

SEQUENCING ANALYSIS OF A NEW ALLELE, D8S1132*15

Grzegorz JEZIERSKI¹, Ryszard PAWŁOWSKI^{1, 2}

¹*Department of Forensic Medicine, Medical University, Gdańsk*

²*Institute of Forensic Research, Cracow*

ABSTRACT: This paper presents a sequence analysis of hitherto unobserved allele 15 of locus D8S1132. During population studies a PCR product was observed that was exactly 4 bp shorter than the shortest allele in the allelic ladder, allele 16. Sequencing analysis revealed the following repetitive sequence: (TCTA)₄TCA (TCTA)₁₁. According to ISFG recommendations, the new detected allele was called D8S1132*15.

KEY WORDS: STR; D8S1132 locus; D8S1132*15 allele; Sequencing.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 83–88

Received 20 August 2001; accepted 12 November 2001

INTRODUCTION

The D8S1132 locus is located at chromosome 8 in position 8pter-8qpter. Wiegand et al. [10] performed sequencing analysis of 31 selected alleles and established that this locus has a complex repetitive sequence of the type: (TCTA)_nTCA (TCTA)_n. One third of the analysed alleles had, in their sequence, the TCTG motif located before the last repeated TCTA unit. During analysis of population samples from Northern Poland, 10 alleles of this locus were observed [6, 7]. The D8S1132 locus is characterised by a high discrimination power ($PD = 0.9622$), which, when compared to PD's of loci widely used in forensic genetics, is second only to that of the ACTBP2 locus [5]. However, the superiority of the first locus is due to the presence of relatively short DNA fragments (130–170 bp) and high sensitivity. A positive amplification result was gained from only 20–50 pg of matrix DNA [9], which makes this system very useful in the analysis of degraded samples and samples with a low amount of DNA.

The aim of this work was to perform sequencing analysis of the new allele of the D8S1132 locus observed during the population studies [6]. Up to the present time this allele has not been observed in the Polish population, and has been described only once in the literature [8], but its presence was not confirmed by sequencing analysis.

MATERIALS AND METHODS

The DNA to be analysed was extracted from blood samples that had been collected as reference material for biological trace analysis.

DNA extraction and quantification was carried out as described previously [4].

The D8S1132 alleles were amplified using specific primers (D8S1132 I: 5'– TET – GGCTAGGAAAGGTTAGCTCGC – 3', D8S1132 II: 5'– CCCTCTCTCTTTCGAGCAAT – 3', IDT, USA) according to methods described by Wiegand et al. [10], using the Applera 2400 thermocycler (USA). The electrophoretic separation of fluorescently labelled PCR products was conducted by capillary electrophoresis using an automatic sequencer ABI Prism310 (Applera, USA) with internal size standard ILS400 labelled with CXR dye (Promega, USA). Sample preparation and separation conditions were described previously [2, 3, 4]. As a reference marker, an allelic ladder (range 16–25), kindly submitted by Dr. W. Pepiński from the Department of Forensic Medicine, Medical University of Białystok, was used.

The sequencing reaction of PCR products was as follows: amplified products of the D8S1132 locus were separated by polyacrylamide gel electrophoresis according to the method described previously [5]. The fraction containing allele 15 was cut out from the gel and incubated in 50 µl of sterile water at a temperature of 56°C for 12 h. 2 µl of extract was used for re-amplification of the D8S1132 locus. The PCR product was purified using Microcon-100 columns (Millipore, USA) according to the manufacturer's instructions. The purified PCR product was subjected to a sequencing reaction using the BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applera, USA). The PCR product was sequenced in both directions, in 20 µl total reaction volume in the presence of 3.2 pmol primer (the same primer that had been used for the PCR reaction). The reaction consisted of 25 cycles: 96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min. The sequencing reaction product was precipitated with an ethanol/sodium acetate mixture. Samples prepared in this way were then separated electrophoretically using an ABI Prism 310 sequencer and 50 µm × 47 cm capillary filled with denaturing polymer POP6. Samples were injected at 2.0 kV for 45 s and separated for 20 min at 15 kV. Electropherograms were analysed using Sequencing Analysis v. 3.4.1 software (Applera, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

During routine analysis of locus D8S1132, a heterozygotic phenotype was identified containing allele 23 and an allele migrating below the shortest allele (D8S1132*16) in the available allelic ladder. Figure 1 presents re-

sults of DNA fragments length determination using the ABI Prism 310 automatic DNA sequencer [6]. Because the unidentified allele was exactly 4 bp shorter than allele 16 present in the ladder, it was supposed that it could be allele 15, which had not been observed previously in the Polish population [7] and had only once been described in the Italian population [8].

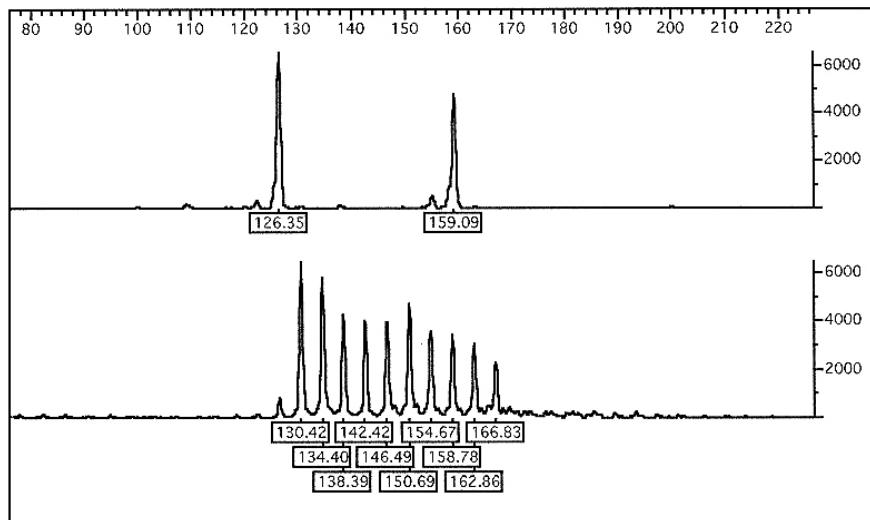


Fig. 1. Electropherogram presenting the separation of fluorescent D8S1132 PCR products. Upper panel: a sample of phenotype 15, 23. Lower panel: allelic ladder (alleles 16–25).

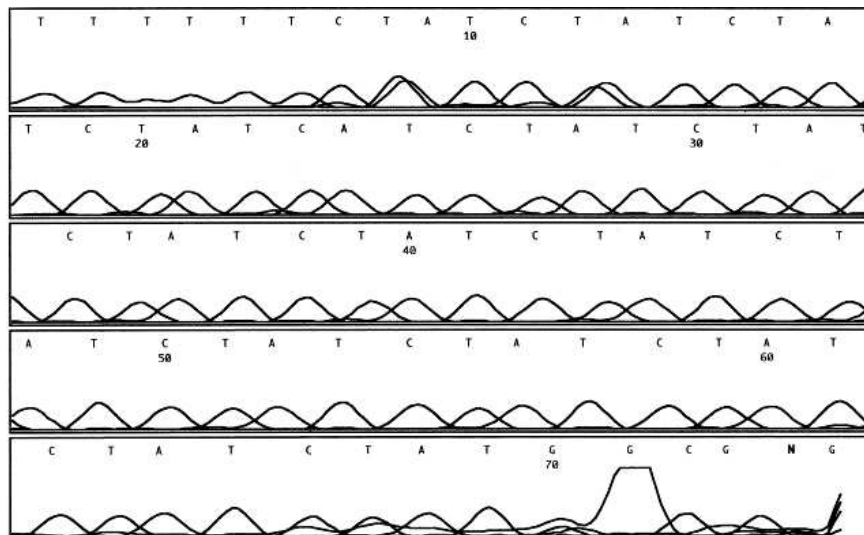


Fig. 2. Electropherogram presenting the repetitive array of the D8S1132*15 allele.

To confirm finally that the observed allele was allele 15 in locus D8S1132, the PCR product was subjected to cycle sequencing. Figure 2 presents an electropherogram obtained as a result of sequencing of the analysed product. Detailed analysis of the electropherogram shows the presence of repeated sequence (TCTA)₄TCA (TCTA)₁₁ consisting of 15 tandem repeats. In the light of the above results, in accordance with ISFG recommendations [1], it was decided that the new product is allele 15.

Data present in Figure 2 shows that the sequencing products did not include the TCTG motif, which was detected in one third of alleles analysed by Wiegand et al. [10]. The rest of the allele sequence was in complete concordance with that observed during sequencing of 31 alleles of locus D8S1132 [10].

References:

1. Bär W., Brinkmann B., Budowle B. [et al.], DNA recommendations – Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 175–176.
2. Pawłowski R., HUMFIBRA allele distribution in Northern Poland using capillary electrophoresis, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 139–141.
3. Pawłowski R., Branicki W., Kupiec T., Y-chromosomal polymorphic loci DYS19, DYS390, DYS393 in a population sample from northern Poland, *Electrophoresis* 1999, vol. 20, pp. 1702–1706.
4. Pawłowski R., Maciejewska A., The forensic validation of multiplex containing nine STRs – population genetics in Northern Poland, *International Journal of Legal Medicine* 2000, vol. 114, pp. 45–49.
5. Pawłowski R., Maciejewska A., Paszkowska R. [et al.], Frequencies for five short tandem repeat (STR) systems in a population from North Poland, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 10–13.
6. Pawłowski R., Żywicka M., Częstości alleli wysoce polimorficznego locus D8S1132 w próbie populacyjnej z obszaru Polski północnej, *Z Zagadnień Nauk Sądowych* 2001, z. XLVIII, s. 74–82.
7. Pepiński W., Niemcunowicz-Janica A., Janica J. [et al.], Population data for the STR systems D8S1132, CD4, VWA and TH01 in the region of Podlasie (northeastern Poland), *Medical Science Monitor* 2001, vol. 7, pp. 130–133.
8. Turrina S., De Leo D., Marigo M. [et al.], Allele frequency distributions for D1S1656, D8S1132, D10S2325, D18S51, and D21S11 loci in a North Italy Population, *Journal of Forensic Sciences* 2001, vol. 46, pp. 191–192.
9. Wiegand P., Kleiber M., DNA typing of epithelial cells after strangulation, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 181–183.
10. Wiegand P., Schneider H. R., Schürenkamp M. [et al.], Tetranucleotide STR system D8S1132: sequencing data and population genetic comparisons, *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 180–182.

ANALIZA SEKWENCJI NOWEGO ALLELA D8S1132*15

Grzegorz JEZERSKI, Ryszard PAWŁOWSKI

WSTĘP

Lokus D8S1132 obecny jest w chromosomie 8 w pozycji 8pter-8qpter. Wiegand i in. [10] zsekwencjonowali 31 wybranych alleli i ustalili, iż locus ten posiada złożoną sekwencję repetytywną typu $(TCTA)_nTCA(TCTA)_n$, przy czym około jedna trzecia badanych alleli posiadała w swej sekwencji motyw TCTG zlokalizowany przed ostatnim powtórzeniem typu TCTA.

Przeprowadzone badania próbki populacyjnej z obszaru Polski północnej wykazały obecność 10 alleli tego lokus [6, 7]. System D8S1132 charakteryzuje się bardzo wysoką siłą dyskryminacji ($PD = 0,9622$), której wartość, w porównaniu do powszechnie używanych w genetyce sądowej *loci*, ustępuje jedynie ACTBP2 [5]. Przewaga pierwszego systemu polega jednak na obecności stosunkowo krótkich fragmentów DNA (130–170 pz) oraz jego wysokiej czułości, gdyż dodatni wynik amplifikacji uzyskiwano już przy 20–50 pg matrycowego DNA [9], co czyni go przydatnym do analizy zdegradowanych śladów biologicznych oraz znikomych ilości DNA.

Celem pracy była analiza sekwencji nowego allela zaobserwowanego podczas badań populacyjnych [6] w zakresie lokus D8S1132. Dotychczas allel ten nie był obserwowany na terenie Polski, a na świecie pojawił się tylko raz [8]; jego obecność nie została jednak potwierdzona przez sekwencjonowanie.

MATERIAŁY I METODY

DNA do analizy izolowano z krwi pobranej jako materiał porównawczy do badań identyfikacyjnych śladów biologicznych. Ekstrakcję oraz pomiar stężenia DNA przeprowadzano metodami opisanymi wcześniej [4].

Amplifikację DNA w zakresie *locus* D8S1132 prowadzono z zastosowaniem odpowiednich starterów (D8S1132 I: 5' – TET-GGCTAGGAAAGGTTAGTCGC – 3', D8S1132 II: 5' – CCCTCTCTTTTCGAGCAAT – 3', IDT, Stany Zjednoczone) według metody podanej przez Wieganda i in. [10], stosując termocykler 2400 firmy Applera (Stany Zjednoczone). Rozdziału znakowanych fluorescencyjnie produktów PCR dokonano metodą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze ABI Prism310 (Applera, Stany Zjednoczone) ze standardem wielkości ILS400 znakowanym CXR (Promega). Przygotowanie próbek i warunki rozdziału opisano uprzednio [2, 3, 4]. Referencyjnym markerem była drabina alleli (w zakresie 16–25) udostępniona przez dr W. Pepińskiego z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Białymstoku.

Sekwencjonowanie produktu PCR wykonywano w następujący sposób: zamplifikowane produkty PCR lokus D8S1132 poddano elektroforezie w żelu poliakryloamidowym według metody opisanej wcześniej [5]. Z żelu wycięto frakcję zawierającą allel 15 i inkubowano w 50 μ l jałowej wody w temperaturze 56°C przez 12

godzin. 2 μ l ekstraktu użyto do kolejnej amplifikacji lokus D8S1132. Produkt PCR oczyszczano na kolumnach Microcon-100 (Millipore, Stany Zjednoczone) według zaleceń producenta. Tak oczyszczony produkt poddano reakcji sekwencjonowania stosując zestaw BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone). Produkt PCR sekwencjonowano w obu kierunkach w 20 μ l mieszaniny reakcyjnej w obecności 3,2 pmola tego samego startera, który użyty był do reakcji PCR. Na reakcję składało się 25 cykli: 96°C przez 10 s, 50°C przez 5 s, 60°C przez 4 min. Produkty sekwencjonowania oczyszczano przez precypitację etanolem w obecności octanu sodu. Tak przygotowane próbki rozdzielano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwencjonatorze ABI Prism 310 w kapilarze 50 μ m \times 47 cm wypełnionej denaturującym polimerem POP6 przy nastrzyku 2,0 kV przez 45 s i późniejszym rozdziale przez 20 min przy 15 kV. Analizę elektroforegramów wykonano, używając programu komputerowego Sequence Analysis v. 3.4.1 (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone).

WYNIKI I DYSKUSJA

Podczas rutynowych analiz lokus D8S1132 zidentyfikowano heterozygotyczny fenotyp zawierający allel 23 oraz allel wędrujący poniżej najniższego allela (D8S1132*16) w dostępnej drabinie. Rycina 1 przedstawia wynik pomiaru wielkości fragmentów na automatycznym sekwencjonatorze DNA ABI Prism310 [6]. Ponieważ nieznanemu allelowi było dokładnie o 4 pozycje krótszy od 16 allela obecnego w drabinie zawierającej sekwencjonowane produkty PCR, istniało przypuszczenie, iż zidentyfikowano allel 15, do tej pory nie obserwowany w Polsce [7]. Na świecie stwierdzono jego obecność tylko jeden raz w populacji włoskiej [8].

W celu jednoznacznego stwierdzenia, czy obserwowany allel jest faktycznie 15 allelem w lokus D8S1132, produkt PCR poddano cyklicznemu sekwencjonowaniu. Rycina 2 przedstawia elektroforegram uzyskany w wyniku sekwencjonowania badanego produktu. Analiza składu nukleotydowego produktu wykazała obecność sekwencji repetytywnej (TCTA)₄TCA(TCTA)₁₁ zawierającej 15 tandemowych powtórzeń. Wobec powyższego, zgodnie z zaleceniami ISFG [1], uznano, iż nowy produkt to allel 15.

Jak pokazuje rycina 2, produkt sekwencjonowania nie zawierał motywu TCTG, który Wiegand i in. [10] obserwowali w 1/3 przebadanych alleli, a pozostała sekwencja allela była w pełni zgodna z tą, którą obserwowano podczas sekwencjonowania 31 alleli lokus D8S1132 [10].