



## **CAPILLARY ELECTROPHORESIS SIZING PRECISION OF MULTIPLEX SHORT TANDEM REPEAT SYSTEMS USING DIFFERENT INTERNAL SIZE STANDARDS AND MATRIX TYPES**

Ryszard PAWŁOWSKI<sup>1,2</sup> Agnieszka MACIEJEWSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Forensic Medicine, Medical University, Gdańsk*

<sup>2</sup> *Institute of Forensic Research, Krakow*

### **Abstract**

One of the critical elements strongly influencing correct DNA typing using capillary electrophoresis is precision of analysis. Modern commercially available multiplex kits use highly discriminating STR systems containing alleles differing in size by 1 or 2 nucleotides. Confident distinguishing of such alleles requires high precision of analysis. In the case of commercially available multiplex kits, unsatisfactory precision was observed. The main aim of this work was to compare precision and accuracy of DNA typing using commercially available multiplex kits containing complex STR loci with three different DNA internal standards: the GS500, ILS400 and ILS600. The influence of polymer type on accuracy and precision of analysis was also investigated. It was found that application of commercially available internal lane standard ILS600 significantly improves analysis precision.

### **Key words**

Capillary electrophoresis; Sizing precision; Profiler Plus; SGM Plus; ILS600; GS500.

*Received 19 June 2007; accepted 4 September 2007*

### **1. Introduction**

The introduction of the multiplex PCR technique has made simultaneous, quick and robust amplification of many DNA loci possible [3, 5, 10, 11, 13, 16, 21, 22]. Reproducible DNA typing of STR markers requires high resolution separation and the use of an appropriate internal sizing standard. Internal standard DNA fragments should migrate in a predictable manner and should have mobility, which is a function of their molecular weight. In forensic genetics, DNA sizing precision is much more important than sizing accuracy when comparing samples and when a match of DNA profiles has to be declared. As precision of analysis increases, so too does confidence in DNA typing. Bad precision can cause two identical length DNA fragments to be typed as two different alleles or, con-

versely, it can cause two different alleles to be read as identical ones. One of the most frequently used internal DNA standards for DNA fragment length measurements is the GS500. However, several studies have shown that the inter-gel reproducibility for complex STRs measured against the internal standard GS500 using ABI310 is not sufficient for confident typing of alleles [1, 7, 8]. High precision is extremely important when discriminating alleles differing in size by 1 or 2 bps. Such systems are included for instance in the Profiler Plus, SGM Plus, PowerPlex and SEfiler kits [4, 6, 7, 20].

Size comparison of DNA fragments which may differ in length by as little as 1 nucleotide requires standard deviations of 0.17 ( $1/6 = 0.17$ ) nucleotide to ensure ascertainment of a match or absence of match between the tested alleles with 99.27% probability.

Among the main factors affecting precision of resolution of DNA fragments are the type of polymer and internal standard, and also the type of locus tested. Currently used CE methods for multiplex PCR alleles detection are based on comparison of unknown alleles to allelic ladder standards, calibrated using a dedicated internal DNA standard like GS500 (e.g. Profiler Plus, SGM Plus, Identifiler, SEfiler). In our experience, this marker does not allow satisfactory precision to be achieved in cases where unambiguous differentiation of alleles differing by 1 or 2 bps is necessary, as in the case of the very polymorphic SE33 locus.

The main purpose of the performed experiments was to investigate the influence of alternative internal standards on precise identification of STR alleles present in commercially available kits. Several other internal DNA sizing standards have recently appeared on the market. These include, for instance, ILS400 and ILS600, which are characterised in comparison to the commonly used GS500 internal standard by a higher number of more equally distributed fragments. We decided to compare the precision and accuracy of DNA typing using commercially available multiplex systems containing complex STR loci with three DNA internal standards: the GS500, ILS400 and ILS600.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Analysed samples

Profiler Plus and SGM Plus allelic ladders were used as a source of sequenced DNA fragments. Profiler Plus allelic ladder contains 118 alleles (10 loci) in a DNA fragment range from 107 to 341 bp. SGM Plus allelic ladder contains 159 alleles (11 loci) in a DNA fragment range from 107 to 353 bp.

In order to assess the size distribution of the DNA fragments obtained by the capillary electrophoresis method on the ABI310 apparatus, multiple injections of the same sample (allelic ladder) were carried out. Samples were injected at least 15 times on the same capillary (within-capillary precision) or at least 35 times on different capillaries and different gel batches (inter-capillary precision). GS500, ILS400 and ILS600 sizing standards were used to compute the size of the tested allelic ladders.

### 2.2. Capillary electrophoresis on ABI310 Genetic Analyser

1  $\mu$ l of allelic ladder was mixed with 12  $\mu$ l of deionised formamide (Amresco, USA) and 1  $\mu$ l of in-

ternal DNA size standard GS500 labelled with ROX (PE USA) or Internal Lane Standard 400 (ILS400) or ILS 600 labelled with CXR (Promega, USA). Before electrophoresis, samples were denatured for 3 min at 95°C and subsequently snap-cooled on ice. Electrophoretic separations were conducted in an ABI Prism 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems USA. The samples were run on 47 cm long capillaries (20–350 injections) filled with denaturing polymer POP4 or POP6. For POP4 and POP6 polymers, GSSTRPOP4 module with filter F and SeqPOP6 Rapid module with filter A were used respectively. The separations were run for 24 min at 15 kV, 9 mA and 10 mW for POP4 polymer and 36 min at 15 kV, 9 mA and 10 mW for POP6 polymer. Application of a new internal standard labelled with CXR required the creation of a new matrix.

The capillary electrophoresis data were analysed using the computer program GeneScan v. 2.1 (PE). The local southern method was used as a size calling method. For calibration curve construction with GS500 as an internal standard (35–500 bp), all DNA fragments were used except 250 bp. In the case of ILS 400 and 600, all fragments were used.

### 2.3. Statistics

For purposes of comparison, the obtained series of data were subjected to statistical calculations.

The standard deviation, Pearson's correlation coefficient and *RSQ* coefficient (square of the Pearson correlation coefficient of two data sets) were calculated using Excel.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Sizing precision of Profiler Plus and SGM Plus loci with GS500 and ILS600 internal standards in POP4 polymer

It has been shown that inter-gel or inter-capillary reproducibility (ABI310) for complex highly polymorphic STRs measured against the GS500 is not sufficient for confident typing of alleles differing in size by 1 bp only [9, 18, 23]. There is no simple dependence of precision analysis on allele size or type or repeat sequence. It was observed [23], for instance, that in the case of VWA and CSF1PO loci containing the same repeat sequence (AGAT), labelled with the same fluorescent marker (JOE), precision for CSF1PO (281–317 bp size range) is almost 3 times better than for the VWA locus (127–167 bp size range). Bad precision for highly discriminating loci containing long

alleles differing in size by 1 and 2 bps could lead to alleles mistyping and severe legal consequences.

Figure 1 shows comparison of sizing precision of Profiler Plus loci analysed with GS500 and ILS600 internal standards for inter-capillary runs. For all analysed loci, precision obtained with ILS600 was significantly better than with GS500. In the case of ILS600, *SD* values were in the range 0.06–0.16 nt and for GS500 in the range 0.17–0.75 nt. For GS500, an increase in *SD* values with increasing allele lengths was observed and surprisingly no such trend was observed for ILS600, where all obtained *SD* values were present within the narrow range of 0.1 nt.

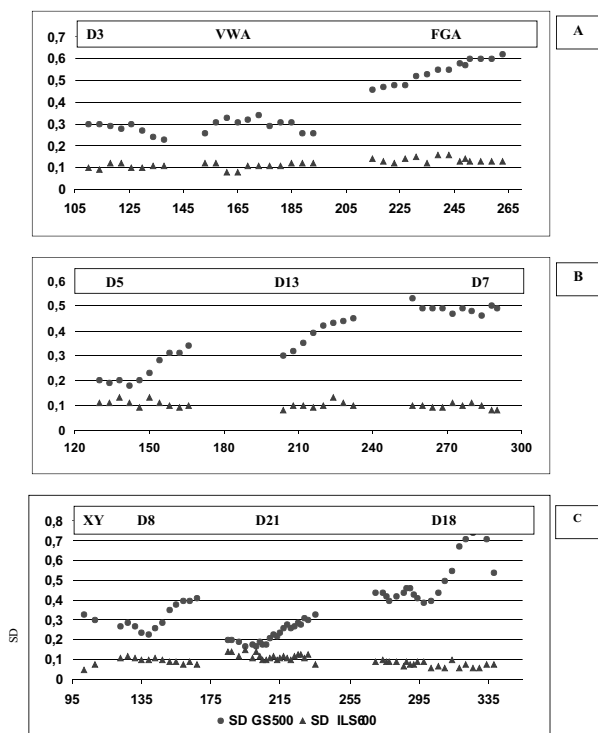


Fig. 1. Sizing precision of Profiler Plus allelic ladders with GS500, ILS600 internal standards and POP4 matrix. Loci present in blue (panel A), yellow (panel B) and green (panel C) allelic ladders. Y axis – *SD*, X axis – DNA length in bps.

Similar results were obtained for loci present in another commonly used kit, SGM Plus. *SD* ranges and average *SD* values were 0.08–0.33 nt and 0.195 nt for GS500 and 0.01–0.23 nt and 0.08 nt for ILS600. For all analysed SGM Plus loci except FGA alleles, observed *SD* values were below 0.15 nt (with ILS600). Values above 0.15 nt in the case of the FGA locus were observed only in 9 out of 28 analysed alleles and almost all were present for very large FGA alleles, which are very rarely observed in populations.

### 3.2. Correlation of retention time with allele sizes for three analysed internal DNA standards

It was shown that if better correlation of internal standard DNA lengths with peak arrival time exists, then better calibration curves and thereby sizing can be achieved [14, 15, 24]. Figure 2 shows the correlation between retention time and size for three internal standards run on POP4 polymer.

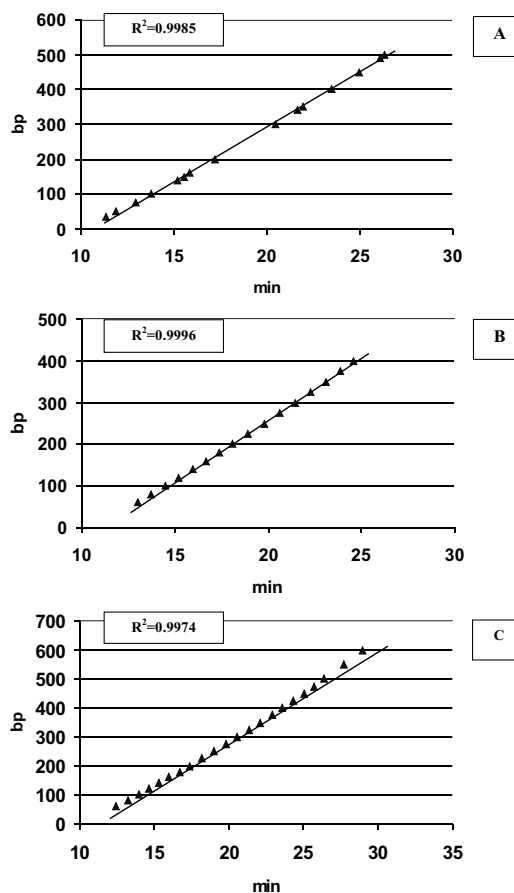


Fig. 2. Comparison of retention times vs. fragment size plots for three internal DNA standards: GS500 (panel A), ILS400 (panel B) and ILS600 (panel C) run on POP4 matrix.

Non-linear correlation between retention time and size (molecular weight) of GS500 DNA fragments was observed. The calculated correlation coefficient was 0.9985 (Figure 2 upper panel). Pearson's correlation coefficient for the ILS600 was similar to the GS500 ( $R^2 = 0.9974$ ). The best linearity was obtained for the ILS400. The calculated correlation coefficient was almost 1 ( $R^2 = 0.9996$ ). A possible cause of the lowest *RSQ* coefficient (square of the Pearson correlation coefficient of two data sets) for the ILS600 is the non-lin-

ear migration of the last two DNA fragments present in internal standard (550 and 600 bps).

For optimal calculation of molecular size, GeneScan requires two calibrations of DNA fragments above the longest allele present in the analysed sample (Southern local method). In the case of the Promega and Applied Biosystems multiplex kits (except for PowerPlex16 from Promega), the longest alleles are significantly below 400, so analysis in the range of 400 bps is sufficient to fulfil the software requirements.

The influence of different internal standards on sizing accuracy was also analysed. Variation in sizing accuracy mainly depends both on the internal size standard used and on the STR system studied. To obtain information about how the GS500 influences the accuracy of the ProfilerPlus loci, true allele sizes were plotted against those obtained with the GS500. The same procedure was used to compare values obtained using the ILS600. A very high correlation was observed between the true sizes and the sizes obtained with both internal standards (Figure 3); however, in the case of the GS500 the average size difference between actual and observed sizes was almost 2 nt and in the case of the ILS600, almost 5 nt. So, the ILS600 gives better precision of analysis than the GS500, but worse sizing accuracy. From the forensic genetics point of view, the first is much more important than the second.

### 3.3. Effect of matrix type on precision analysis and electrophoretic resolution

Another factor affecting precision, specific to capillary electrophoresis, is the separation matrix used to fill the capillary [12, 24]. The effect of two commer-

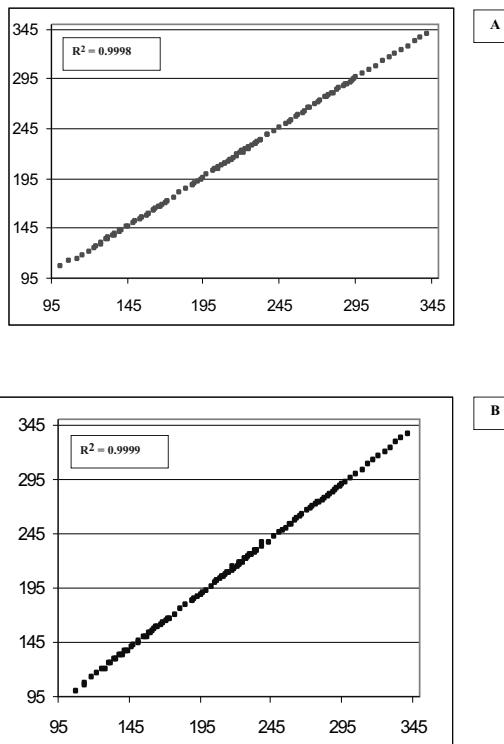


Fig. 3. Correlation of Profiler Plus loci true sizes (Y-axis) with those observed (X-axis) using the GS500 (panel A) and ILS600 (panel B).

cially available matrices (POP4 and POP6) on precision analysis was investigated. These experiments were performed for SGM Plus allelic ladder. A change of the separation matrix (POP6) and module (SeqPOP6 rapid A), increased separation time to 55 minutes, but the improvement in sizing precision was very significant. Table I show a comparison of average and maximal sizing precision values obtained with GS500 and

TABLE I. AVERAGE AND MAXIMAL SD VALUES FOR SGM PLUS LOCI SEPARATED ON POP4 AND POP6 MATRICES

Internal standard/ matrix	SD	SGM Plus loci											
		D3	VWA	D16	D2	XY	D8	D21	D18	D19	TH01	FGA	D3
GS500/ POP4	Av.	0.156	0.197	0.187	0.151	0.193	0.196	0.174	0.206	0.112	0.156	0.293	0.156
	Max	0.185	0.226	0.209	0.195	0.194	0.282	0.194	0.244	0.133	0.187	0.329	0.185
GS500/ POP6	Av.	0.070	0.080	0.060	0.081	0.076	0.090	0.060	0.130	0.050	0.070	0.146	0.070
	Max	0.090	0.100	0.070	0.108	0.091	0.150	0.100	0.230	0.070	0.090	0.280	0.090
ILS600/ POP4	Av.	0.079	0.054	0.073	0.076	0.077	0.080	0.050	0.081	0.048	0.045	0.143	0.079
	Max	0.091	0.082	0.105	0.106	0.085	0.102	0.075	0.119	0.063	0.059	0.216	0.091
ILS600/ POP6	Av.	0.042	0.031	0.045	0.047	0.043	0.041	0.037	0.039	0.034	0.028	0.043	0.042
	Max	0.057	0.056	0.075	0.084	0.045	0.053	0.071	0.067	0.057	0.039	0.090	0.057

Av. – average.

ILS600 and both matrices. It was observed that for both GS500 and ILS600 significantly better precision was obtained with POP6 than with POP4. In the analysed internal standard/matrix combinations, the average precision increased in the following direction: GS500/POP4 (0.195 bp), GS500/POP6 (0.096 bp), ILS600/POP4 (0.08 bp), ILS600/POP6 (0.039 bp). Comparison of the average *SD* values for the same internal standards and different matrices shows that replacement of GS500 with ILS600 improves precision about twofold.

Implementation of POP6 improves not only precision but also the resolution of alleles differing by 1 bp. Precision and resolution for both gels were tested for TH01 9.3 and 10 alleles (SGM Plus allelic ladder), using both internal standards and separation polymers.

Using the POP4 matrix, the 9.3 and 10 alleles are resolved approximately in 40% (Figure 4), so Genotyper software easily detects two different alleles. The precision obtained with the ILS600, as was observed previously, is at least two times better than that observed for the GS500. When separation was performed on a POP6 matrix, the 9.3 and 10 peaks were resolved approximately in 70% giving much better electrophoretic resolution than with POP4 (Figure 4). It is worth emphasising that the observed TH01 allelic ladder DNA sizes were 2 bp longer for the POP6 than POP4 matrix. In general, the sizes of all alleles present in SGM Plus allelic ladders were in the case of the POP6 matrix at least 1 bp longer than in the case of the POP4 matrix (data not shown).

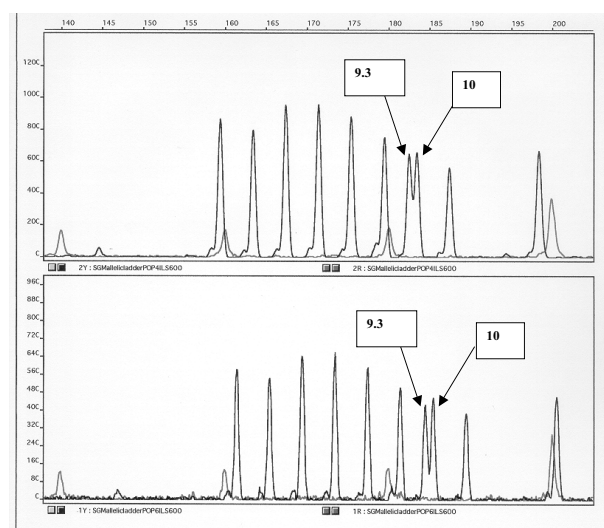


Fig. 4. Effect of matrix type on resolution of two TH01 alleles (9.3 and 10) differing in size by 1 bp. Upper panel POP4 matrix, bottom panel POP6 matrix.

Better resolution of STR alleles is especially important in the case of complex sequence composition STRs like D21S11, HumFGA etc. Owing to very good precision (ILS600, POP4) we were able to detect in a routinely analysed reference sample a very rare allelic variant in the D21S11 locus: 33.1. GeneScan analysis showed the presence of an off-ladder allele (218.58 bp) exactly one nucleotide longer than the 33 allele (217.62 bp) and one nucleotide shorter than allele 33.2 (219.60 bp). The variant allele was sequenced in both directions using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) and the following repetitive sequence was found: (TCTA)<sub>5</sub>-(TCTG)<sub>6</sub>-CR-(TCTA)<sub>13</sub>-A-TCTA [19]. According to the International Society for Forensic Genetics recommendations the allele was assigned as 33.1 [2, 17].

#### 4. Summary

As in the previously shown examples, use of POP6 increases precision sizing substantially. One of the possible explanations of the better precision is a higher concentration of the separation matrix and a better sieving effect of POP6 than POP4 gel.

As was shown, the internal DNA standard and separation matrix have a very strong effect on precision of analysis using capillary electrophoresis. Substitution of ILS600 for GS500 or POP6 for POP4 gives improved precision with similar average *SD* values, so this means that either of these substitutions gives an equivalent effect. So, the cumulative effect of the internal standard (ILS600) and matrix type (POP6) improves average precision approximately four times. The very high precision obtained with the ILS600 as an internal DNA standard or application of POP6 matrix allows precise and confident discrimination of alleles differing in size by one nucleotide, which is very important from the forensic genetics point of view.

#### References

1. Andersen J. F., Greenhalgh M. J., Butler H. R. [et al.], Further validation of a multiplex STR system for use in routine forensic identity testing, *Forensic Science International* 1996, 78, 47–64.
2. Bar 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, 110, 175–176.

3. Bosch E., Lee A. C., Calafell F. [et al.], High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions, *Forensic Science International* 2002, 125, 42–51.
4. Budowle B., Sprecher C. J., Concordance study on population database samples using the PowerPlex 16 kit and AmpFISTR Profiler Plus kit and AmpFISTR COfiler kit, *Journal of Forensic Science* 2001, 46, 637–641.
5. Budowle B., Sprecher C. J., Concordance study on population database samples using the PowerPlex 16 kit and AmpFISTR Profiler Plus kit and AmpFISTR COfiler kit, *Journal of Forensic Science* 2001, 46, 637–641.
6. Coticone S. R., Oldroyd N., Philips H. [et al.], Development of the AmpFISTR SEfiler PCR amplification kit: a new multiplex containing the highly discriminating ACTBP2 (SE33) locus, *International Journal of Legal Medicine* 2004, 118, 224–234.
7. Cotton E. A., Allsop R. F., Guest J. L. [et al.], Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework, *Forensic Science International* 2000, 112, 151–161.
8. Dupuy B. M., Olaisen B. A., Dedicated internal standard in fragment length analysis of hyperpolymorphic short tandem repeats, *Forensic Science International* 1997, 86, 207–227.
9. Holgersson S., Karlsson, J. A., Kihlgren A. [et al.], Fluorescent-based typing of the two short tandem repeat loci HUMTH01 and HUMACTBP2: Reproducibility of size measurements and genetic variation in the Swedish population, *Electrophoresis* 1994, 15, 890–895.
10. Kimpton C. P., Fisher D., Watson S. [et al.], Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci, *International Journal of Legal Medicine* 1994, 106, 302–311.
11. Kimpton C. P., Oldroyd N. J., Watson S. K. [et al.], Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification, *Electrophoresis* 1996, 17, 1283–1293.
12. Lazaruk K., Walsh P. S., Oaks F. [et al.], Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis* 1998, 19, 86–93.
13. Lins A. M., Micka K. A., Sprecher C. J. [et al.], Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system, *Journal of Forensic Science* 1998, 43, 1168–1180.
14. Mansfield E. S., Robertson J. M., Vainer M., Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis, *Electrophoresis* 1998, 19, 101–107.
15. Mansfield E. S., Vainer M., Enad S. [et al.], Sensitivity, reproducibility, and accuracy in short tandem repeat genotyping using capillary array electrophoresis, *Genome Research* 1996, 6, 893–903.
16. Micka K. A., Sprecher C. J., Lins A. M. [et al.], Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications, *Journal of Forensic Sciences* 1996, 41, 582–590.
17. Olaisen B., Bar W., Brinkmann B. [et al.], DNA Recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics, *Vox Sanguinis* 1998, 74, 61–63.
18. Pawłowski R., HUMFIBRA allele distribution in northern Poland using capillary electrophoresis, *International Journal of Legal Medicine* 1999, 112, 139–141.
19. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Additional variability at the D21S11 locus: sequencing evidence of a new allele D21S11\*33.1, *Problems of Forensic Sciences* 2001, 47, 314–321.
20. Pawłowski R., Maciejewska A., Forensic validation of a multiplex containing nine STRs-population genetics in northern Poland, *International Journal of Legal Medicine* 2000, 114, 45–49.
21. Sparkes R., Kimpton C. P., Gilbard S. [et al.], The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework, *International Journal of Legal Medicine* 1996, 109, 195–204.
22. Sparkes R., Kimpton C. P., Watson S. [et al.], The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: (I) Mixtures, ageing, degradation and species studies, *International Journal of Legal Medicine* 1996, 109, 186–194.
23. Tagliabracci A., Buscemi L., Sassaroli C. [et al.], Allele typing of short tandem repeats by capillary electrophoresis, *International Journal of Legal Medicine* 1999, 113, 26–32.
24. Vainer M., Enad S., Dolnik V. [et al.], Short tandem repeat typing by capillary array electrophoresis: comparison of sizing accuracy and precision using different buffer systems, *Genomics* 1999, 41, 1–9.

---

**Corresponding author**

Ryszard Pawłowski  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Akademii Medycznej w Gdańsku  
ul. Dębowa 23  
PL 80-204 Gdańsk  
e-mail: Richard@amg.gda.pl

---

# OCENA PRECYZJI OZNACZANIA SYSTEMÓW TYPU MULTIPLEKS STR METODĄ ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ PRZY ZASTOSOWANIU RÓŻNYCH WEWNĘTRZNYCH STANDARDÓW DŁUGOŚCI I RODZAJÓW ŻELI

## 1. Wstęp

Wprowadzenie metody PCR typu multipleks umożliwiło jednoczesną, szybką i wydajną amplifikację wielu *loci* DNA [3, 5, 10, 11, 13, 16, 21, 22]. W celu zapewnienia powtarzalności genotypowania markerów typu STR, konieczne jest zastosowanie odpowiednich warunków elektroforetycznych o wysokiej rozdzielczości oraz odpowiedniego wewnętrznego standardu długości. Fragmenty DNA standardu wewnętrznego powinny migrować w sposób przewidywalny, a ich tempo migracji powinno być funkcją masy molekularnej. W badaniach genetyczno-sądowych, gdy stwierdzana jest zgodność profili DNA, precyzja pomiaru długości fragmentów DNA w porównywanych próbkach jest znacznie ważniejsza niż dokładność, z jaką określono długość poszczególnych alleli. Wraz ze wzrostem precyzji analizy rośnie również zaufanie do wyników genotypowania. Niska precyzja może prowadzić do błędnego oznaczenia dwóch fragmentów DNA o takiej samej długości jako dwóch różnych alleli lub przeciwnie, fragmenty DNA o różnej długości mogą zostać nieprawidłowo oznaczone jako ten sam allel. Jednym z najczęściej stosowanych wewnętrzných standardów DNA służących do pomiaru długości fragmentów DNA jest GS500. Niektóre badania przy porównaniu wyników uzyskanych dla różnych żeli wykazały jednak, że przy zastosowaniu GS500 powtarzalność pomiarów długości fragmentów DNA w przypadku złożonych układów typu STR może być niewystarczająca do wiarygodnego oznaczania alleli [1, 7, 8].

Wysoka precyzja jest szczególnie istotna, gdy zachodzi konieczność zróżnicowania alleli różniących się długością o 1 lub 2 pary zasad. *Loci* zawierające tego typu allele zawarte są na przykład w zestawach Profiler Plus, SGM Plus, PowerPlex i SEfiler [4, 6, 7, 20].

Porównanie długości fragmentów DNA, które różnią się zaledwie o 1 nukleotyd, wymaga odchylenia standardowego o wartości 0,17 ( $1/6 = 0,17$ ) nukleotydu w celu zapewnienia z 99,27% prawdopodobieństwem zgodności lub braku zgodności pomiędzy testowanymi allelami.

Pośród głównych czynników wpływających na precyzję rozdzielania fragmentów DNA znajdują się: rodzaj polimeru, rodzaj standardu wewnętrznego, jak również testowanego lokus. Stosowane obecnie do oznaczania alleli analizowanych w reakcjach typu multipleks PCR metody elektroforezy kapilarnej (CE) polegają na porównaniu fragmentów DNA do drabin allelicznych, które ka-

libruje się poprzez zastosowanie wewnętrznego standardu długości, np. GS500 (Profiler Plus, SGM Plus, Identifier, SEfiler). Z doświadczeń autorów niniejszej pracy wynika, że ten standard długości w przypadku sekwencjatora ABI310 nie umożliwia uzyskania odpowiedniej precyzji w przypadku, gdy konieczne jest jedno- znaczne zróżnicowanie alleli różniących się o 1 lub 2 pary zasad, jak to ma miejsce w przypadku wysoce polimorficznego lokus SE33 wchodzącego w skład zestawu SEfiler.

Głównym celem przeprowadzonych eksperymentów była ocena wpływu różnych wewnętrzných standardów długości na precyzję oznaczania alleli układów typu STR zawartych w dostępnych zestawach do identyfikacji genetycznej. Ostatnio w sprzedaży pojawiły się alternatywne wewnętrzne standardy długości DNA, między innymi ILS400 i ILS600, które w porównaniu do powszechnie stosowanego GS500, charakteryzują się wyższą liczbą bardziej równomiernie rozłożonych fragmentów DNA. Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę precyzji i dokładności analizy DNA z zastosowaniem dostępnych w handlu zestawów do identyfikacji genetycznej zawierających złożone *loci* typu STR względem trzech wewnętrzných standardów DNA: GS500, ILS400 i ILS600.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Badane próbki

Jako źródło zsekwencjonowanych fragmentów DNA wykorzystano drabiny alleliczne z zestawów Profiler Plus i SGM Plus. Drabina alleliczna wchodząca w skład zestawu Profiler Plus zawiera 118 alleli (10 *loci*), które mieszczą się w przedziale od 107 do 341 par zasad. Drabina alleliczna wchodząca w skład zestawu SGM Plus zawiera 159 alleli (11 *loci*), które mieszczą się w przedziale od 107 do 353 par zasad.

Wielokrotne iniekcje tej samej próbki (drabiny allelicznej) na aparacie do elektroforezy kapilarnej ABI310 pozwoliły na oszacowanie rozkładu oznaczonych długości fragmentów DNA. Próbki poddane zostały co najmniej 15-krotnej iniekcji z zastosowaniem tej samej kapilary (precyzja dla pojedynczej kapilary) oraz co najmniej 35-krotnej z zastosowaniem różnych kapilar i różnych partii żelu (precyzja dla różnych kapilar). Pomiar długości alleli obecnych w testowanych drabinach alle-

licznych prowadzono z wykorzystaniem standardów długości GS500, ILS400 i ILS600.

## 2.2. Elektroforeza kapilarna z wykorzystaniem analizatora genetycznego ABI310

1 l drabiny allelicznej mieszano z 12 l dejonizowanego formamidu (Amresco, Stany Zjednoczone) i 1 l wewnętrznego standardu długości GS500 znakowanego fluorescencyjnym barwnikiem ROX (AB, Stany Zjednoczone) lub z 1 l wewnętrznego standardu długości ILS400 lub ILS600 (obydwa znakowane barwnikiem fluorescencyjnym CXR; Promega, Stany Zjednoczone). Przed rozdziałem elektroforetycznym próbki denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 95 C, a następnie chłodzono lodem. Elektroforezę prowadzono z zastosowaniem analizatora genetycznego ABI Prism 310 (Applied Biosystems, USA). Próbki rozdzielano przy zastosowaniu kapilar o długości 47 cm (używanych do 20–350 iniekcji) wypełnionych żelem denaturującym POP4 lub POP6. W przypadku żelu POP4 stosowano moduł GSSTRPOP4 oraz filtr F, a w przypadku żelu POP6 moduł SeqPOP6 Rapid oraz filtr A. Rozdziały elektroforetyczne prowadzono przez 24 minuty przy 15 kV, 9 mA i 10 W dla POP4 i 36 minut przy 15 kV, 9 mA i 10 W dla POP6. Zastosowanie nowych standardów znakowanych CXR wymagała stworzenia nowych matryc. Dane elektroforetyczne analizowano, używając programu GeneScan v. 2.1. Do obliczania długości fragmentów DNA stosowano metodę *southern local*. W przypadku standardu wewnętrznego GS500 (35–500 pz) do stworzenia krzywej kalibracyjnej wykorzystywano wszystkie fragmenty DNA z wyjątkiem fragmentu o długości 250 pz. W przypadku standardów ILS400 i ILS600 wykorzystywano wszystkie fragmenty DNA.

## 2.3. Obliczenia statystyczne

W celu przeprowadzenia analizy porównawczej uzyskane dane poddano obliczeniom statystycznym. Odchylenie standardowe, współczynnik korelacji Pearsona oraz współczynnik  $RSQ$  (kwadrat współczynnika korelacji Pearsona dwóch zestawów danych) obliczano z zastosowaniem programu Excel.

## 3. Wyniki i dyskusja

### 3.1. Precyzja oznaczania długości *loci* zawartych w zestawach Profiler Plus i SGM Plus z zastosowaniem wewnętrznych standardów GS500 i ILS600 i żelu POP4

Wykazano, że gdy porównywane są wyniki uzyskane dla różnych żeli lub kapilar (ABI310), powtarzalność

wyników pomiaru złożonych wysoce polimorficznych układów typu STR przy zastosowaniu standardu GS500 jest niewystarczająca do wiarygodnego oznaczania alleli różniących się długością o 1 pz [9, 18, 23]. Nie stwierdzono prostej zależności precyzji analizy od długości allelela lub typu sekwencji powtarzalnej. Zaobserwowano na przykład [23], że w przypadku *loci* VWA i CSF1PO zawierających tą samą sekwencję powtarzalną (AGAT) i znakowanych tym samym barwnikiem fluorescencyjnym (JOE), precyzja charakterystyczna dla CSF1PO (allelele w zakresie 281–317 pz) jest prawie trzykrotnie wyższa niż dla lokus VWA (allelele w zakresie 127–167 pz). Niewystarczająca precyzja analizy wysoce różnicujących *loci* zawierających allelele różniące się długością o 1 lub 2 pz może prowadzić do błędnego oznaczania alleli, a w efekcie poważnych konsekwencji prawnych.

Rycina 1 przedstawia porównanie precyzji pomiaru długości *loci* wchodzących w skład zestawu Profiler Plus analizowanych z zastosowaniem standardów GS500 i ILS600 dla rozdziałów elektroforetycznych prowadzonych na różnych kapilarach. Dla wszystkich analizowanych *loci* uzyskana precyzja była znacząco wyższa dla ILS600 niż dla GS500. W przypadku standardu ILS600 uzyskano wartości odchylenia standardowego w zakresie 0,06–0,16 pz, podczas gdy dla GS500 0,17–0,75 pz. Dla GS500 obserwowano wzrost wartości odchylenia standardowego wraz ze wzrostem długości alleleli, podczas gdy zjawisko to nie miało miejsca dla ILS600, w przypadku którego wszystkie wartości odchylenia standardowego zawierały się w wąskim przedziale 0,1 pz.

Podobne wyniki uzyskano dla *loci* wchodzących w skład popularnego zestawu SGM Plus. Uzyskane zakresy i średnie wartości odchylenia standardowych wyniosły 0,08–0,33 pz i 0,195 pz dla GS500 oraz 0,01–0,23 pz i 0,08 pz dla ILS600.

W przypadku wszystkich analizowanych *loci* SGM Plus z wyjątkiem alleleli FGA, uzyskane wartości odchylenia standardowego dla ILS600 były niższe niż 0,15 pz. Wartości przekraczające 0,15 pz, które zaobserwowano dla lokus FGA, stwierdzono dla zaledwie 9 spośród 28 analizowanych alleleli, w większości przypadków dla bardzo długich alleleli FGA, które bardzo rzadko występują w populacjach.

### 3.2. Korelacja czasu retencji z długością alleleli dla trzech analizowanych wewnętrznych standardów DNA

Jak wykazano, wyższa korelacja długości wewnętrznego standardu DNA z czasem pojawiania się piku prowadzi do uzyskania lepszej krzywej kalibracyjnej, a w konsekwencji do wyższej precyzji pomiaru długości [14, 15, 24]. Rycina 2 prezentuje korelację pomiędzy czasem retencji a długością dla trzech standardów wew-



nętrznym poddawanych rozdziałowi elektroforetycznemu z zastosowaniem żelu POP4.

W przypadku fragmentów DNA wchodzących w skład standardu GS500 zaobserwowano nieliniową korelację pomiędzy ich czasem retencji a długością (masa cząsteczkowa). Obliczony współczynnik korelacji równał się 0,9985 (rycina 2, panel górny). Współczynnik korelacji Pearsona uzyskany dla ILS600 był podobny jak dla GS500 ( $R^2 = 0,9974$ ). Najwyższą liniowość uzyskano dla standardu ILS400. Uzyskany współczynnik korelacji był bliski 1 ( $R^2 = 0,9996$ ). Prawdopodobną przyczyną uzyskania najniższej wartości współczynnika  $RSQ$  (kwadrat współczynnika korelacji Pearsona dwóch zestawów danych) dla ILS600 była nieliniowa migracja dwóch ostatnich fragmentów DNA obecnych w tym standardzie (550 i 600 pz).

W celu optymalnego pomiaru długości, program GeneScan wymaga dwóch punktów pomiarowych dla fragmentów DNA powyżej najdłuższego allele obecnego w analizowanej próbce (tzw. metoda *southern local*). W przypadku dostępnych zestawów multipleksowych firm Promega i Applied Biosystems (z wyjątkiem PowerPlex16 firmy Promega) długości najdłuższych allele znajdują się znacznie poniżej 400 pz, a zatem analiza w zakresie 400 pz spełnia wymagania programu.

Ocenie poddano również wpływ różnych standardów wewnętrznych na precyzję pomiaru długości. Różnicowanie precyzji pomiaru długości zależy przede wszystkim od stosowanego wewnętrznego standardu długości oraz badanego układu STR. W celu uzyskania informacji na temat wpływu standardu GS500 na precyzję pomiaru długości *loci* zawartych w zestawie Profiler Plus, prawdziwe długości allele nakładano na długości oznaczone przy zastosowaniu GS500. W taki sam sposób porównano wartości uzyskane przy zastosowaniu ILS600. Stwierdzono bardzo wysoką korelację pomiędzy rzeczywistymi długościami allele a długościami oznaczonymi z zastosowaniem obu standardów wewnętrznych (rycina 3). Należy jednak zwrócić uwagę, że w przypadku GS500 średnia różnica długości pomiędzy rzeczywistymi a obserwowanymi długościami wynosiła prawie 2 pz, a w przypadku standardu ILS600 prawie 5 pz. Oznacza to, że zastosowanie ILS600 daje wyższą precyzję analizy od GS500, lecz wiąże się z niższą dokładnością określenia długości. Z punktu widzenia genetyki sądowej pierwszy parametr jest znacznie bardziej istotny niż drugi.

### 3.3. Wpływ rodzaju żelu na precyzję analizy i rozdzielczość elektroforetyczną

Innym czynnikiem wpływającym na precyzję analizy, szczególnie w przypadku elektroforezy kapilarnej, jest rodzaj polimeru wykorzystywanego do wypełnienia kapilary [12, 24]. Badaniom poddano wpływ dwóch dostępnych w handlu żeli (POP4 i POP6) na precyzję

analizy. Do przeprowadzenia tych eksperymentów wykorzystano drabinę alleliczną wchodzącą w skład zestawu SGM Plus. Zmiana rodzaju żelu stosowanego do rozdziału elektroforetycznego (na POP6) i modułu analizy (na SeqPOP6 rapid A) wydłużyła czas rozdziału do 55 minut, co jednak przyczyniło się do znacznej poprawy precyzji oznaczania długości. Tabela I przedstawia porównanie średnich i maksymalnych wartości precyzji oznaczania długości allele uzyskanych dla standardów GS500 i ILS600 i obu rodzajów żeli.

Zaobserwowano znacząco wyższą precyzję analizy dla POP6 niż dla POP4 zarówno w przypadku GS500, jak i ILS600. Dla analizowanych kombinacji standard wewnętrzny/żel średnia precyzja analizy rosła w następującym kierunku: GS500/POP4 (0,195 pz), GS500/POP6 (0,096 pz), ILS600/POP4 (0,08 pz), ILS600/POP6 (0,039 pz). Porównanie średnich wartości odchyłeń standardowych uzyskanych dla tych standardów wewnętrznych i różnych rodzajów żeli pokazuje, że zastąpienie standardu GS500 przez ILS600 poprawia precyzję około dwukrotnie.

Wprowadzenie żelu POP6 nie tylko poprawia precyzję analizy, ale również rozdzielczość allele różniących się o 1 pz. Precyzję i rozdzielczość dla obu żeli (POP4 i POP6) testowano w oparciu o allele 9.3 i 10 układu TH01 (drabina alleliczna SGM Plus) z wykorzystaniem obu standardów wewnętrznych. Przy zastosowaniu żelu POP4 allele 9.3 i 10 podlegały rozdziałowi w około 40% (rycina 4), co bez trudu pozwalało programowi Genotyper na oznaczenie dwóch różnych allele. Jak wykazano wcześniej, precyzja uzyskana za pomocą standardu ILS600 była co najmniej dwukrotnie wyższa od obserwowanej dla standardu GS500. Gdy rozdział elektroforetyczny prowadzono z zastosowaniem żelu POP6, allele 9.3 i 10 podlegały rozdziałowi w około 70%, dając znacznie lepszą rozdzielczość elektroforetyczną niż w przypadku POP4 (rycina 4). Warto zauważyć, że obserwowane długości allele TH01 obecnych w drabinie DNA były o 2 pz dłuższe dla POP6 niż dla POP4. Zasadniczo długości allele obecne w zestawie SGM Plus były w przypadku stosowania żelu POP6 co najmniej o 1 pz dłuższe niż w przypadku stosowania żelu POP4 (dane nieprezentowane).

Zapewnienie wysokiej rozdzielczości allele układów typu STR jest szczególnie istotne w przypadku *loci* o złożonej sekwencji, jak D21S11, HumFGA itd. Dzięki bardzo wysokiej precyzji (ILS600, POP4) możliwe było oznaczenie w rutynowo analizowanej próbce porównawczej bardzo rzadkiego wariantu allelicznego 33.1 w lokus D21S11. Analiza przeprowadzona z zastosowaniem programu GeneScan wykazała obecność allele poza drabiną (218.58 pz) dokładnie o 1 nukleotyd dłuższego od allele 33 (217.62 pz) i o 1 nukleotyd krótszego od allele 33.2 (219.60 pz). Nowy wariant został poddany sekwencjonowaniu obu nici DNA z zastosowaniem zestawu BigDye

Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Stany Zjednoczone), co pozwoliło na identyfikację następującej sekwencji powtarzalnej: (TCTA)<sub>5</sub>(TCTG)<sub>6</sub>-CR-(TCTA)<sub>13</sub>-A-TCTA [19]. Zgodnie z rekomendacjami Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej, allel ten został oznaczony jako 33.1 [2, 17].

#### 4. Podsumowanie

Jak wynika z wcześniej przedstawionych przykładów, zastosowanie żelu POP6 znacząco podnosi precyzję pomiaru długości. Jednym z możliwych wyjaśnień tego faktu jest wyższe stężenie żelu i wynikające stąd lepsze właściwości przesiewowe żelu POP6 w porównaniu do POP4. Jak wykazano, precyzja analizy przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej zależy w istotny sposób od wewnętrznego standardu długości DNA oraz rodzaju żelu. Zastąpienie standardu GS500 przez ILS600 lub żelu POP4 przez POP6 podnosi precyzję przy podobnych średnich wartościach odchylenia standardowego, co oznacza, że już jedna z tych zamian daje równoważny efekt. Oznacza to, że łączny efekt wynikający z zastosowania standardu wewnętrznego ILS600 i żelu POP6 poprawia precyzję około czterokrotnie. Bardzo wysoka precyzja uzyskana przy użyciu standardu ILS600 lub też wykorzystanie żelu POP6 pozwala na precyzyjne i nie budzące wątpliwości wyodrębnienie alleli różniących się długością o zaledwie 1 parę zasad, co jest niezwykle istotne z punktu widzenia genetyki sądowej.