

ANALYSIS OF DOG MITOCHONDRIAL DNA FOR FORENSIC IDENTIFICATION PURPOSES

Wojciech BRANICKI¹, Tomasz KUPIEC¹, Ryszard PAWŁOWSKI^{1, 2}

¹*Institute of Forensic Research, Cracow*

²*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Gdańsk*

ABSTRACT: Shed hairs are among biological traces which are very often associated with crime scenes. Sometimes they are of animal origin and, among these, hairs of domestic animals are most often recovered. Morphological studies applied to identification of animal hairs give very poor results. Currently, however, genetic markers can be applied to distinguish between animal individuals. We present here an application of a previously described technique of analysis of hypervariable region 1 (HV1), the most variable part of animal mitochondrial DNA (mtDNA), for dog identification purposes. Two murder cases where analysis of polymorphic segments of mtDNA helped with the exclusion of suspected dog owners are presented as examples. MtDNA variants determined in evidence hairs shed at crime scenes were compared with variants of reference hairs collected from dogs associated with the suspects.

KEY WORDS: Forensic science; mtDNA; HV1; Dog hair; Sequence analysis.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. L, 2002, 91–98

Received 28 Jun 2002; accepted 6 November 2002

INTRODUCTION

Hairs of non-human origin are sometimes collected at crime scenes. In a situation where animal hair is the only evidence in a forensic case, identification of its origin may play an important role. Morphological studies of hairs carried out in order to differentiate between individuals are not powerful enough to give a positive identification of an individual, and only in rare cases allow an individual to be excluded [2]. Application of genetic markers gives much better results in the identification process [1, 3, 4]. We present here the application of a dog's HV1 sequence analysis for the purpose of identification of dogs' hairs found at two murder scenes. Comparative morphological investigations did not enable exclusion of reference dogs as the origin of evidence hairs, whereas mtDNA variant comparison allowed exclusion in both cases.

MATERIALS AND METHODS

Before the evidence material was analysed, a population of 12 control dogs had been studied, encompassing dogs of the following breeds: Polish Lowland Shepherd, Polish Mountain Shepherd, German Shepherd, Standard Schnauzer, American Staffordshire Terrier, Bullterrier, Siberian Husky, Rottweiler, Smooth Dachshund, Wirehaired Dachshund, German Great Dane, and mongrel.

Approximately one centimetre of the analysed evidence hair was washed in 70% ethanol for 30 min, followed by 30 min washing in distilled water.

DNA was isolated by an organic method followed by phenol: chloroform: isoamyl alcohol extraction and sample concentration using Microcon 100 (Millipore, USA) concentrators. The end volume of the DNA extract equalled 30 μ l.

Amplification of a 300 bp long HVI region was done using the method described by Savolainen et al. with minor modifications [3, 5]. Briefly, the PCR reaction mixture was made up of 1 U Taq polymerase, 200 μ M dNTP, 2.0 μ l 10 \times concentrated PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂ (all by Promega, USA), 0.1 μ M of primers and usually 5 μ l of DNA for 20 μ l reactions. Amplifications were performed in a Perkin Elmer 9700 thermocycler. The reaction conditions were as follows: 2 min at 94 $^{\circ}$ C – initial denaturation, 30, or in the case of hair shafts, 36, cycles of 20 s at 94 $^{\circ}$ C, 30 s at 69 $^{\circ}$ C, 40 s at 72 $^{\circ}$ C and final elongation step for 10 min at 72 $^{\circ}$ C. For nested amplification after 25 cycles using the above described method, 2 μ l of PCR product were then subjected to a further 25 cycles of amplification with internal primers [3] generating a 125 bp fragment (from 131 bp to 255 bp of the previous product). The conditions applied in the second amplification differed only in primer concentration (0.2 μ M) and annealing temperature (65 $^{\circ}$ C).

Amplification products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's directions. Sequencing reactions were performed in a 9700 GeneAmp Perkin Elmer Thermal Cycler, using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, UK).

Detection of sequencing reaction products was carried out on an ABI 310 genetic analyser. Positive and negative controls were added at each stage of analysis.

RESULTS

We analysed a population sample of 12 control dogs, among which 6 variants of the HV1 region were found (Table I). Most frequent variants were

TABLE I. NUCLEOTIDE DIFFERENCES BETWEEN ANALYSED DOG INDIVIDUALS IN THE HV1 SEGMENT OF THE mtDNA CONTROL REGION

Variant/ case	Sample	Polymorphic position												
		5	34.1	53	96	165	182	190	195	197	202	209	213	222
V1	Control (reference)	G	–	C	C	C	T	T	T	A	C	T	A	G
V2	Control	.	–	C	.	G	.	A	.	.
V3	Control	.	–	G	T	A	.	.
V4	Control	.	–	A	.	.
V5	Control	A	–	.	T	T	C	.	.	.	T	G	G	A
V6	Control	.	–	T	G	.	A	.	.
Case 1	Ev 1	A	C	.	T	.	C	.	.	.	T	G	G	A
	Ev 2	A	C	.	T	.	C	.	.	.	T	G	G	A
	Ref	.	–	C	.	G	.	A	.	.
Case 2	Ev 1	Not analysed			G	.	A	.	.	.
	Ref	.	–	C

V 1–6 – variants 1–6;

Ev 1, 2 – evidence material 1, 2;

Ref – reference material;

“.” – Nucleotide position identical with reference sequence;

“–” – Nucleotide position not present in reference sequence;

“Not analysed” – part of sequence not subjected to analysis.

identified in the following breeds: Polish Lowland Shepherd, Standard Schnauzer, German Shepherd – V1, American Staffordshire Terrier, Bullterrier, mongrel – V2, Polish Mountain Shepherd, Siberian Husky, Rottweiler (V4). The remaining dogs had the following variants: Smooth Dachshund – V3, Wirehaired Dachshund – V5, German Great Dane – V6. Variant 1 was chosen as a reference sequence for further comparative study. Two forensic cases are presented here where analysis of mtDNA helped to differentiate between evidence and collected reference material. All analysed hairs were subjected to DNA extraction, amplification and sequencing of the HV1 segment of mtDNA. In each case a suspected individual was selected and several hairs were collected from a dog associated with the suspect. Three reference hairs were analysed for each case. In the second case described here application of more sensitive nested PCR was necessary.

Case 1

The body of a man who had been stabbed to death was found on a staircase near the victim's flat. At the crime scene two animal hairs were recovered; one was found on the victim's shoe and the second was found near the victim's body. Both hairs were stuck to a bloodstain. The blood originating from the victim and the two animal hairs were the only evidence in this case. During the investigation a suspected man was selected and reference hairs were collected from his Staffordshire Terrier. The question was to determine whether DNA from hairs collected at the crime scene matched the Staffordshire's mtDNA variant. Both evidence hairs shared the same variant, which was, however, different from that determined in reference material (variant 2) and so the dog could be excluded as the origin of the evidence hairs (Table I).

Case 2

The body of a strangled woman was found in a forest. It was known that she had stuck on false nails before she left the bar where she worked. During the examination of the victim's body a dog hair was found under one of her false nails. In the course of the investigation a man who had often served as a taxi driver for the victim was selected as a suspect. Reference hairs collected from a Poodle, which belonged to the suspected taxi driver, morphologically matched the evidence hair.

The same technique was applied as in the previous case, but it failed, probably because the amount of DNA extracted from the evidence hair was too small. In the case of samples containing an extremely low level of DNA, nested PCR may be helpful. Sequencing of the second PCR product gave a positive result. Differences in 3 nucleotide positions on the evidence material relative to the reference material were noted and the alleged dog could

be excluded as the potential origin of the evidence hair fragment. Both evidence and reference material showed variants which had not been observed in control samples studied (Table I).

SUMMARY

The two cases described show that the method can be useful in forensic investigations for differentiation between suspected dog individuals. According to literature data [3], the discrimination power of the analysed region equals 0.88 and frequencies of the sequence variants vary between 20.6% and less than 1%. Nucleotide differences observed during this study occurred in the same variable positions as described before by Savolainen et al., with one exception – a single insertion in position 34.1 which has not been observed up till now [3, 5]. The method is extremely sensitive and finds application in differentiation of single hair shafts, which are sometimes associated with scenes of crimes.

References:

1. Menotti-Raymond M. A., David V. A., O'Brien S. J., Pet cat hair implicates murder suspect, *Nature* 1997, vol. 386, pp. 774.
2. Moore J. E., A key for the identification of animal hairs, *Journal of Forensic Sciences Society* 1988, vol. 28, pp. 335–339.
3. Savolainen P., Lundeberg J., Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs, *Journal of Forensic Sciences* 1999, vol. 44, pp. 77–81.
4. Schneider P. M., Seo Y., Rittner C., Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident, *International Journal of Legal Medicine* 1999, vol. 112, pp. 315–316.
5. Savolainen P., Rosen B., Holmberg A. [et al.], Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use, *Journal of Forensic Sciences* 1997, vol. 42, pp. 593–600.

ANALIZA MITOCHONDRIALNEGO DNA PSÓW W CELACH IDENTYFIKACYJNYCH PROWADZONYCH W ASPEKCIE SĄDOWYM

Wojciech BRANICKI, Tomasz KUPIEC, Ryszard PAWŁOWSKI

WSTĘP

Zdarza się, iż na miejscach zdarzeń o charakterze przestępczym zabezpieczane są włosy zwierzęce. W sytuacji, gdy włos zwierzęcy pozostaje jedynym dowodem w sprawie sądowej, identyfikacja jego pochodzenia może mieć istotne znaczenie. Badania morfologiczne włosów prowadzone w celu różnicowania osobników nie są wystarczająco skuteczne, aby zapewnić pozytywną identyfikację osobniczą i tylko w nielicznych wypadkach umożliwiają uzyskanie kategoriernego wyniku wykluczającego [2]. Zastosowanie markerów genetycznych do badań identyfikacyjnych daje znacznie lepsze rezultaty [1, 3, 4]. W niniejszej pracy zaprezentowano zastosowanie analizy sekwencji regionu HV1 psów w celu identyfikacji psich włosów zabezpieczonych dla potrzeb organów procesowych. Przeprowadzone badania morfologiczno-porównawcze nie umożliwiły wykluczenia wytypowanych psów jako źródła dowodowych włosów, podczas gdy analiza porównawcza uzyskanych wariantów mtDNA umożliwiła wykluczenie w obu przypadkach.

MATERIAŁY I METODY

Analiza materiału dowodowego poprzedzona była badaniem 12 psów kontrolnych następujących ras: polski owczarek nizinny, owczarek podhalański, owczarek niemiecki, sznauzer średni, staffordshire terrier, bullterrier, husky, rotwailer, jamnik krótkowłosa, jamnik szorstkowłosa, dog niemiecki oraz badaniem mieszańca.

Analizowane fragmenty włosa o długości ok. 1 cm poddawano procesowi mycia w 70% etanolu przez 30 min, a następnie przez kolejne 30 min w destylowanej wodzie. Izolację DNA prowadzono, stosując metodę organiczną z podwójną ekstrakcją mieszaniną fenol:chloroform:alkohol izoamylowy i zagęszczaniem próbek z zastosowaniem kolumnienek Microcon 100 (Millipore, Stany Zjednoczone). Końcowa objętość ekstraktu DNA wynosiła 30 μ l.

Amplifikację fragmentu o długości 300 par zasad regionu HV1 przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Savolainen i in. z nieznacznymi modyfikacjami [3, 5]. Mieszanina PCR składała się z 1 U Taq polimerazy, 200 μ M dNTP, 2,0 μ l 10 \times stężonego buforu do PCR, 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Stany Zjednoczone), 0,1 μ M stężenia starterów i zwykle 5 μ l matrycy DNA w całkowitej objętości 20 μ l. Amplifikację prowadzono przy użyciu aparatu GeneAmp 9700 firmy Perkin Elmer. Stosowano następujące warunki reakcji PCR: 2 min/94 $^{\circ}$ C – denaturacja wstępna, 30 lub w przypadku trzonów włosów 36 cykli – 20 s/94 $^{\circ}$ C, 30 s/69 $^{\circ}$ C, 40 s/72 $^{\circ}$ C i wydłużanie końcowe przez 10 min w temperaturze 72 $^{\circ}$ C. W przypadku prowadzonej amplifikacji typu „nested” po 25 cyklach z zastosowaniem opisanej powyżej metody,

2 µl produktu PCR poddawano następnie kolejnym 25 cyklom amplifikacji z zastosowaniem starterów wewnętrznych [3] generujących fragment o długości 125 pz (od 131 pz do 255 pz poprzedniego produktu). Warunki zastosowane do drugiej reakcji PCR różniły się jedynie w stężeniu starterów (0,2 M) i temperaturze przyłączania starterów (65 C).

Produkty amplifikacji oczyszczano stosując QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Stany Zjednoczone) i zasady rekomendowane przez producenta. Reakcje sekwencjonowania prowadzono za pomocą aparatu do amplifikacji GeneAmp 9700 z zastosowaniem zestawu BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Wielka Brytania).

Detekcję produktów reakcji sekwencjonowania prowadzono za pomocą analizatora DNA ABI 310. W każdym etapie badań analizowano negatywne i pozytywne kontrole.

WYNIKI

Przeprowadzono analizę próbki populacyjnej 12 psów kontrolnych, spośród których zidentyfikowano obecność 6 wariantów analizowanego regionu HV1 (tabela I). Najczęstsze warianty stwierdzono u psów rasy: polski owczarek niziny, sznaucer średni, owczarek niemiecki – V1, staffordshire terrier, bullterrier, mieszaniec – V2, owczarek podhalański, husky, rottweiler – V4. Pozostałe psy miały następujące warianty: jamnik krótkowłose – V3, jamnik szorstkowłose – V5, dog niemiecki – V6. Wariant określony cyfrą 1 wybrano jako sekwencję odniesienia wykorzystywaną w dalszych badaniach porównawczych. Niniejsza praca prezentuje dwa przypadki, w których analiza mtDNA była podstawą zróżnicowania włosów dowodowych i porównawczych. Wszystkie analizowane włosy zostały poddane izolacji DNA, amplifikacji i sekwencjonowaniu segmentu HV1 mitochondrialnego DNA. W trakcie prowadzonego śledztwa w opisanych sprawach wytypowano podejrzanych i w charakterze materiału porównawczego pobrano kilkanaście włosów od psów z nimi związanych. Trzy włosy porównawcze analizowano jako materiał porównawczy. W drugim opisanym tu przypadku konieczne było zastosowanie czulszej metody „nested PCR”.

Przypadek 1

Ciało mężczyzny śmiertelnie ugodzonego nożem znaleziono na klatce schodowej w pobliżu mieszkania ofiary. Na miejscu zdarzenia zabezpieczono dwa włosy zwierzęce; pierwszy ujawniono na bucie ofiary, a drugi w pobliżu ciała. Obydwa włosy były przyklejone do plam krwi. Krew ofiary i dwa włosy zwierzęce stały się jedynymi dowodami w sprawie. Podczas dochodzenia wytypowano podejrzanego mężczyznę i od należącego do niego psa rasy staffordshire terrier pobrano włosy porównawcze. Pytanie, na które należało odpowiedzieć, sprowadzało się do określenia, czy DNA stwierdzone we włosach zabezpieczonych na miejscu zdarzenia jest zgodne z wariantem mtDNA, który posiada staffordshire. W wyniku przeprowadzonej analizy ustalono, iż obydwie włosy dowodowe posiadają ten sam wariant, jednak odmienny od tego, który stwierdzono w materiale porównawczym (wariant 2), a zatem pies mógł zostać wykluczony jako źródło włosów dowodowych (tabela I).

Przypadek 2

W lesie znaleziono ciało uduszonej kobiety. Jak ustalono, kobieta ta przed wyjściem z baru, gdzie pracowała, przykleiła sztuczne paznokcie. W trakcie prowadzonych oględzin ciała ofiary pod paznokciem znaleziono włos pochodzący od psa. W trakcie dochodzenia wytypowano podejrzanego – taksówkarza, który często podwoził ofiarę. Włosy porównawcze, które pobrano od pudła należącego do taksówkarza, morfologicznie były zgodne z dowodowym włosem.

Metoda, którą zastosowano w poprzednim przypadku, zawiodła w tej sprawie, co prawdopodobnie było spowodowane przez zbyt niskie stężenie DNA w dowodowym włosie. W przypadku próbek zawierających wyjątkowo małe ilości DNA dobre rezultaty analizy można uzyskać, stosując tzw. „nested PCR”. Sekwencjonowanie produktu drugiej amplifikacji dało pozytywny rezultat. Analiza wykazała różnice w materiale dowodowym względem analizowanego materiału porównawczego w trzech pozycjach nukleotydowych, co dało podstawy do wykluczenia domniemanego psa jako ewentualnego źródła analizowanego fragmentu włosa dowodowego. Zarówno w materiale dowodowym, jak i porównawczym, stwierdzono obecność wariantów DNA nie obserwowanych pośród analizowanych próbek kontrolnych (tabela I).

PODSUMOWANIE

Opisane w niniejszej pracy dwa przypadki ukazują, iż metoda może być użyteczna w badaniach sądowych i znajduje zastosowanie do różnicowania włosów dowodowych i porównawczych pochodzących od psów. Zgodnie z danymi publikowanymi w literaturze [3], siła dyskryminacji analizowanego regionu wynosi 0,88, a częstość wariantów waha się od 20,6% do wartości wynoszącej poniżej 1%. Obserwowane różnice w sekwencjach nukleotydowych występowały w zmiennych pozycjach opisanych uprzednio przez Savolainena i in. z jednym wyjątkiem – była nim pojedyncza insercja w pozycji 34.1, której dotychczas nie obserwowano [3, 5]. Metoda jest bardzo czuła i znajduje zastosowanie w różnicowaniu pojedynczych włosów, które są czasami zabezpieczane na miejscach zdarzeń o charakterze przestępczym.