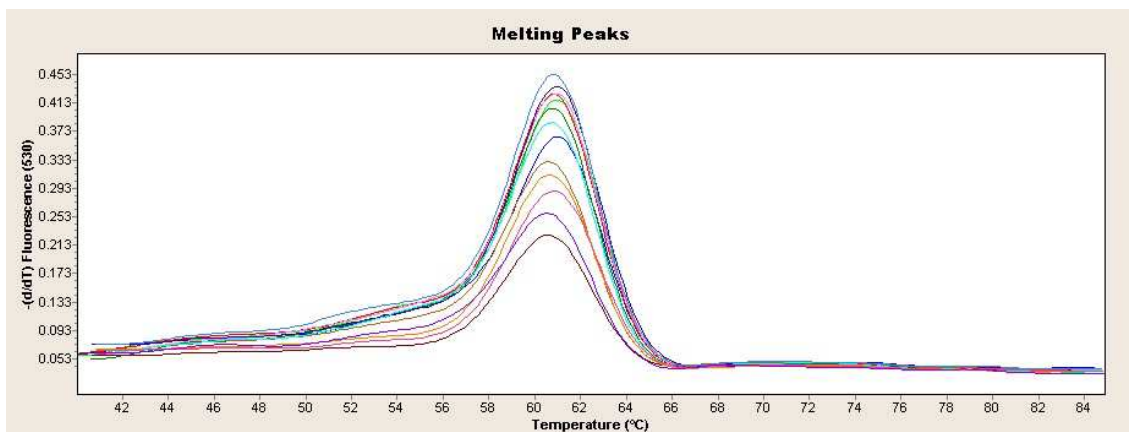
Ryc. nr 9.161. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 5 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 14, 15, 16, 17 i 18 testem LightSNiP – rs17315821. Tabela nr 4.20.



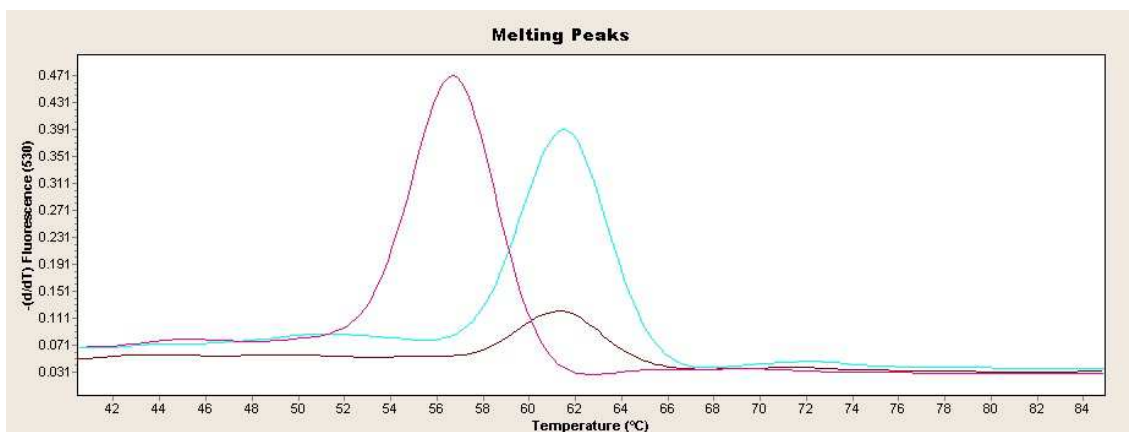
Ryc. nr 9.162. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 7 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 20, 21, 22, 23, 24, 25 i 52 testem LightSNiP – rs17315821. Tabela nr 4.20.



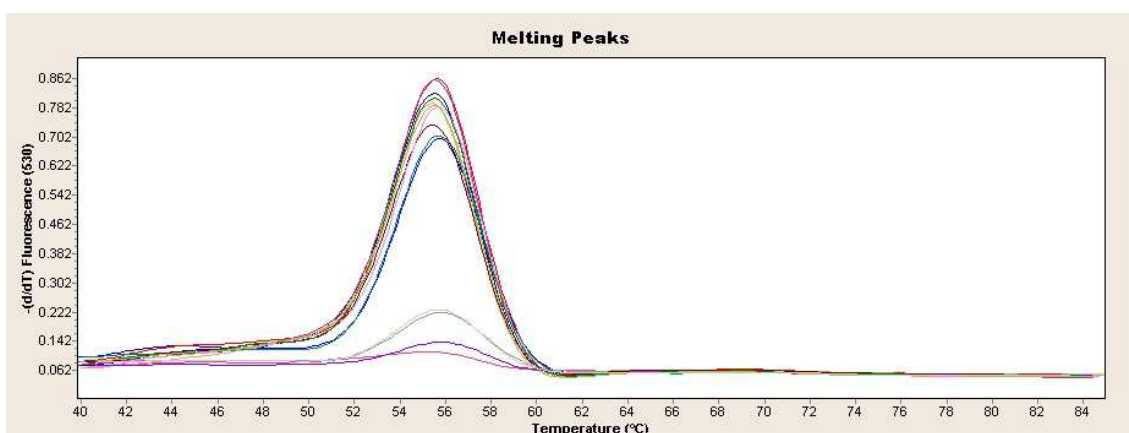
Ryc. nr 9.163. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 7 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 27, 28, 29, 31, 32, 33 i 34 testem LightSNiP – rs17315821. Tabela nr 4.20.



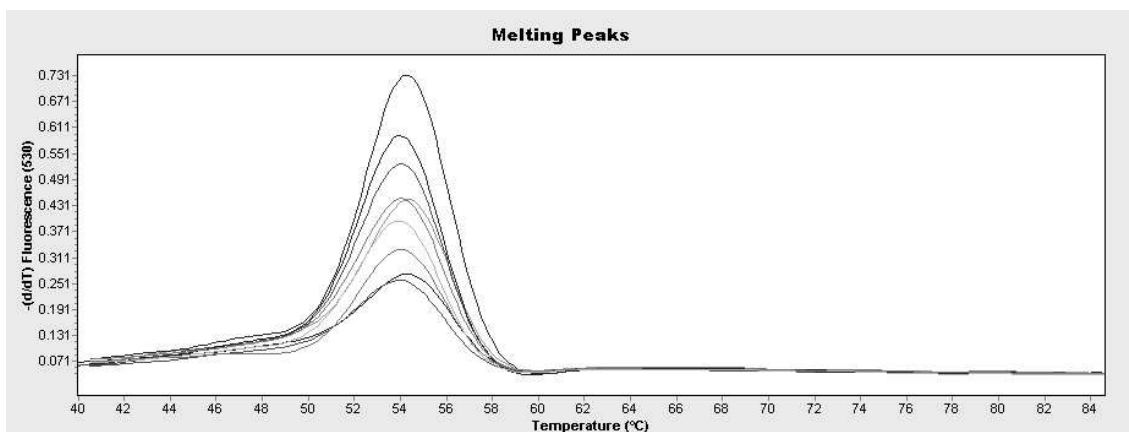
Ryc. nr 9.164. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 15 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49 i 50 testem LightSNiP – rs17315821. Tabela nr 4.20.



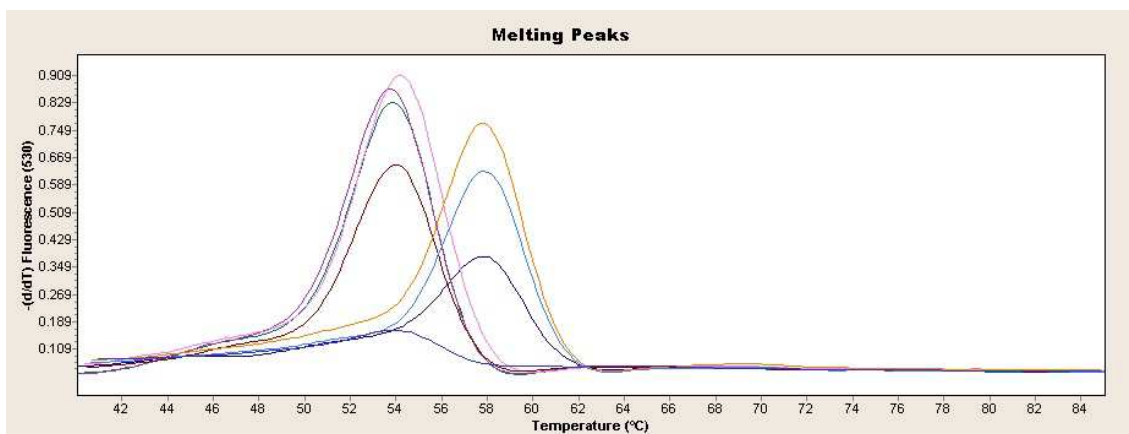
Ryc. nr 9.165. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 3 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 14, 15 i 16 testem LightSNiP – rs17306671. Tabela nr 4.20.



Ryc. nr 9.166. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 14 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32 i 33 testem LightSNiP – rs17306671. Tabela nr 4.20.



Ryc. nr 9.167. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 10 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 i 43 testem LightSNiP – rs17306671. Tabela nr 4.20.



Ryc. nr 9.168. Temperatury topnienia uzyskane podczas analizy 3 prób pochodzących od NN mężczyzn – próby nr 45, 46, 47, 48, 49, 50 i 52 testem LightSNiP – rs17306671. Tabela nr 4.20.

10. PIŚMIENICTWO

1. Abu Al-Soud W, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR - inhibiting samples. *Applied and Environmental Microbiology* (1998), 64: 3748-3753.
2. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic-acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain - reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Science* (1994), 39: 362-372.
3. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Purification of forensic specimens for the polymerase chain-reaction (PCR) analysis. *Journal of Forensic Science* (1993), 38: 691-701.
4. Akane A, Shiono H, Matsubara K, Nakahori Y, Seki S, Nagafuchi S, Yamada M, Nakagome Y. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Science International* (1991), 49: 81-88.
5. Amorim A, Pereira L. Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Science International* (2005), 150: 17-21.
6. Ayoubi, TAY, Van de Ven, WJM. Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb Journal* (1996), 10: 453-460.
7. Baarends WM, van der Laan R, Grootegoed JA. Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation* (2000), vol. 23, no. 9.
8. Bąbol-Pokora K, Prośniak A, Jacewicz R, Berent J. Baza 500 alleli SNP w populacji centralnej Polski. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* (2008), 58: 27-31.
9. Belec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piedouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: A limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* (1998), 21: 1064-1067.

10. Benschop Corina CG, Wiebosh Danielle C, Kloosterman Ate D, Sijen T. Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Science International: Genetics* (2010), 4: 115-121.
11. Betz A, Bassler G, Dietl G, Steil X, Weyermann G, Pflug W. DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case. *Forensic Science International* (2001), 118:126.
12. Beutler E, Gelbart t, Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* (1990), 9: 166.
13. Birch DE, Kolmodin L, Laird WJ, McKinney N, Wong J, Young KKY. Simplified hot start PCR. *Nature* (1996), 381, 445-446.
14. Black M, Magklara A, Obiezu C, Levesque M, Sutherland D, Tindall D, Young C, Sauter E, Diamandis E. Expression of a prostate- associated protein, human glandular kallikrein (hK2), in breast tumours and in normal breast secretions. *British Journal of Cancer* (2000), 82: 361-367.
15. Blake E, Crim D, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh P, Erlich H. Polymerase chain-reaction (PCR) amplification and human-leukocyte antigen (HLA)-DQ-alpha oligonucleotide typing on biological evidence samples-casework experience. *Journal of Forensic Science* (1992), 37: 700-726.
16. Bonetta L, Tyagi S, Marras S A. Primer time for real-time PCR. *Naturals Methods* (2005), 4: 305-312.
17. Bosch E, Lee AC, Calafell F, Arroyo E, Henneman P, de Knijff P, Jobling MA. High resolution Y-chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions. *Forensic Science International* (2002), 125:42.
18. Braun A, Little DP, Koster H. Detecting CFTR gene mutations by using primer oligo base extension and mass spectrometry. *Clinical Chemistry* (1997), 43:1151-1158.
19. Bubner B, Baldwim IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports* (2004), 23: 263-271.
20. Budowle B, Planz JV, Campbell RS, Eisenberg AJ. Single nucleotide polymorphism and microarray technology in forensic genetics – development and application to mitochondrial DNA. *Forensic Science Review* (2004), 21-36.

21. Budowle B. Twelve short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: Genetics analysis on populations residing in North America. *Forensic Science International* (2005), 150: 1-15.
22. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* (2005), 34: 597–601.
23. Bustin SA, Nola T. A-Z of Quantitative PCR. *IUL Biotechnology Series*. (2004), Rozdział 5: str. 147-148. Rozdział 6: str. 219, str. 229-231. Rozdział 7: str. 283-284, str. 302. Rozdział 10: str. 400, 407-409, 416-417.
24. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* (2000), 25: 169-193.
25. Butler JM, Coble MD, Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science, Medicine and Pathology* (2007), 3: 200-205.
26. Butler JM. Forensic DNA typing. Biology, Technology and Genetics of STR Markers – second edition. *Elsevier Academic Press* (2005).
27. Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology and technology behind STR markers. Laboratory validation. *Elsevier Academic Press* (2001).
28. Butler JM. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Science Review* (2003), vol. 15, n°2.
29. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* (2007), 43: Sii-Sv
30. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: Implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* (1999), 20:1682-1696.
31. Chorąży M. Gen strukturalny-ewolucja pojęcia i dylematy. *Nauka* (2009), 3: 57-108
32. Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parson TJ. Single nucleotide polymorphism over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *International Journal of Legal Medicine* (2004), 118: 137-146.

33. Coble MD, Vallone PM, Just RS, Diegoli TM, Smith BC, Parsons TJ. Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *International Journal of Legal Medicine* (2006), 120: 27-32.
34. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley D M. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Forensic Science* (1994), 39: 1254-1269.
35. Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1983), 80: 278-282.
36. Dang C, Jayasena SD. Oligonucleotide inhibitors of Taq polymerase facilitate detection of low copy number target by PCR. *Journal of Molecular Biology* (1996): 264:268-278.
37. Daquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorczyca P, Kaplan JC. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by preamplification heating. *Nucleic Acids Research* (1991), 19: 3749-3749.
38. Davey C, Tallafuss A, Washbourne P. Differential Expression of Neuroligin Genes in the Nervous System of Zebrafish. *Developmental Dynamics* (2010) 239:703–714.
39. de Knijff P. Messages through bottlenecks: On the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y-chromosome. *The American Journal of Human Genetics* (2000), 67:1055.
40. Defranchis R, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM. A potent inhibitor of taq polymerase copurifies with human genomic DNA. *Nucleic Acids Research* (1988), 16: 10355-10355.
41. Didenko Vladimir V. DNA Probes using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques* (2001), 31(5): 1106-1121.
42. Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, Parson W, Berger B, Grubwieser P, Mogensen HS, Morling N, Nielsen K, Sanchez JJ, Petkowski E, Carracedo A, Sanchez-Diz P, Ramos-Luis E, Brion M, Irwin JA, Just RS, Loreille O, Parson TJ, Syndercombe-Court D, Schmitter H, Stradmann-Bellinghausen B, Bender K, Gill P. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs-results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Science International* (2006), 164(1): 33-44.

43. Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P. Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. *Forensic Science International* (2005), 154: 62–77.
44. Drabik J. Opracowanie zestawów markerów miniSTR i ocena jego przydatności w identyfikacji genetycznej człowieka. *Rozprawa doktorska, Zakład Medycyny Sądowej UM w Białymstoku. Promotor dr hab. n. med. Witold Pepiński.* (2010).
45. Dupuy BM, Gedde-Dahl T, Olaisen B. DXYS267: DYS393 and its X chromosome counterpart. *Forensic Science International* (2000), 112, str.111.
46. Dziegielewski M, Simich JP, Rittenhouse-Olson K. Use of Ychromosome Probe as an Aid in the Forensic Proof of Sexual Assault. *Journal of Forensic Science* (2002), 47(3): 601-604.
47. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2000), 271: 726-730.
48. Eggerding FA. A one-step amplification and oligonucleotide ligation procedure for multiplex genetic typing. *Genome Research* (1995), 4:337-345.
49. Erali M, Palais R, Wittwer C. SNP Genotyping by Unlabeled Probe Melting Analysis. *Methods of Molecular Biology* (2008), 429: 199-206.
50. Fei Z, Ono T, Smith LM. MALDI-TOF mass spectrometric typing of single nucleotide polymorphisms with mass-tagged ddNTPs. *Nucleic Acids Research* (1998), 26:2827-2828.
51. Fernandez F, Gutierrez J, Sorlozano A, Romero J M, Soto M J, Ruiz-Cabello F. Comparison of the SYBR Green and the hybridization probe format for real-time PCR detection of HHV-6. *Mikrobiological Research*(2006) 161: 158-163.
52. Fortier A, Nelson B, Grella D, Holaday J. Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen. *Journal of the National Cancer Institute* (1999), 91: 1635-1640.
53. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA. A second generation human haplotype map of over 3.1 milion SNPs. *Nature* (2007), 449: U851-U853.

54. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* (1999), 26: 112-125.
55. Ghosh SS, Eis PS, Blumeyer K, Fearon K, Millar DP. Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Research* (1994), 22: 3155-3159.ij
56. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu FL, Yang HM. The International HapMap Project. *Nature* (2003), 426: 789-796.
57. Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, de Knijff P, Kayser M, Krawczak M, Mayr W R, Morling N, Olaisen B, Pascali V, Prinz M, Roewer L, Schneider PM, Sajantila A, Tyler-Smith C. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Ychromosome STRs. *Forensic Science International* (2001), 124: 5-10.
58. Gill P, Werrett DJ, Budowle B, Guerrieri R. An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases--joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). *Journal of the Forensic Science Society* (2004), 44(1):51-53.
59. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International* (2000), 112: 17-40.
60. Gill P. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine* (2001), 114: 204-210.
61. Gill P. Application of low copy number DNA profiling. *Croatian Medical Journal* (2001), 42: 229-232.
62. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* (2002), 30:503-512.
63. Glazer AN, Mathies RA. Energy-transfer fluorescence reagents for DNA analyses. *Biotechnology* (1997), 8: 94-102.
64. Golenberg EM, Bickel A, Weihs P. Effects of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research* (1996), 24: 5026-5033.
65. Gonzalez Andrade F. Nuevas Técnicas moleculares en Genética Médica y Forense. *Ensayos médicos sobre Genética*. <http://www.doctorfabricio.com>. (2006).

66. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensics Genetics – second edition. *Essentials of Forensic Science, The Forensic Science Society* (2011).
67. Gorzkiewicz M, Woźniak M, Grzybowski T, Łuczak S, Linkowska K, Daca P. Identyfikacja nasienia w zaplamieniach krwawych z użyciem alternatywnego źródła światła i przesiewowych testów biochemicznych. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* (2008) 58: 182-187.
68. Graves JA, Wakefield MJ, Toder R. The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Human Molecular Genetics* (1998), 7: 1991-1996.
69. Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, Urquhart A. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Science International* (2001), 122: 124-129.
70. Grodsky M, Wright K, Kirk PL. Simplified preliminary blood testing: an improved technique and a comparative study of methods. *Journal of Criminal Law and Criminology and Police Science* (1951), 42: 95-104.
71. Hammer M, Redd AJ. Forensic Applications of Y Chromosome STRs and SNPs. *Cumulative Technical Report, 2000-IJ-CX-K006. Clinical Mikrobiology and Infection* (2000), 10: 190-212.
72. Hammer MF, Chamberlain VF, Kearney VF, Stover D, Zhang G, Karafet T, Walsh B, Redd AJ. Population structure of Y chromosome SNP haplogroups in the United States and forensic implications for constructing Y chromosome STR databases. *Forensic Science International* (2006), 164: 45-55.
73. Haugland R. The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. *Ninth Edition*. Molecular Probes, Inc. <http://www.probes.com>. (2002).
74. Heinrich M, Braun T, Sängler T, Saukko P, Lutz-Bonengel S, Schmidt U. Reduced – volume and low-volumen typing of Y-chromosomal SNPs to obtain Finnish Y-chromosomal compound haplotypes. *International Journal of Legal Medicine* (2009), 123: 413-418.
75. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin o.,Gehrig C, Borer U, Thali M, Dirnhofer R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *Journal of Forensic Science* (1999), 44: 1057-1060.

76. Hochmeister MN, Budlowe B, Sparkes R, Rudin O, Gehrig C, Thali M, Schmidt L, Cordier A, Dirnhofer R. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *Journal of Forensic Science* (1999), 44(3): 597-602.
77. Hoobs MM, Steiner MJ, Rich KD, Gallo MF, Warner L, Macaluso M. Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: a cautionary tale. *Contraception* (2010), 82:291-295.
78. Hughes-Stamm SR, Ashton KJ, van Daal A. Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. *International Journal of Legal Medicine* (2011), 125: 341-348.
79. Hunt AC, Corby C, Dodd BE. The identification of human stains – a critical survey. *Journal of Forensic Medicine* (1960), 7: 112-130.
80. Iida R, Tsubota E, Matsuki T. Identification and characterization of two novel human polymorphic STRs on the Y-chromosome. *International Journal of Legal Medicine* (2001), 115: 54.
81. Iida R, Tsubota E, Sawazaki K, Masuyama M, Matsuki T, Yasuda T, Kishi K. Characterization and haplotype analysis of the polymorphic Y-STRs DYS443, DYS444 and DYS445 in a Japanese population. *International Journal of Legal Medicine* (2002), 116: 191.
82. Independent Forensics Rapid Stain Identification of human blood (RSiD™-blood), Protokół metody.
83. Independent Forensics Rapid Stain Identification of human semen (RSiD™-semen), Protokół metody.
84. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1988), 85: 9436-9440.
85. Integrated use of the Quantifiler™ Y human male DNA quantification kit and AmpFℓSTR® Yfiler™ PCR amplification kit in sexual assault cases. www.appliedbiosystems.com
86. Jacewicz R, Jędrzejczyk M, Bąbol-Pokora K, Piątek J, Ossowski A, Berent J. Zastosowanie 16 markerów Y-STR w populacji Polski Centralnej. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* (2007), 53, suppl. 2: 95-101.

87. Jamain S, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Natural Genetics* (2003), 34: 27–29.
88. Jobling MA, Samara V, Pandya A, Fretwell N, Bernasconi B, Mitchell RJ, Gerelsaikhan T, Dashnyam B, Sajantila A, Salo PJ, Nakahori Y, Disteche CM, Thangaraj K, Singh L, Crawford MH, Tyler-Smith C. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Human of Molecular Genetics* (1996), 5: 1767.
89. Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Ychromosome and human evolution. *Trends of Genetics* (1995), 11:449.
90. Jobling MA, Tyler-Smith C. New uses for new haplotypes the human Y-chromosome, disease and selection. *Trends of Genetics* (2000), 16:356.
91. Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature* (2003), 4: 598-612.
92. Kaczmarczyk M, Bartoszcze M. Mikromacierze DNA – Nowe Narzędzie w Wykrywaniu Czynn timerów Biologicznych. *Przegląd Epidemiologiczny* (2006), 60: 803-811.
93. Kainz P. The PCR plateau phase-Towards and understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000), 1494: 23-27.
94. Kaiser MW, Lyamicheva N, Ma W, Miller C, Neri B, Fors L. A comparison of eubacterial and archaeal structure – specific 5'- exonucleases. *The Journal of Biological Chemistry* (1999), 274: 21387-21394.
95. Kandimalla ER, Agrawal S. Cyclicons as hybridization-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in Real time PCR. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2000), 8: 1911-1916.
96. Kayser M, Brauer S, Schädlich H, Prinz M, Batzer MA, Zimmerman PA, Boatn BA, Stoneking M. Y chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. populations of African, European, and Hispanic ancestry. *Genome Research* (2003), 13: 624-634.
97. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhovel W, Underhill P, Shen P, Oefner P, Tommaseo-Ponzetta M, Stoneking M. Reduced Y-chromosome, but not mitochondrial DNA, diversity in human populations from west New Guinea. *The American Journal of Human Genetics* (2003), 72: 281.

98. Kayser M, Brauer S, Willuweit S. Online Y-chromosomal Short Tandem Repeat Haplotype Reference Database (YHRD) for U.S. populations. *Journal of Forensic Science* (2002), 47(3): 513-519.
99. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Weichhold GM, de Knijff P, Roewer L. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *International Journal of Legal Medicine* (1997), 110: 125.
100. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehring C, Graziosi G et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *International Journal of Legal Medicine* (1997), 110 (125-133), 141-149.
101. Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Kruger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, de Knijff P, Stoneking M, Sajantila A. Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y-chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs. *The American Journal of Human Genetics* (2000), 66: 1580.
102. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soils samples. *Nucleic Acids Research* (2009), 37: e40.
103. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain-reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology* (1991), 44: 360-365.
104. Khan G. Detection of aacA-aphD, qazE δ 1, marA, floR and tetA genes from multidrug-resistant bacteria: comparative analysis of real-time multiplex PCR assays using EvaGreen® and SYBR®Green I dyes. *Molecular and Cellular probes* (2011), doi:10.1016/j.mcp.
105. Kidd KK, Pakstis Aj, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SL, Karoma NJ, Kungulilo S, Kim JJ, Lu RB, Odunsi A, Okonofua F, Parnas J, Schulz LO, Zhukova OV, Kidd JR. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Science International* (2006), 164(1): 20-32.

106. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. "Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. (1971), 56: 341-361.
107. Kloosterman AD, Kersbergen P. Efficacy and limits of genotyping low copy number DNA samples by multiplex PCR of STR loci. *Progress in Forensic Genetics* (2003), 9: 795-798.
108. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* (1996), 62: 1102-1106.
109. Krenke BE, Nassif N, Sprecher CJ, Knox C, Schwandt M, Storts DR. Developmental validation of real-time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA. *Forensic Science International: Genetics* (2008), 3:14-21.
110. Krenke BE, Viculis L, Richard ML, Prinz M, Milne SC, Ladd C, Gross AM, Gornall T, Frappier JRH, Eisenberg AJ, Barna Ch, Aranda XG, Adamowicz M S, Budowle B. Validation of male-specific, 12 - locus fluorescence short tandem repeat (STR) multiplex. *Forensic Science International* (2005), 151: 111-124.
111. Krzemień P. Real Time PCR w służbie diagnostyki wirusologicznej. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl>.
112. Kuppaswamy MN, Hoffmann JW, Kasper CK, Spitzer SG, Groce SL, Bajaj S P. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1991), 88: 1143-1147.
113. Lantz PG, Abu al-Soud W, Knutsson R, Hahn-Hagerdal B, Radstrom P. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnology Annual Review* (2000), 5: 87-130.
114. Lantz PG, Matson M, Wadstrom T, Radstrom P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* (1997), 28: 159-167.
115. Lareu MV, Ruiz-Ponte C. Genotyping SNPs with the LightCycler. *Methods in Molecular Biology. Forensic DNA Typing Protocols* (2005), vol. 297.

116. Laumonnier, F. et al. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *The American Journal of Human Genetics* (2004), 74: 552–557
117. Lee KH, Song GJ, Kang IS. Ubiquitin-specific protease activity of USP9Y, a male infertility gene on the Y chromosome. *Reproduction, Fertility and Development* (2003), vol.15, no. 1-2: 129–133.
118. Lessig R, Willuweit S, Krawczak M. Asian online Y-STR haplotype reference database. *Legal Medicine*. (2003), 5: 160-163.
119. Levy S, Sutton G, Ng, PC, Feuk L, Halperg AL, Walenz BP. The diploid genome sequence of an individual human. *Plos. Biology*. (2007), 5: 2113-2144.
120. Li HH, Cui XF, Arnheim N. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA – molecules in human sperm by using the polymerase chain – reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America* (1990), 87: 4580-4584.
121. Li HH, Gyllensten UB, Chui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA – sequences in single human-sperm and diploid-cells. *Nature* (1998), 335: 414-417.
122. Lien S, Szyda J, Schechinger B, Rappold G, Arnheim N. Evidence for Heterogeneity in Recombination in the Human Pseudoautosomal Region: High Resolution Analysis by Sperm Typing and Radiation-Hybrid Mapping. *The American Journal of Human Genetics* (2000), 66: 557–566.
123. Louise JG, Lance DB, Michelle AM, Joseph ED, William BD. Optimization of LightTyper Genotyping Assays. *Biochemica*, n° 3. (2005).
124. Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Natural Biotechnology* (1999), 17: 292-296.
125. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* (2002), 30: 1292-1305.

126. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Mikrobiology and Infectious Diseases* (2004), 10(3): 190-212.
127. Malatesta M, Mannello F, Luchetti F, Marcheggiani F, Condemi L, Papa S, Gazzanelli G. Prostate-specific antigen synthesis and secretion by human placenta: a physiological kallikrein source during pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (2006), 85: 317-321.
128. Masahiro Hiratsuka, Naoko Tsukamoto, Yumiko Konno, Masoyuki Nata, Masaki Hashiyada, masato Funayama, Michinao Mizugaki. Forensics Assessment of 16 Single Nucleotide Polymorphisms Analyzed by Hybrydyzation Probe Assay. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* (2005), 207: 255-261.
129. Masumeci L, Arthur JW, Cheung FSG, Hoque A, Lippman S, Reichardt JKV. Single Nucleotide Differences (SNDs) in the dbSNP database may lead to errors in genotyping and haplotyping studies. *Human Mutation* (2010), 31: 67-73.
130. Mathias N, Bayes M, Tyler-Smith C: Highly informative compound haplotypes for the human Y-chromosome. *Human of Molecular Genetics* (1994), 3: 115.
131. Mein CA, Barratt BJ, Dunn MG, Siegmund T, Smith AN, Esposito L. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Research* (2000), 10: 330-343.
132. Mikula M, Dzwonek A, Jagusztyn-Krynicka K, Ostrowski J. Quantitative detection for low levels of Helicobacter pylori infection in experimentally infected mice by real-time PCR. *Mikrobiology Methods* (2003), 55: 351-359.
133. Mocellin S, Rossi CR, Marincola FM. Quantitative real-time PCR in cancer research. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* (2003), 51: 301-313.
134. Monteiro L, Bonnemaision D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *Journal of Clinical Microbiology* (1997), 35: 995-998.
135. Moretti T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold™ DNA polymerase. *Biotechniques* (1998), 25: 716-722.
136. Mulero JJ, Chang ChW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, Hennessy LK. Development an Validation of the AmpF ℓ STR® Yfiler™ PCR amplification

- kit: A male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *Journal of Forensic Science* (2006), 51: 64-75.
137. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro – the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (1986), 51: 263-273.
 138. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods in Enzymology* (1987), 155: 355-350.
 139. Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: Thriller of Filler for Male (In) fertility?. *Nucleic Acids Research* (2010), 30: 1292-1305.
 140. Nei M. in: *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York (1987), p. 179.
 141. Old J, Schweers B, Boonlayangoor PW, Reich K. Developmental Validation Studies of RSID-Semen Lateral Flow Immunochromatographic strip test for the forensic detection of Seminal Fluid. *Independent Forensics* (2006), IL 60148.
 142. Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, Fraternali B, Buscemi L, Pesaresi M, Tagliabracci A. Y-chromosome genetic structure in sub- Apennine populations of Central Italy by SNP and STR analysis. *International Journal of Legal Medicine* (2007), 121: 234-237.
 143. Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (2005), 6: 165-183.
 144. Palumbi SR, Cipriano F. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. *Journal of Heredity* (1998), 89(5): 459-464.
 145. Panaccio M, Georgesz M, Lew M, Folt PCR: A simple PCR protocol for amplifying DNA directly from whole blood. *Biotechniques* (1993), 14: 238-243.
 146. Pascali VL, Dobosz M, Brinkmann B. Coordinating Y-chromosomal STR research for the courts. *International Journal of Legal Medicine* (1999), 112: 1.
 147. Pastinen T, Kurg A, Metspalu A, Peltonen L, Syvanen AC. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research* (1997), 7: 606-614.

148. Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvanen AC. A system for specific, high – throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Research* (2000), 10: 1031-1042.
149. Pearson PL, Bobrow M. Definitive evidence for the short arm of the Y chromosome associating with the X chromosome during meiosis in the human male. *Nature* (1970), 226: 959-961.
150. Pepiński W, Niemcunowicz-Janica A, Skawronska M, Koc-Zorawska E, Janica J, Soltyszewski I. Y-chromosome STR haplotypes and alleles in the population sample of Old Believers residing in the Northeastern Poland. *Forensic Science International* (2004), 143: 65-68.
151. Peters IR, Helps CR, Hall EJ. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunology Methods* (2004), 286: 203-217.
152. Pfaffl M, Geogieva TM, Geogiev IE. Real-time RT-PCR quantification of insulin – like growth factor (IGF)-1 , IGF-1 receptor , IGF-2, IGF-2 receptor , insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology* (2002), 22: 91-102.
153. Pherson MJ, Moller SG. Understanding PCR. *Bios Scientific publishers* (2000), 2: 9-21.
154. Philips C. Using online database of developing SNP markers of forensic interest. *Methods in Molecular Biology, Forensic DNA Typing Protocols* (2005), vol. 297.
155. Pikaart MJ, Villeponteau B. Suppression of PCR amplification by high levels of RNA. *Biotechniques* (1993), 14: 24-25.
156. Podstawy polimerazowej reakcji łańcuchowej PCR (Polymerase Chain Reaction) <http://gmwh.republika.pl/index/linki.htm>.
157. Poon H, Elliott J, Modler J, Fregau C. The use of hemastix® and the subsequent lack of DNA recovery using the promega DNA IQ™ system. *Journal of Forensic Science* (2009), 54:1278-1286.
158. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM. DNA Comission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International Genetics* (2007), 1: 3-12.

159. Protokół Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x), Fermentas.
160. Protokół testu LightSNiP –rs11553055, TIB@Molbiol.
161. Protokół testu LightSNiP –rs17222279, TIB@Molbiol.
162. Protokół testu LightSNiP –rs17306671, TIB@Molbiol.
163. Protokół testu LightSNiP –rs17315821, TIB@Molbiol.
164. Protokół testu LightSNiP –rs2032604, TIB@Molbiol
165. Protokół testu LightSNiP –rs34442126, TIB@Molbiol.
166. Protokół testu LightSNiP –rs3900, TIB@Molbiol.
167. Przybylski Z. Zastosowanie elektroforezy w żelu skrobiowym do wykrywania kwaśnej fosfatazy w sądowo – lekarskich badaniach nasienia. Rozprawa doktorska. *Zbiory biblioteki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu* (1967).
168. Quantifiler™ human DNA quantification kit. Quantifiler™ Y human male DNA quantification kit. www.appliedbiosystems.com
169. Quickenden TI, Creamer JJ. A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence* (2001), 16: 295-298.
170. Radam G, Strauch H. Limuneszenzmikroskopischer Nachweis des Y chromosoms in Knochenmarkzellen – eine neue Methode zur Geschlechtsbestimmung an Leichenmaterial. *Kriminal. Forens. Wissensch.* (1973), 6:149-151.
171. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C. Pre-PCR processing – strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* (2004), 26: 133-146.
172. Raitio M, Lindroos K, Laukkanen M, Pastinen T, Sistonen P, Sajantila A, Syvänen AC. Y-Chromosomal SNPs in Finno-Ugric-Speaking Populations Analyzed by Minisequencing on Microarrays. *Genome Research* (2001), 11: 471-482.

173. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* (2003), 339: 62-63.
174. Rapley R, Whitehouse D. *Molecular Forensics*. Alonso A, Garcia O. Real-time quantitative PCR in forensic science. (2007), rozdział 4, str.: 59-60.
175. Real-time PCR and high performance pathogen detection, MGB Eclipse Probe System. www.amershambiosciences.com
176. Redd A J, Agellon A B, Kearney V A, Contreras V A, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, Hammer MF. Forensic value of 14 novel STRs on the human Y-chromosome. *Forensic Science International* (2002), 130: 97.
177. Ried K, Rao E, Schiebel K, Rappold GA. Gene duplication as a recurrent theme in the evolution of the human pseudoautosomal region 1: isolation of the gene ASMTL. *Human Molecular Genetics* (1998), 7(11): 1771-1778.
178. Roewer L, Epplen JT. Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Science International* (1992), 53: 163.
179. Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, de Knijff P. Analysis of molecular variance(AMOVA) of Y-chromosome-specific microsatellites in two closely related human populations. *Human Molecular Genetics* (1996), 5: 1029.
180. Roewer L, Krawczak M, Willuweit S. Online reference database of European Y-chromosomal Short Tandem Repeat (STR) haplotypes. *Forensic Science International* (2001), 118: 106-113.
181. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* (1996), 242: 84-89.
182. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* (1998), 281: 363-365.
183. Rouhibakhsh A, Priya J, Periasamy A, Haq QMI, Malathi VG. An improved DNA isolation method and PCR protocol for efficient detection of multicomponents of begomovirus in legumes. *Journal of Virological Methods* (2008), 147: 37-42.

184. Saiki R, Bugawan T, Horn G, Mullis K, Erlich H. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ-alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* (1986), 324: 163-166.
185. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* (1988), 239: 487-491.
186. Salas A, Quintans B, Alvarez-Iglesias V. SNaPshot Typing of Mitochondrial DNA Coding Region Variants. *Methods in Molecular Biology, Forensic DNA Typing Protocols* (2005), vol. 297.
187. Sanchez A, Bullejos M, Burgos M, Hera C, Jimenez R, Diaz de la Guardia R. High sequence identity between the SRY HMG box humans and insectivores. *Mammalian Genome* (1996), 7: 536-538.
188. Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR minisequencing of SNPs - a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* (2003), 137: 74-84.
189. Sanchez JJ, Børsting C, Morling N. Typing of Y chromosome SNPs with multiplex PCR methods. *Methods in Molecular Biology, Forensic DNA Typing Protocols* (2005), vol. 297.
190. Sato I, Sagi M, Ishiwari A, Nishijima H, Ito E, Mukai T. Use of the „SMItEST” PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. *Forensic Science International* (2002), 127: 71-74.
191. Sauter E, Babb J, Daly M, Engstrom P, Ehya H, Malick J, Diamandis E. Prostate-specific antigen production in the female breast: association with progesterone. *Cancer Epidemiol biomarkers* (1998), 7: 315-320.
192. Sawicki W. Kwasy nukleinowe, izolacja, analiza, rozdział. *Katedry Mikrobiologii i żywności Akademii Rolniczej w Szczecinie* (2005) <http://www.scribd.com/doc/51070985/Technika-PCR>
193. Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C} (T). *Method, Methods* (2001), 25: 402-408.
194. Schmittgen TM, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative Reverse Transcription – Polymerase chain reaction to study mRNA

- decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Analytical Biochemistry* (2000), 285: 194-204.
195. Schneider PM, Klaus B, Wolfgang RM, Walther P. STR analysis of artificially degraded DNA-results of collaborative European exercise. *Forensic Science International*. (2004), 139: 123-134.
196. Schneider PM, Meuser S, Waiyawuth W, Seo Y, Rittner C. Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations. *Forensic Science International* (1998), 97: 61-70
197. Sensabaugh G. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *Journal of Forensic Science* (1978), 23: 106-115.
198. Serdar T, Sema D. Y-SNP haplogroups in the Antalya population in Turkish Republic. *Romanian Journal of Legal Medicine* (2009), 17(1): 59-68.
199. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* (2001), 29: 308-311.
200. Shumaker JM, Metspalu A, Caskey CT. Mutation detection by solid phase primer extension. *Human Mutations* (1996), 7: 346-354.
201. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* (1990), 346: 240-244.
202. Sinha SK, Budowle B, Arcot SS. Development and validation of multiplexed y-chromosome STR genotyping system, Y-PLEX™ 6, for forensic casework. *Journal of Forensic Science* (2003), 48: 1-11.
203. Słomski R. Analiza DNA – teoria i praktyka. *Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu* (2008) str. 131-139; str. 435; str. 560-563.
204. Sobrino B, Carracedo A. SNP Typing in Forensic Genetics: A Review. *Methods in Molecular Biology, Forensic DNA Typing Protocols* (2005) vol. 297.
205. Span M. Pitfalls in qPCR, Primer and probe design and synthesis. <http://www.bioscience-events.com/leipzig/Span-Eurogentec-qPCR-Leipzig.pdf>

206. Stalvey JR, Erickson RP. An improved method for detecting Y chromosomal DNA. *Human Genetic* (1987), 76: 240-243.
207. Steinman G. Rapid spot test for identifying suspected semen specimens. *Forensic Science International* (1995), 72: 191-197.
208. Studzińska A, Tyburski J, Daca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia 1* (2008), 80: 71-85.
209. Sturm RA, Frudakis TN. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends of Genetics* (2004), 20(8): 327-332.
210. Sun C, Skaletsky H, Birren B. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genetics* (1999), vol. 23, 4: 429-432.
211. Surma R. Haplogrupy. *Wydanie 3 bird Projects* (2010).
212. Syvanen AC, Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K, Soderlund H. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* (1990), 8: 684-692.
213. Test diagnostyczny in vitro do profesjonalnego użytku w celu stwierdzenia obecności nasienia poprzez półilościowe wykrywanie PSA (swoistego antygenu sterczowego). Seratec® PSA Semiquant (opis oraz protokół).
214. Tobe SS, Watson N, Nic Daeid N. Evaluation of six presumptive test for blood their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *Journal of Forensic Science* (2007), 52: 102-109.
215. Tsai YL, Olson BH. Detection of low numbers of bacterial-cells in soils and sediments by polymerase chain-reaction. *Applied and Environmental Microbiology* (1992), 58: 754-757.
216. Vallone PM, Butler JM. Y-SNP typing of U.S. African American and Caucasian samples using allele-specific hybridization and primer extension. *Journal of Forensic Science* (2004), 49(4): 723-732.
217. Vallone PM, Fahr K, Kostrzewa M. Genotyping SNPs using a UV-photocleavable oligonucleotide in MALDI-TOF MS. *Methods in Molecular Biology. Forensic DNA Typing Protocols* (2005), vol. 297.

218. Venter JC, Adams MD, (2001) Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* (2001), 291: 1304-1351.
219. Vikler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International* (2009), 188: 1-17.
220. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJA. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *Journal of Clinical Virology* (2004), 29:179–188.
221. Watson RJ, Blackwell B. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology* (2000), 46: 633-642.
222. Wei Wei, Hai-Bo Luo, Jing Yan, Yi-Ping Hou. Exploring of new Y-chromosome SNP loci using Pyrosequencing and the SNaPshot methods. *International Journal of Legal Medicine* (2011), DOI 10.1007/s00414-011-0603-4.
223. Westen AA, Matai AS, LAros JF, Maeiland HC, Jasper M, de Leeuw WJ, de Knijff P, Sijen T. Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Science International: Genetics* (2009), 3(4): 233-241.
224. Wetton JH, Tsang KW, Khan H. Inferring the population of origin of DNA evidence within the UK by allele-specific hybridization of Y-SNPs. *Forensic Science International* (2005), 152: 45-53.
225. White PS, Tatum OL, Deaven LL, Longmire JL: New, male-specific microsatellite markers from the human Ychromosome; *Genomics* (1999), 57: 433.
226. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* (1997), 63: 3741-3751.
227. Witt M, Erickson RP. A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Human Genetic* (1989), 82: 271-274.
228. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques* (1997), 22: 130-138.
229. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* (2005), 39: 75-85.

230. Wójcikiewicz J. Ekspertyza Sądowa- zagadnienia wybrane. *Oficyna a Walters Kluwer business*. Warszawa (2007), str. 356.
231. www.au.poznan.pl/kbib/klamecka.pdf. klameckak.
232. www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/codis2a.htm).
233. www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
234. www.katbiolkom.amp.edu.pl , Mirosław Andrusiewicz.
235. www.kryminalistyka.fr.pl .
236. www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2032604
237. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=11553055
238. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=17222279
239. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=17306671
240. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=17315821
241. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=34442126
242. www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3900
243. www.roche.pl
244. www.seratec.com
245. www.wikipedia.org
246. www.ycc.biosci.arizona.edu
247. Wyczałkowska-Tomasik A, Żegarska J. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym - zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce medycznej. *Przegląd Lekarski* (2009), 66 : 4.
248. Yu VWC, Gauthier C, St-Arnaud R. Inhibition of ATF4 transcriptional activity by FIAT/ γ -taxilin modulates bone mass accrual. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2006), vol. 1068, 1: 131–142.
249. Zhou L, Errigo RJ, Lu H, Poritz MA, Seipp MT, Wittwer C. Snapback Primer Genotyping with Saturating DNA Dye and Melting Analysis. *Clinical Chemistry* (2008), 54: 10, 1648-1656.