

SOME EXAMPLES OF GENETIC PROFILING OF SALIVA TRACES BASED ON POLYMORPHIC DNA ANALYSIS

Agnieszka PARYS-PROSZEK

Institute of Forensic Research, Cracow

ABSTRACT: This work describes some interesting cases of analysis of saliva traces collected during evidence material examination at the Institute of Forensic Research. The identification process was possible thanks to application of molecular techniques relying on profiling of polymorphic DNA systems using Profiler Plus and SGM Plus commercial kits.

KEY WORDS: Saliva stain; DNA; Microsatellites; PCR.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 109–117

Received 6 August 2001; accepted 14 November 2001

INTRODUCTION

Techniques of molecular biology have been applied to forensic genetics for many years [2, 4, 5]. The superiority of techniques based on DNA analysis over older methodology (classical serology) is indisputable. The latest advances in molecular biology techniques make it feasible to attempt to identify heavily degraded material containing tiny amounts of DNA; they also make possible much more accurate and reliable individualisation of biological traces [7, 8].

The aim of this paper is to describe some interesting cases of genetic analysis of saliva traces collected from evidence material examined at the Forensic Haemogenetics Section of the Institute of Forensic Research in Cracow. Identification studies using this sort of biological material, or more precisely identification of genetic material extracted from epithelial cells present in saliva, was possible thanks to application of molecular techniques allowing microsatellite STR markers profiling.

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of saliva traces collected from postage stamps, a glass and a robber's mask. DNA extraction of the collected traces was car-

ried out using standard organic digestion followed by double phenol extraction and samples concentration by Microcon 100 columns.

The concentration of extracted DNA was measured using the fluorometric method with application of fluorometric dye PicoGreen (Molecular Probes) and Fluoroscan Ascent FL apparatus (Labsystems). The analysed DNA samples were subjected to amplification using commercially available Profiler Plus or SGM Plus kits, based on multiplex PCR amplification of STR microsatellite markers and the amelogenine locus as a sex marker. Amplification was carried out on the Perkin Elmer 9700 thermocycler. 2 microliters of PCR products were added to the 20 microliters of formamide and 0.5 microliters internal DNA standard Rox-500, and subjected to denaturation. Amplified DNA fragments were analysed using the ABI 310 genetic analyser (Perkin Elmer). Results of electrophoretic separation were then analysed by computer programs GenScan analysis 2.1 and Genotyper 2.0.

CASES AND RESULTS DESCRIPTION

Case 1

Saliva traces were sought on postage stamps attached to an envelope supplied as evidence material. The case concerned breaking into and robbery of a photographic shop. The shop owner had received anonymous letters threatening loss of property and life. After his shop had been broken into the prosecutor leading the investigation asked the Institute of Forensic Research to perform comparative analysis in order to establish whether biological material (if any) present on the evidence envelope originated from individual "A", suspected of the robbery.

During the process of examination, two samples were cut from the postage stamps (evidence sample 1 and 2). The results of the performed genetic analysis are presented in Table I.

Results of the genetic analysis of evidence samples collected from postage stamps proved the presence of human DNA material. In the case of evidence sample number 1, the obtained DNA profile was identical with the genetic profile identified in the reference sample from suspect A. The probability of an identical set of DNA alleles occurring in a random unrelated individual from the Caucasian population equals 3.57×10^{-12} (1: 280 billion individuals). This means that the obtained match would be 280×10^9 times more probable if the evidence originates from a suspect than from a random individual from the population, not linked with the scene of the crime.

TABLE I. GENETIC PROFILES OBTAINED USING PROFILER PLUS KIT FOR REFERENCE MATERIAL TAKEN FROM SUSPECTED INDIVIDUAL "A" AND EVIDENCE SAMPLES COLLECTED FROM POSTAGE STAMPS

Polymorphic system	Suspect "A"	Evidence no 1	Evidence no 2
D3S1358	16/18	16/18	14/15/ 16/18 *
VWA	15/17	15/17	15/17/19/20
FGA	20/22	20/22	20/21/22
AMEL	X/Y	X/Y	X/Y
D8S1179	12/13	12/13	9/12/13/14
D21S11	30/32	30/32	29/30/31/32
D18S51	13/14	13/14	13/14
D5S818	11	11	11/12/13
D13S317	8/12	8/12	8/12
D7S820	11/12	11/12	11/12

* Major profile is marked in bold.

Genetic analysis of evidence sample number 2 revealed the presence of a mixture of genetic material. However, the presence of all alleles identified in the profile of the suspected individual was noted in the obtained mixed profile. Moreover, the signal intensity of these alleles (present in the profile of the suspect) was significantly higher than that of the remaining alleles of the mixture. On the basis of genetic analysis of evidence samples number 1 and 2 it was impossible to exclude the hypothesis that the genetic material present in the samples taken from the evidence postage stamps originated from suspect A.

Case 2

A glass secured during the investigation of a flat – a murder scene – was sent to the laboratory in order to perform identification studies. The aim of the expert analysis was to answer a question set by the prosecution concerning the potential presence on the glass of human biological material.

During the examination of the evidence glass, numerous dirty stains, derived most probably from the beverage which had been present inside the vessel, were revealed. Two swabs were taken from the glass. The first one, taken from the glass rim was marked as evidence sample number 1. The second one from the internal side of the bottom of the glass was marked as evidence sample number 2. The results of the analysis are presented in Table II.

TABLE II. GENETIC PROFILES OBTAINED USING SGM PLUS KIT FOR SAMPLES SECURED FROM THE EVIDENCE GLASS

Polymorphic system	Evidence sample no 1	Evidence sample no 2
D3S1358	15/16/17	15/16
VWA	–	14/16/17
FGA	–	21
AMEL	X	X
D8S1179	–	11/13/15
D21S11	–	32.2
D18S51	–	15
D5S818	11	9/11/12
D13S317	–	8/12
D7S820	–	–

Genetic analysis revealed the presence of a DNA mixture derived from at least two female individuals in both analysed evidence samples. DNA degradation and the presence of inhibitors of the PCR reaction are the most probable reasons for the incomplete genetic profiles obtained in the analysed evidence samples.

Case 3

A grocery shop was raided with the use of a dangerous weapon. A robbery mask was found at the scene of the crime. The mask was sent for genetic analysis together with three reference blood samples taken from three suspected males, typed in the course of the police investigation. During the examination of the evidence robbery mask, two samples were cut from places on the mask having the highest probabilities for presence of biological material. Evidence sample number 1 was taken from the area of the mouth hole and evidence sample number 2 from the part of the mask covering the nose. Results are published in Table III.

Genetic analysis of evidence samples number 1 and 2 revealed the presence of a mixture of genetic material derived from at least two individuals, of which one or two were males. The genetic profiles gained in the analysed evidence material were different from the profiles identified in the reference samples taken from suspects A, B, C. On the basis of the obtained results it was possible to exclude the hypothesis that the analysed biological material found on the robbery mask had been left by the suspected males.

TABLE III. GENETIC PROFILES IDENTIFIED USING SGM PLUS KIT IN REFERENCE MATERIAL TAKEN FROM SUSPECTS A, B, C AND OBTAINED FOR SAMPLES CUT FROM EVIDENCE ROBBERY MASK

Polymorphic system	Suspect A	Suspect B	Suspect C	Evidence sample no 1	Evidence sample no 2
D3S1358	17/19	14/17	14/16	15/17*	15/17
VWA	15/19	16/18	14/16	16/17/18/20	16/17/18/20
D16S539	12/13	11/13	9/12	12/14	12/14
D2S1338	23/24	23/24	16/19	17	17
AMEL	X/Y	X/Y	X/Y	X/Y	X/Y
D8S1179	11/13	10/13	14/15	13	13/14
D21S11	28/30	28/29	30	28/30	28/30
D18S51	15/16	16	14/15	16	13/16
D19S433	15	12/15	14	14/15	14/15
TH01	7/9	6/9	6/9.3	6/9/9.3	6/9/9.3
FGA	20/23	20/23	21/23	20/21/22	20/21/22/23

* Major profile is marked in bold.

CONCLUSIONS

The described examples show the huge significance of biological traces containing saliva in identification processes. Numerous reports and scientific publications, and also experience gained in this area at the Institute of Forensic Research underline the great usefulness of this sort of biological material in forensic genetics [3, 6, 10]. Saliva stains subjected to degradation processes, and also samples containing small amounts of biological material and hence tiny amounts of DNA may still serve as a good source of genetic data and be used for comparative identification studies [8, 9]. The presence of inhibitors potentially influencing the PCR reaction (e.g. glue used for postage stamps) does not necessarily lead to negative STR typing. It is possible to gain positive results from genetic analysis largely thanks to the use of appropriate methods of isolating genetic material from secured biological traces [1].

By applying the achievements of molecular biology to forensic genetics, we have been able, in the described examples, to carry out identification studies successfully. If classical techniques had been used, it most probably would not have been possible to gain positive results.

References:

1. Fridez F., Coquoz R. PCR DNA typing of stamps: evaluation of the DNA extraction, *Forensic Science International* 1996, vol. 78, pp. 103–110.

2. Gill P., Jeffreys A. J., Werrett D. J., Forensic application of DNA “fingerprints”, *Nature* 1985, vol. 318, pp. 577–579.
3. Hochmeister M. N., Budowle B., Jung J. [et al.], PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts, *International Journal of Legal Medicine* 1991, vol. 104, pp. 229–233.
4. Jeffreys A. J., MacLeod A., Tamaki K. [et al.], Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing, *Nature* 1991, vol. 354, pp. 204–209.
5. Sasaki M., Shiono H., Fukushima T. [et al.], Human identification by genotyping of personal articles, *Forensic Science International* 1997, vol. 90, pp. 65–75.
6. Sinclair K., McKechnie V. M., DNA extraction from stamps and envelope flaps using QIAamp and QIAshredder, *Journal of Forensic Science* 2000, vol. 45, pp. 229–230.
7. Sullivan K. M., Forensic applications of DNA fingerprinting, *Molecular Biotechnology* 1994, vol. 1, pp. 13–27.
8. Sweet D., Hildebrand D., Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 201–203.
9. Sweet D., Shutler G. G., Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water, *Journal of Forensic Science* 1999, vol. 44, pp. 1069–1072.
10. Walsh D. J., Corey A. C., Cotton R. W. [et al.], Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva, *Journal of Forensic Sciences* 1992, vol. 37, pp. 387–395.

PRZYKŁADY ANALIZY GENETYCZNEJ ŚLADÓW ŚLINY METODĄ BADANIA POLIMORFIZMU DNA

Agnieszka PARYS-PROSZEK

WPROWADZENIE

Od wielu już lat w genetyce sądowej wykorzystuje się z dużym powodzeniem techniki biologii molekularnej [2, 4, 5]. Przewaga technik polegających na analizie DNA nad starszymi metodami (serologia klasyczna) jest bezsporna. Badania z zastosowaniem najnowszych osiągnięć biologii molekularnej pozwalają na wykonywanie prób identyfikacyjnych z materiału silnie zdegradowanego, w którym ilość DNA jest znikoma; pozwalają też na o wiele dokładniejszą i pewniejszą „indywidualizację” śladów biologicznych [7, 8].

Omówienie interesujących przypadków analizy genetycznej śladów śliny zabezpieczonych z dowodów rzeczowych badanych w Pracowni Hemogenetyki Sądowej Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie było celem niniejszego artykułu. Badania identyfikacyjne przy wykorzystaniu tego typu materiału biologicznego, a ściślej identyfikacja materiału genetycznego wyizolowanego z komórek nabłonka, które znajdowały się w ślinie, była możliwa dzięki wykorzystaniu do analizy technik molekularnych pozwalających na oznaczenie markerów mikrosatelitarnych typu STR.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły ślady śliny zabezpieczone ze znaczków listowych, szklanki oraz kominiarki. Technika izolacji DNA z badanych śladów opierała się na standardowej izolacji metodą organiczną z podwójną ekstrakcją fenolową oraz zagęszczaniu próbek z zastosowaniem kolumnienek typu Microcon 100.

Ilość DNA mierzono metodą fluorescencyjną przy użyciu barwnika Pico Green (Molecular Probes) i aparatu Fluorocan Ascent FL (Labsystems). Próbkę poddano amplifikacji przy wykorzystaniu zestawów Profiler Plus lub SGM Plus, pozwalających na oznaczenie w reakcji multipleks PCR markerów mikrosatelitarnych typu STR oraz lokus amelogeniny, będącego wskaźnikiem płci. Amplifikację wykonywano używając termocyklera 9700 (Perkin Elmer). 2 µl produktu PCR dodano do 20 µl formamidu i 0,5 µl standardu wewnętrznego Rox-500, a następnie próbki poddano denaturacji. Zamplifikowane fragmenty DNA analizowano przy użyciu aparatu ABI 310 (Perkin Elmer). Do opracowania wyników rozdziału elektroforetycznego wykorzystano programy komputerowe GenScan Analysis 2.1 i Genotyper 2.0.

OPIS PRZYPADKÓW I OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przypadek 1

Obecności śladów śliny poszukiwano na dostarczonym do badań znaczkach listowych przyklejonych do koperty. Sprawa dotyczyła kradzieży z włamaniem do zakładu fotograficznego. Właściciel sklepu otrzymywał anonimy, w których grożono mu utratą mienia i życia. Po napadzie na jego sklep prokuratura prowadząca śledztwo zwróciła się do Instytutu Ekspertyz Sądowych z prośbą o wykonanie badań porównawczych i próbę ustalenia, czy ewentualny materiał biologiczny zawarty na dostarczonym dowodzie pochodzi od osobnika A, który był podejrzewany o napad.

W trakcie oględzin z plam śliny na znaczkach (ślady 1, 2) wyizolowano DNA i poddano amplifikacji z zastosowaniem zestawu ProfilerPlus. Wyniki analizy genetycznej zamieszczono w tabeli I.

Wyniki analizy genetycznej śladów zabezpieczonych ze znaczków dowiodły obecności materiału pochodzenia ludzkiego. W przypadku śladu nr 1 otrzymany kompletny profil DNA był identyczny z zestawem cech podejrzanego A. Prawdopodobieństwo pojawienia się identycznego zestawu cech DNA u przypadkowej niespokrewnionej osoby w populacji rasy białej wynosiło $3,57 \times 10^{-12}$ (1:280 miliardów osób). Oznacza to, że uzyskanie takiej zgodności było 280×10^9 razy bardziej prawdopodobne, kiedy źródłem śladu był podejrzany, niż przypadkowa osoba nie związana z miejscem zdarzenia.

Analiza genetyczna śladu nr 2 wykazała obecność mieszaniny materiału genetycznego. W otrzymanym profilu znajdowały się wszystkie allele, które oznaczono w materiale genetycznym podejrzanego A, a intensywność sygnału tych alleli w uzyskanym elektroforegramie była wyraźnie wyższa niż pozostałych alleli mieszaniny. Na podstawie analizy genetycznej śladów 1 i 2 nie można było wykluczyć, iż materiał genetyczny, który wyizolowano ze śladów zabezpieczonych ze znaczków, pochodzi od podejrzanego A.

Przypadek 2

Do badań identyfikacyjnych przesłano szklankę zabezpieczoną podczas oględzin mieszkania, w którym dokonano morderstwa. Celem wykonanej ekspertyzy było udzielenie odpowiedzi na pytanie zawarte w postanowieniu, czy na dowodowej szklance można ujawnić obecność materiału biologicznego pozostawionego przez człowieka.

Podczas oględzin ujawniono na szklance liczne zacieki i zabrudzenia pochodzące prawdopodobnie od napoju, który znajdował się w naczyniu. Na jałowe wymazówki pobrano dwa wymazy. Pierwszy, pochodzący z brzegu szklanki, został oznaczony jako ślad nr 1. Drugi, z wewnętrznej strony dna szklanki, opisano jako ślad nr 2. Wyniki analizy zamieszczono w tabeli II.

Przypadek 3

W sklepie spożywczym dokonano napadu z użyciem niebezpiecznego narzędzia. Na miejscu zdarzenia zabezpieczono kominiarkę, którą przysłano do badań genetycznych wraz z trzema próbkami krwi pobranymi od trzech wytypowanych w trakcie czynności śledczych mężczyzn. Podczas oględzin dowodowej kominiarki z miejsc,

gdzie najbardziej prawdopodobne było znalezienie materiału biologicznego, zabezpieczono dwa ślady. Ślad nr 1 wycięto z okolicy otworu na usta, natomiast ślad nr 2 z fragmentu kominiarki przysłaniającej nos. Wyniki zamieszczono w tabeli III.

Analiza genetyczna śladu nr 1 oraz nr 2 pozwoliła stwierdzić obecność mieszaniny materiału genetycznego pochodzącego od co najmniej dwóch osób, z których co najmniej jedna była mężczyzną. Uzyskane profile genetyczne badanych śladów były różne od cech DNA ustalonych w materiale porównawczym pobranym od podejrzanych A, B, C. Na tej podstawie można było wykluczyć pochodzenie śladów pobranych z kominiarki od badanych mężczyzn.

WNIOSKI

Opisane przykłady wskazują, jak olbrzymie znaczenie w procesach identyfikacyjnych mogą mieć ślady biologiczne zawierające ślinę. Liczne doniesienia i publikacje naukowe oraz doświadczenia zebrane w IES podkreślają dużą przydatność tego rodzaju materiału biologicznego w genetyce sądowej [3, 6, 10]. Ze śladów śliny narażonych na procesy degradacyjne oraz próbek zawierających znikome ilości materiału biologicznego, a co za tym idzie, śladowe ilości DNA, możliwe jest uzyskanie profili genetycznych i wykonanie badań porównawczych pozwalających na przeprowadzenie czynności identyfikacyjnych [8, 9]. Obecność inhibitorów mogących mieć wpływ na prawidłowy przebieg reakcji PCR (np. klej pokrywający znaczki) nie zawsze stanowi przeszkodę w oznaczeniu markerów mikrosatelitarnych typu STR. W dużej mierze uzyskanie pozytywnych wyników analizy genetycznej możliwe jest dzięki zastosowaniu właściwej metody izolacji materiału genetycznego z zabezpieczonych do badań śladów biologicznych [1].

Wykorzystanie osiągnięć biologii molekularnej w genetyce sądowej pozwoliło w opisywanych przypadkach na pozytywne przeprowadzenie badań identyfikacyjnych, których wykonanie zapewne nie byłoby możliwe przy zastosowaniu technik klasycznych.