

GENOTYPING OF AB0 BLOOD GROUP ALLELES IN BLOODSTAINS BY THE PCR-RFLP TECHNIQUE

Marzanna CIESIELKA, Piotr KOZIOŁ, Roman MAĐRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: Genotyping of the AB0 blood group system was performed using the method described by Lee and Chang, which enables differentiation of six AB0 genotypes: A0, AA, B0, BB, 00, AB. Amplification of DNA fragments 199–200 bp and 128 bp long (performed in one or two PCR reactions) was followed by restriction endonuclease Alu I and Kpn I digestion. Products of restriction digestion were subjected to separation in polyacrylamide gels and silver stained. Parameters of amplification, using two pairs of primers simultaneously and for each pair of primers separately, are described. The genotyping method was verified by studying 20 experimental stains (prepared from fresh blood) and 32 stains of blood collected during autopsies (prepared 2, 5, 10 and 15 years ago) of known blood group, which was determined earlier using serological methods. For all analysed experimental bloodstains, positive results of amplification with an input of 3 ng of DNA template and a correct result for AB0 blood grouping were obtained.

KEY WORDS: AB0; Genotyping; PCR-RFLP; Bloodstains.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 53–64
Received 26 September 2001; accepted 26 October 2001*

INTRODUCTION

The AB0 blood group system was the first genetic marker developed in humans which was relatively quickly introduced to forensic research both for biological stains identification [1, 8], and disputed paternity testing [5]. Antigens AB0 are present on the surface of the cell membrane of most tissues, and they may also be present in soluble form in secretions of the organism. Their strong expression has great significance in human life (fetal immunisation, transfusion, transplantation), which means that the AB0 system is widely used as a marker, and the blood group was and is frequently recorded in various documents (e.g. identity cards, information cards from hospitals, driver's licenses etc.).

AB0 blood genotyping using the serological technique enables quick, cheap and reliable identification of the 6 most common phenotypes: A₁, A₂, A₁B, A₂B, B and 0. Phenotyping of the AB0 blood group system in biological traces, however, requires a method relying on antibodies absorption with

agglutinogens, the results of which depend not only on the amount of glycolipid and glycoprotein antigens, but also on their degree of degradation. The presence of similar structures to these antigens on microorganisms is an additional problem. Consequently, there exists a possibility of unspecific absorption of specific antibodies, especially in the case of stains degraded by biological factors [2].

In 1990 Yamamoto et al. [11] cloned and sequenced cDNA of the genes of $\alpha 1 \rightarrow 3$ N acetylgalactosaminyl-transferase and $\alpha 1 \rightarrow 3$ galactosyltransferase, which determine antigens A and B. They identified seven nucleotide substitutions (positions: 297, 526, 657, 703, 796, 803 and 930), resulting in four aminoacid substitutions in the catalytic domain of proteins, which enable differentiation of allele A from allele B. Allele A differs from allele 0 by a single deletion in position 261, which is responsible for the arising of the functionally inactive form of transferase 0 [11]. Allele A includes a few subtypes, of which the most frequent are A_1 and A_2 . The coding sequence of transferase A_2 differs from that of transferase A_1 by nucleotide substitution in position 467 and deletion in position 1060 [12]. These individual DNA mutations can be detected by application of molecular biology methods and the PCR technique, which enables determination of the AB0 blood group in various tissues, from tiny amounts of even heavily degraded biological traces.

The aim of this work was optimisation of PCR conditions for amplification of genes determining the AB0 blood group system and verification of the obtained results of genotyping by their comparison to previously obtained results using serological methods. Reliability and efficiency of the applied technique were also verified.

MATERIALS AND METHODS

Genotypes AB0 were identified in 52 experimental bloodstains, whose blood groups had been determined previously by the serological method. Twenty bloodstains were prepared from fresh blood in the year 2000, and 32 additional bloodstains – from blood taken from dead bodies (8 blood samples collected in years 1985, 1990, 1995 and 1998). Blood samples were chosen to represent various AB0 phenotypes.

DNA was extracted with a kit intended for genomic DNA isolation from biological traces (A & A Biotechnology). The amount of extracted DNA was assessed by the dot-blot and hybridisation method with D17Z1 biotin marked probe, using the commercial kit Quantitation System, Gibco BRL, in accordance with the manufacturer's directions. Amplification was carried out using PCR primers according to Lee and Chang [4]:

For DNA fragment 199 (or 200) bp:

– primer 1: 5' – CA CCG TTG AAG GAT GTC CTC – 3',

– primer 2: 5' – AAT GTC CAC AGT CAC TCG CC – 3',

and for DNA fragment 128 bp:

– primer 3: 5' – TGG AGA TCC TGA CTC CGC TG – 3'

– primer 4: 5' – GTA GAA ATC GCC TCG TCC TT – 3'.

At the first stage of the study PCR conditions were established. In the process of optimisation of the PCR reaction, concentrations of template DNA in the range from 0.5 ng to 100 ng and primer concentrations in the range: 5, 10, 15, 20, 25, 30 pM were taken into account. Parameters of amplification were optimised for multiplex reaction (simultaneous amplification of both DNA fragments: 199–200 bp and 128 bp) and for singleplex amplifications. MgCl₂ concentration was optimised only for the multiplex reaction in the range: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 3.5 mM, 4 mM. In the case of singleplex reactions no additional MgCl₂ is necessary.

An optimised reaction mixture was used at the second stage of the study for multiplex bloodstains genotyping and consisted of 20–50 ng template DNA, 200 μM of each dNTP, 5 μl buffer, 2.5 U Taq DNA polymerase (InGen), 10 pmol of each primer and 2.5 mM MgCl₂ in 50 μl of total reaction volume. Amplification reactions were carried out using Triblock (Biometra) apparatus. Thirty PCR cycles were applied as follows: denaturation – 1 min at 94°C, primer annealing – 1 min at 56°C, elongation – 1 min at 72°C; additional initial denaturation for 2 min at 94°C and final elongation step for 5 min at 72°C [9]. In the case of the singleplex reaction, the amount of template DNA was decreased to 3–5 ng.

The PCR products were made visible by polyacrylamide gel electrophoretic separation (T = 15%, C = 3.1%) in discontinuous buffer boundary according to Lechti-Gallati and Neeser [3]. 8 μl of amplification product was subjected to restriction digestion using 5 U of Kpn I and Alu I restriction endonucleases (Promega) at 37°C for 60 min. Digestion products were separated by polyacrylamide electrophoresis in the presence of length marker – pGEM (Promega) for about 2 hours in a constant current of 16 mA and temperature 10°C. Detection was performed using the silver staining method [10].

RESULTS AND DISCUSSION

It was shown that for the described multiplex reaction, the optimal primer concentration equals 10 pM, MgCl₂ concentration equals 2.5 mM, and the amount of template DNA should equal 20 to 50 ng. It was noted that in around 10% of studied samples, PCR amplification resulted in unspecific DNA fragments of various lengths, which were also (but only above 600 bp)

described by Tun et al. [9], but in their opinion, these unspecific products had no influence on restriction digestion. The authors of this paper, however, conclude that additional unspecific PCR fractions may negatively influence the digestion process (possibly because some of the unspecific amplicons were shorter than 600 bp), which created some difficulties with interpretation of results. In the case of singleplex PCR reactions, unspecific fractions were not observed and correct PCR products were obtained when DNA template input to the PCR reactions was significantly smaller (3–5 ng).

The second crucial factor influencing the result of genotyping is attaining complete digestion of PCR products with two restriction enzymes, Kpn I and Alu I. Application of buffer that is optimal for one of the enzymes leads to 25 to 50% loss of activity of the second restriction endonuclease, which may be the cause of incomplete digestion of PCR products and errors in interpretation of obtained results. In order to avoid these kinds of errors digestion must be performed in two separate reactions, or there must be additional control (internal digestion), enabling monitoring of the degree of digestion.

Results of genotyping of alleles AB0 obtained in the multiplex reaction are presented in Figure 1. Figure 2 presents digestion products obtained after singleplex PCR reactions.

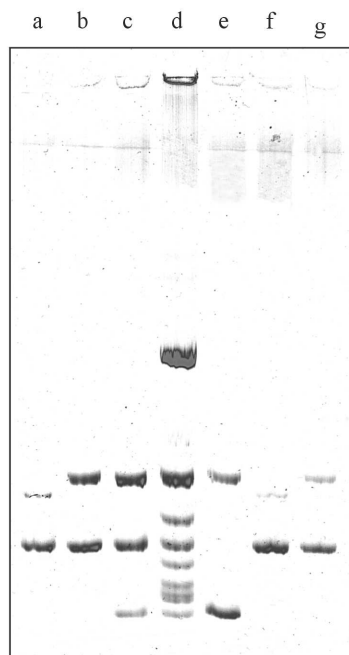


Fig. 1. Results of AB0 genotyping by multiplex PCR. Lines: a – 00; b – AA; c – AB; d – unspecific bands; e – BB; f – 00; g – AA.

The method of genotyping of the AB0 blood group system applied enables differentiation of six genotypes: A0, AA, B0, BB, 00 and AB [4].

It is well known that primers 1 and 2 cover nucleotide position 261, whose absence or presence causes the occurrence of the restriction site (GGTACC) for enzyme Kpn I, and during amplification generate DNA fragments of length 199 bp or 200 bp. So, DNA fragments 199 bp long with restriction site for Kpn I (i.e. the sequence for allele 0) are completely digested by this enzyme, yielding two fragments of 171 bp + 28 bp and are interpreted as homozygote 00. However, in the mixture of fragments of 199 bp and 200 bp, only the first fragment (199 bp) is digested, which

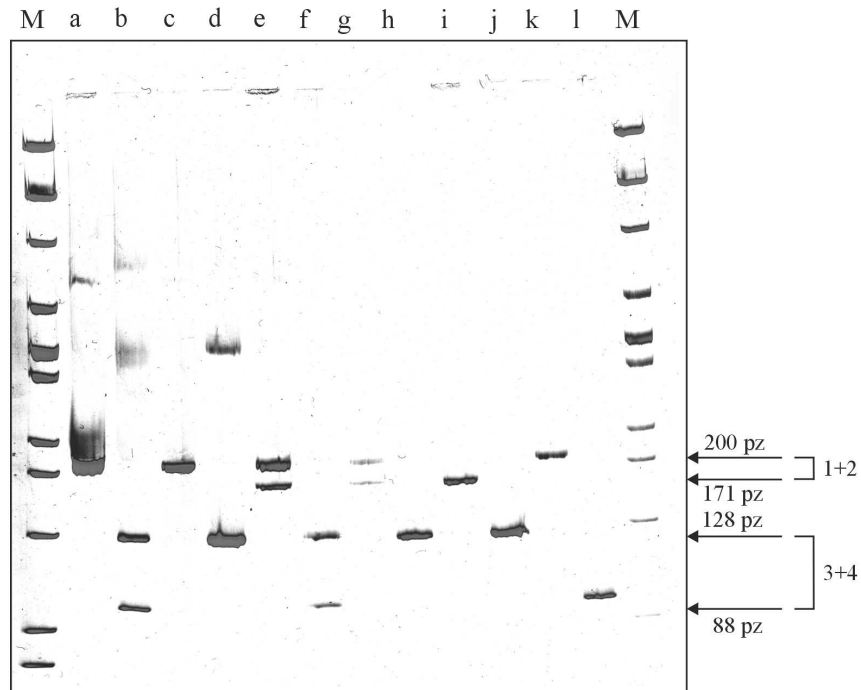


Fig. 2. Results of AB0 genotyping by monoplex PCR. Lines: M-size marker: pGEM; a, b –AB; c, d – AA; e, f – B0; g, h – A0; i, j – 00; k, l – BB.

is ultimately interpreted as heterozygote A0 or B0, because after digestion fragments of 200 bp, and 171 bp + 28 bp are obtained.

It is also known that primers 3 and 4 generate fragment 128 bp, which covers substitution G → A in position 703 of cDNA. If this substitution occurs in position 703, a restriction site for enzyme Alu I arises, i.e. nucleotide sequence AGCT, which is specific for allele B. Complete digestion of this fragment enables determination of the homozygote BB, which is characterised by two fragments (88 bp + 40 bp). Partial digestion of this fragment (resulting in digestion products of 128 bp, 88 bp + 40 bp) indicates, on the other hand, heterozygote AB or B0, whilst lack of digestion testifies to lack of allele B, and so to the presence of genotypes AA, A0 or 00.

A schema of genotyping on the basis of the principles described above is presented in Table I.

TABLE I. INTERPRETATION OF ABO GENOTYPES BY THE PCR-RFLP PROCEDURE

Genotype	Primers (1 + 2)		Primers (3 + 4)	
	Restriction enzyme Kpn I		Restriction enzyme Alu I	
	Result of digestion	Fragments	Result of digestion	Fragments
00	Complete	171 pz	No digestion	128 pz
A0	1/2	200 pz + 171 pz	No digestion	128 pz
AA	No digestion	200 pz	No digestion	128 pz
B0	1/2	200 pz + 171 pz	1/2	128 + 88 pz
BB	No digestion	200 pz	Complete	88 pz
AB	No digestion	200 pz	1/2	128 + 88 pz

The above mentioned schema was the basis for determination of the ABO genotypes in 52 studied bloodstains. Results of comparative analysis of genotyping of the ABO blood group system and its serological determination are presented in Table II. From this table one can conclude that in all, even the oldest 15-year-old, researched bloodstains, genotyping using the methodology described above was possible, and in each case comparison revealed concordance of the genotype with the phenotype determined earlier with the serological technique.

TABLE II. RESULTS OF ABO GENOTYPING IN 52 BLOODSTAINS

Sample	Phenotype	Genotype	Sample	Phenotype	Genotype	Sample	Phenotype	Genotype
1/85	0	00	18/95	0	00	35/00	A	AA
2/85	0	00	19/95	A	AA	36/00	A	A0
3/85	A	A0	20/95	A	A0	37/00	A	A0
4/85	A	A0	21/95	B	B0	38/00	A	AA
5/85	B	B0	22/95	B	B0	39/00	A	A0
6/85	B	BB	23/95	AB	AB	40/00	A	A0
7/85	AB	AB	24/95	AB	AB	41/00	B	B0
8/85	AB	AB	25/98	AB	AB	42/00	AB	AB
9/90	0	00	26/98	AB	AB	43/00	0	00
10/90	0	00	27/98	AB	AB	44/00	A	A0
11/90	A	A0	28/98	AB	AB	45/00	0	00
12/90	A	AA	29/98	A	A0	46/00	B	B0
13/90	B	B0	30/98	A	A0	47/00	B	B0
14/90	B	B0	31/98	A	A0	48/00	A	A0
15/90	AB	AB	32/98	A	AA	49/00	AB	AB
16/90	AB	AB	33/98	A	A0	50/00	AB	AB
17/95	00	00	34/98	A	AA	51/00	A	A0
						52/00	0	00

One has to take into account, however, that in the case of blood group O determination using DNA based techniques and serological methods, a divergence in obtained results may arise. The reason for this is the theoretical possibility of allele O^2 appearing (a variant of allele O)¹, which, in position 261, is identical to allele A [7]. The frequency of this allele in the Polish population has still not been ascertained. However, one can expect that the frequency is similar to that observed for the German population, where it equals 0.0027 [6]. When genotyping, there is about a 3% risk of wrong classification of allele O^2 as allele A, but this danger may be avoided by additional analysis of nucleotide position 802, performed for all results of genotyping resulting in allele A. Allele O^2 differs from allele A by substitution $G \rightarrow A$ exactly in this position [6].

It is known that the discrimination power of the ABO system is low in comparison to STR systems, and moreover genotyping of the ABO system is much more laborious and expensive². Additionally, the practical usefulness of ABO genotyping for identification studies of biological traces using methodology described in this paper is limited, because (apart from interpretation problems described above) this method does not allow differentiation of alleles A_1 and A_2 . This fault may also be overcome by analysis of an additional mutational position.

During investigations, however, situations occur, where determination of the ABO blood group is extremely important. Such a situation arises, for example, when the only known feature of the dead person which can lead to positive identification is the blood group. Another example of the practical application of ABO genotyping is cases where the phenotype ABO of the alleged perpetrator or suspect is known, but tiny amounts of trace do not allow determination of the ABO phenotype by the trace consuming serological method. Then the high cost of analysis is justified, and in such situations the authors have applied the described methodology.

In the first case it was necessary to determine the ABO genotype of a new-born baby, since the initial identification of parents (based on interview) concerned only the ABO genetic marker. Results of serological studies of the new-born baby only weakly suggested the presence of group O, and attempts to determine its phenotype using serological techniques applied to analysis of pieces of bones failed. Positive results of ABO genotyping (blood group OO) were obtained applying DNA analysis to DNA template extracted from the endosteal part of flat bones.

¹ Nine of researched bloodstains had blood group O, but in none case allele O^2 was identified.

² On the basis of cost of experiments it was assessed that genotyping of one single sample in the range of the ABO system is three times more expensive than simultaneous genotyping of three STR markers.

In the second case the ABO blood grouping had to be determined from a very small bloodstain (which ruled out use of serological methods). During routine investigation, the blood group of a potential suspect had been established as group O. So it was decided that, before formally accusing this person (which would then enable collection of reference material) in order to limit the risk of a prosecution mistake, DNA technology would be applied to analyse the bloodstain: this turned out to originate from an individual of genotype OO.

References:

1. Gaensslen R. E., Lee H. C., Genetic markers in human bone tissue, *Forensic Science Review* 1990, vol. 2, pp. 125–145.
2. Hauser R., Raszeja S., Pawłowski R. [et al.], Mikrobielle Kontamination der Antigene ABO im Knochengewebe, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1984, Bd 92, S. 189–197.
3. Lechti-Gallati S., Neeser D., Efficient and reliable PCR-based detection of ABO blood group alleles: Genotyping on stamps and other biological evidence samples, *Journal of Forensic Sciences* 1996, pp. 653–657.
4. Lee J. C., Chang J. G., ABO genotyping by polymerase chain reaction, *Journal of Forensic Sciences* 1992, vol. 37, pp. 1269–1275.
5. Melvin J. R., Kateley J. R., Oaks M. K. [et al.], Forensic science handbook, vol. II, Saferstain R. [ed.], Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1988, pp. 273–346.
6. Nishimukai H., Fukomori Y., Okiura T. [et al.], Genotyping of the ABO blood group system: analysis of nucleotide position 802 by PCR-RFLP and distribution of ABO genotypes in German population, *International Journal of Legal Medicine* 1996, vol. 109, pp. 90–93.
7. Ringel P. F., Wieler G., Bein G., Errors in ABO typing of blood stains using PCR, *International Journal of Legal Medicine* 2000, vol. 113, pp. 352–355.
8. Sasaki M., Shino H., ABO Genotyping of suspects from sperm DNA isolated from postcoital samples in sex crimes, *Journal of Forensic Sciences* 1996, vol. 41, pp. 275–278.
9. Tun Z., Honda K., Nakatome M. [et al.], Rapid and clear detection of ABO genotypes by simultaneous PCR-RFLP method, *Journal of Forensic Sciences* 1996, vol. 41, pp. 1027–1030.
10. Wiegand P., Budowle B., Rand S. [et al.], Forensic validation of the STR systems SE 33 and TH01, *International Journal of Legal Medicine* 1993, vol. 105, pp. 315–320.
11. Yamamoto F., Clausen H., White T. [et al.], Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system, *Nature* 1990, vol. 345, pp. 229–233.
12. Yamamoto F., McNeil P. D., Hakomori S., Human histoblood group A₂ transferase coded by A₂ allele, one of the A subtypes, is characterized by single base deletion in the coding sequence, which results in an additional domain at the carboxylterminal, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992, vol. 187, pp. 366–374.

OZNACZANIE GENOTYPÓW AB0 W PLAMACH KRWI TECHNIKĄ PCR-RFLP

Marzanna CIESIELKA, Piotr KOZIOL, Roman MAJURO

WSTĘP

Układ grupowy AB0 był pierwszym odkrytym u człowieka markerem genetycznym, który dość szybko został wprowadzony do badań sądowych zarówno przy identyfikacji śladów biologicznych [1, 8], jak również do ustalania spornego ojcostwa [5]. Antygeny AB0 obecne są na błonie komórkowej większości tkanek, a w rozpuszczalnej formie mogą występować również w wydzielinach organizmu. Ich silna ekspresja ma istotne znaczenie w życiu człowieka (immunizacja płodowa, transfuzja, transplantacja), co powoduje, że układ AB0 jest markerem powszechnie oznaczanym, w związku z czym grupa krwi była lub jest często odnotowywana w różnych dokumentach (np. dowodach osobistych, kartach informacyjnych ze szpitali, prawach jazdy itp.).

Oznaczanie układu AB0 we krwi metodą serologiczną pozwala na szybkie, tanie i pewne ustalenie 6 najczęściej występujących fenotypów: A_1 , A_2 , A_1B , A_2B , B i 0. Fenotypowanie AB0 w śladach biologicznych wymaga jednak stosowania absorpcji przeciwciał z aglutynogenami, której wyniki zależą nie tylko od ilości glikolipidowych i glikoproteinowych struktur antygenowych, ale również od stopnia ich degradacji. Dodatkowym problemem jest fakt, że podobne struktury występują w mikroorganizmach. Istnieje zatem możliwość niespecyficznego absorpcji swoistych przeciwciał, zwłaszcza w plamach zdegradowanych przez czynniki biologiczne [2].

W 1990 roku Yamamoto i in. [11] sklonowali cDNA genów $\alpha 1 \rightarrow 3N$ acetylogalaktozaminilo-transferazy i $\alpha 1 \rightarrow 3$ galaktozylo-transferazy, które warunkują antygeny A i B oraz określili ich sekwencję. Wykryli siedem substytucji nukleotydowych (w pozycjach: 297, 526, 657, 703, 796, 803 i 930), co objawia się czterema substytucjami aminokwasowymi w domenie katalitycznej białek, które pozwalają na odróżnienie allele A od allele B. Natomiast allele A różni się od allele 0 pojedynczą delecją w pozycji 261, która jest odpowiedzialna za powstawanie nieaktywnej funkcjonalnie transferazy 0 [11]. Allel A obejmuje kilka podtypów, z których najczęściej spotykane są A_1 i A_2 , a sekwencja kodująca dla transferazy A_2 różni się od sekwencji dla transferazy A_1 substytucją nukleotydową w pozycji 467 oraz delecją w pozycji 1060 [12]. Te pojedyncze mutacje na poziomie DNA mogą być wykrywane technikami biologii molekularnej z użyciem techniki PCR, co umożliwia oznaczanie układu AB0 w różnych tkankach z minimalnej ilości śladów biologicznych, nawet w znacznym stopniu zdegradowanych.

Celem pracy była optymalizacja warunków PCR dla genów warunkujących układ AB0 i weryfikacja uzyskanych wyników (przez ich porównanie z rezultatami oznaczeń serologicznych) oraz sprawdzenie powtarzalności i wydajności zastosowanej metody.

MATERIAŁY I METODY

Genotypy ABO oznaczono w 52 przygotowanych doświadczalnie plamach krwi, której przynależność grupową ustalono wcześniej metodą serologiczną. 20 plam sporządzono z krwi świeżej w roku 2000, a 32 z użyciem krwi pobranej ze zwłok (po 8 w roku 1985, 1990, 1995, 1998), przy czym materiał dobrano tak, by reprezentowane w nim były różne fenotypy.

DNA wyizolowano przy pomocy zestawu do izolacji genomowego DNA ze śladów biologicznych (A&A Biotechnology). Ilość uzyskanego DNA określono metodą *dot-blot* i hybrydyzacji z sondą D17Z1 wyznakowaną biotyną przy użyciu zestawu Quantitation System, Gibco BRL, zgodnie z instrukcją producenta. Do amplifikacji DNA użyto starterów według Lee i Chang [4]:

dla fragmentu 199 (lub 200) pz:

- starter 1: 5' – CA CCG TGG AAG GAT GTC CTC – 3',
- starter 2: 5' – AAT GTC CAC AGT CAC TCG CC – 3',

a dla fragmentu 128 pz:

- starter 3: 5' – TGG AGA TCC TGA CTC CGC TG – 3',
- starter 4: 5' – GTA GAA ATC GCC TCG TCC TT – 3'.

W pierwszym etapie badań ustalono warunki amplifikacji. Optymalizacja reakcji PCR objęła stężenia DNA od 0,5 ng do 100 ng oraz stężenia starterów w zakresie: 5, 10, 15, 20, 25, 30 pM, a dobieranie parametrów dotyczyło zarówno reakcji „multipleksowej” (tj. jednoczesnego namnażania obu fragmentów 199–200 pz i 128 pz) jak i oddzielnych amplifikacji. Stężenie $MgCl_2$ dobierano tylko dla reakcji „multipleksowej” w zakresie: 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM. Reakcje z użyciem jednej pary starterów nie wymagają bowiem dodatkowej obecności $MgCl_2$.

Zoptymalizowana mieszanina reakcyjna, którą w drugim etapie badań użyto do „multipleksowego” genotypowania śladów krwi, zawierała 20–50 ng DNA, 200 μ M każdego z dNTP, 5 μ l buforu, 2,5 U Taq DNA polimerazy (InGen) i 10 pmola każdego ze starterów oraz 2,5 mM $MgCl_2$ w objętości 50 μ l. Amplifikację prowadzono przy użyciu urządzenia Triblock (Biometra) w następujących 30 cyklach: denaturacja – 1 min w 94°C, hybrydyzacja starterów przez 1 min w 56°C, synteza nici – 1 min w 72°C; dodatkowo wykonywano denaturację wstępną przez 2 min w temperaturze 94°C i wydłużanie końcowe przez 5 min w temperaturze 72°C [9]. W przypadku reakcji z użyciem jednej pary starterów, ilość DNA zmniejszono do 3–5 ng.

Obecność produktu PCR sprawdzano na żelu poliakrylamidowym (T = 15%, C = 3,1%) w nieciągłym systemie buforowym w sposób podany przez Lechti-Gallati i Neeser [3]. Produkt amplifikacji (8 μ l) trawiono 5 U enzymu Kpn I i Alu I (Promega) w temperaturze 37°C przez 60 min, a uzyskane fragmenty DNA rozdzielano ponownie na żelu poliakrylamidowym w obecności markera wielkości – pGEM (Promega) przez około 2 godziny przy stałym natężeniu prądu 16 mA w temperaturze 10°C. Do detekcji DNA stosowano metodę srebrną [10].

WYNIKI I DYSKUSJA

Wykazano, że dla omówionej reakcji „multipleksowej” optymalne stężenie starterów to 10 pM i 2,5 mM $MgCl_2$, ilość matrycowego DNA powinna natomiast wynosić od 20 do 50 ng. Zauważono przy tym, że w około 10% przebadanych prób w reakcji

PCR generowane były także niespecyficzne frakcje o różnej wielkości, które (tylko powyżej 600 pz) opisali Tun i in. [9], ale ich zdaniem, nie wpływały one na proces trawienia. Z obserwacji autorów wynika jednak, że dodatkowe frakcje utrudniają proces trawienia (być może ze względu na to, że niektóre z nich były mniejsze od 600 pz), co komplikowało interpretację wyników. W przypadku oddzielnych (tj. dla każdej pary starterów) reakcji PCR nie zaobserwowano natomiast niespecyficznych frakcji, a właściwy produkt uzyskiwano ze znacznie mniejszej ilości (bo już z 3–5 ng) DNA matrycowego.

Drugim czynnikiem decydującym o wyniku genotypowania jest uzyskanie całkowitego trawienia produktu PCR dwoma enzymami restrykcyjnymi Kpn I i Alu I. Użycie buforu optymalnego dla jednego z enzymów prowadzi jednak do utraty aktywności o 25–50% drugiego z enzymów, co może być przyczyną niekompletnego trawienia i błędów w interpretacji wyników. Zabezpieczenie się przed tym błędem wymaga zatem trawienia w dwóch oddzielnych reakcjach, bądź dodatkowej kontroli (tj. tzw. trawienia wewnętrznego), pozwalającej na monitorowanie procesu kompletnego trawienia.

Rezultaty genotypowania alleli ABO uzyskane w reakcji „multipleksowej” przedstawiono na rycinie 1. Rycina 2 przedstawia natomiast produkty trawienia uzyskane po reakcjach PCR dla każdej pary starterów.

Zastosowana metoda genotypowania układu ABO pozwala na zróżnicowanie sześciu genotypów: A0, AA, B0, BB, 00 i AB [4].

Wiadomo przy tym, że startery 1 i 2 obejmują pozycję 261 nukleotydu, którego brak lub obecność powoduje powstanie miejsca restrykcyjnego (GGTACC) dla enzymu Kpn I, a w czasie amplifikacji generują fragmenty 199 lub 200 pz. Zatem fragmenty 199 pz z miejscem restrykcyjnym dla Kpn I (tj. sekwencja specyficzna dla allele 0) są całkowicie trawione przez ten enzym do 171 pz + 28 pz i odczytywane jako homozygota 00. Natomiast w mieszaninie fragmentów 199 i 200 pz trawiony jest tylko fragment 199 pz, co jest odczytywane jako heterozygota A0 lub B0, bowiem po trawieniu otrzymujemy wtedy fragmenty 200 pz i 171 pz + 28 pz.

Wiadomo również, że startery 3 i 4 generują fragment 128 pz, który obejmuje substitucję G → A w pozycji 703 cDNA. Jeśli zatem w pozycji 703 wystąpiła ta substitucja, tworzy się miejsce restrykcyjne dla enzymu Alu I, tj. sekwencja AGCT, która jest specyficzna dla allele B. Kompletne trawienie tego fragmentu pozwala więc na oznaczenie homozygoty BB, którą charakteryzują dwa fragmenty (88 pz + 40 pz). Częściowe trawienie tego fragmentu (w wyniku czego powstają produkty o wielkości 128 pz, 88 pz + 40 pz) wskazuje zaś na heterozygoty AB lub B0, a brak trawienia świadczy o braku allele B, czyli o obecności genotypów AA, A0 lub 00.

Schemat genotypowania ABO na podstawie wyżej opisanych zasadach przedstawia tabela I.

Wyżej wymieniony schemat stanowił podstawę do określenia genotypów 52 przebadanych plam krwi. Wyniki konfrontacji genotypowania układu ABO z rezultatami jego serologicznego oznaczania zestawiono w tabeli II, z której wynika, że we wszystkich (nawet najstarszych, tj. piętnastoletnich) przebadanych plamach krwi zdołano ustalić genotyp układu ABO w sposób wcześniej podany, oraz że w każdym przypadku uzyskano zgodność genotypu z fenotypem oznaczonym wcześniej metodą serologiczną.

Należy jednak pamiętać, że w przypadku oznaczenia grupy 0 technikami DNA mogą pojawić się rozbieżności między wynikami fentypowania a genotypowania. Przyczyną tego faktu jest teoretyczna możliwość wystąpienia allela O^2 wariantu allela O ¹, który w pozycji 261 jest identyczny jak allel A [7]. Częstość występowania tego allela w populacji polskiej nie jest nadal znana. Niemniej można oczekiwać, że jest zbliżona do obserwowanej w populacji niemieckiej, gdzie wynosi 0,0027 [6]. Przy genotypowaniu istnieje zatem ok. 3% niebezpieczeństwo zakwalifikowania allela O^2 jako allel A , ale ryzyko to można zlikwidować przez dodatkowe badanie (pozycji 802) wszystkich rezultatów genotypowania z wynikiem A . Allel O^2 różni się bowiem od allela A substytucją $G \rightarrow A$ właśnie w tym miejscu [6].

Wiadomo, że wartość dyskryminacyjna układu ABO w porównaniu z układami STR jest niska, natomiast nakład pracy i kosztów jest wielokrotnie wyższy². Ponadto praktyczna przydatność genotypowania układu ABO w badaniach identyfikacyjnych śladów biologicznych w sposób przedstawiony w tej pracy jest ograniczona, gdyż (oprócz problemów interpretacyjnych, które omówiono wcześniej) nie pozwala na odróżnienie allela A_1 od A_2 . Ten mankament można jednak także wyeliminować, o ile badanie zostanie poszerzone o identyfikację kolejnego miejsca mutacyjnego.

W praktyce dochodzeniowo-śledczej istnieją jednak takie sytuacje, gdy oznaczenie na dowodzie rzeczowym układu ABO jest niezwykle ważne. Ma to np. miejsce, gdy jedyną znaną cechą osoby zmarłej jest jej grupa krwi. Inny przykład celowości genotypowania ABO stanowią przypadki, gdy znany jest fenotyp ABO domniemanego sprawcy lub podejrzanego, a ilość śladu nie pozwala na ustalenie fenotypu ABO metodą serologiczną. Wtedy właśnie uzasadnione są wysokie koszty badań i w tego rodzaju sytuacjach autorzy wykorzystali w praktyce opisaną w pracy metodę genotypowania ABO .

W pierwszej sprawie konieczne było ustalenie genotypu ABO noworodka, gdyż wstępna identyfikacja rodziców (oparta na wywiadzie) dotyczyła jedynie układu ABO , wyniki badań serologicznych noworodka jedynie sugerowały przynależność do grupy O , a ustalenie jego fenotypu metodami serologicznymi w tym układzie z fragmentów kości okazało się niemożliwe. Możliwe okazało się natomiast genotypowanie (z rezultatem OO) w oparciu o badanie DNA, które wyizolowano ze śródkośćca kości płaskich.

W drugim przypadku dobro śledztwa wymagało natomiast ustalenia przynależności grupowej w zakresie układu ABO z bardzo małej plamy krwi (co dyskwalifikowało zastosowanie metod serologicznych). W ramach działań operacyjnych ustalono bowiem, że osoba, którą można było podejrzewać o dokonanie przestępstwa, ma grupę krwi O . W związku z tym przed postawieniem jej zarzutu (co dopiero umożliwiło pobranie materiału porównawczego) zdecydowano się na zmniejszenie ryzyka błędu postępowania przez zbadanie technikami DNA tego mikroślada, który – jak się okazało – pochodził od osoby o genotypie OO .

¹ Wśród przebadanych plam krwi dziewięciokrotnie oznaczono grupę O , ale nie spotkano allela O^2 .

² Na podstawie poniesionych wydatków oszacowano, że genotypowanie jednego śladu w zakresie ABO jest trzykrotnie droższe od jednoczesnego genotypowania trzech układów STR .