

Ryszard Pawłowski

Polimorfizm lokus D1S80 człowieka w populacji Polski Północnej, badany metodą PCR. Genetyka populacyjna oraz zastosowanie do badania śladów biologicznych.

Polymorphism of human locus D1S80 in North Polish population analysed with PCR method. Population genetics and application to the biological stains analysis.

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku.

Kierownik: Prof. dr hab. R.Hauser.

Celem pracy było określenie częstości alleli układu D1S80 dla populacji Polski Północnej (obszar Gdańska). DNA izolowano metodą nieenzymatyczną i nieorganiczną z krwi pobranej od 207 niespokrewnionych osób. Po amplifikacji produkty PCR rozdzielono na horyzontalnym żelu poliakrylamidowym w nieciągłym systemie buforowym. Elektroforegramy barwiono metodą z azotanem srebra, a obecność poszczególnych alleli określano porównując z "drabinami alleli" dla układu D1S80. W populacji stwierdzono 19 alleli i 59 fenotypów. Rozkład alleli jest bi-modalny z najczęstszymi allelami 18 (20,05%) i 24 (36,23%). Badany układ charakteryzuje się wysoką siłą dyskryminacji i heterozygotycznością (odpowiednio 0.935 i 80.2%), oraz niskim współczynnikiem dyskryminacji (0.0706) co czyni go wielce przydatnym do badań identyfikacyjnych.

The main aim of the work was investigation of allele frequencies of D1S80 system of population of North Poland. DNA was isolated using non-enzymatic and non-organic method, from 207 blood samples of unrelated persons. PCR products were separated on horizontal polyacrylamide gels using discontinuous buffer system. Electrophoregrams were stained with silver and alleles were identified comparing with D1S80 allelic ladder. In the analysed population 19 alleles and 59 phenotypes were found. Distribution of D1S80 alleles is bi-modal with the most frequent 18 (20.05%) and 24 (36.23%). Analysed system has a high power of discrimination and heterozygosity (0.935 and 80.2% respectively) and low index of discrimination (0.0706). The above parameters prove that D1S80 system is a good one for identification purposes.

Odkrycie w ludzkim genomie wysoce polimorficznych sekwencji, typu VNTR, oraz opracowanie metody PCR bardzo wyraźnie zdynamizowało postęp hemogenetyki sądowej. Reakcja PCR umożliwiła badanie polimorfizmu DNA nie tylko w świeżych próbkach biologicznych ale również w śladach biologicznych, gdzie

bardzo często obserwuje się wysoce zdegradowany DNA, a ponadto dostępny w znikomych ilościach. Dotychczas stosowana w hemogenetyce sądowej technika RFLP jest czasochłonna (1–2 tygodnie), kosztowna i wymagająca często użycia izotopów. PCR natomiast wymaga znikomej ilości materiału (np. nabłonki jamy ustnej, czy cebulki włosowe zamiast próbek krwi), jest prosta i szybka (czas pełnej analizy 1 dzień) i stosunkowo tania. Te cechy metody PCR powodują, że wypiera ona technikę RFLP nie tylko z badań śladów biologicznych, ale i z badań spornego ojcostwa.

Wśród polimorficznych systemów typu VNTR (zmiennej liczby tandemowych powtórzeń), aktualnie stosowanych do celów identyfikacyjnych wyróżnić można struktury typu mikrosatelitarnego (STR – short tandem repeats) gdzie kolejne allele różnią się pomiędzy sobą o 1–6bp oraz minisatelitarne gdzie tandemowo–repetytywne sekwencje są większe niż 6bp. Do sekwencji VNTR typu minisatelitarnego zalicza się m. in. lokus D1S80 obecny na krótkim ramieniu pierwszego chromosomu człowieka (9). Poszczególne allele (w liczbie ok. 30) różnią się pomiędzy sobą wielokrotnością sekwencji repetytywnej o wielkości 16bp i mieszczą się, dla alleli od 16 do 41 powtórzeń, w przedziale wielkości od ok. 378bp do 816bp.

Celem pracy było określenie alleli i fenotypów układu D1S80 dla populacji 207 niespokrewnionych osób z terenu Polski Północnej.

MATERIAŁY I METODY

Badana populacja

Próbki pobrano od 207 niespokrewnionych osób obu płci pochodzących z obszaru Polski Północnej.

Ekstrakcja DNA

Z krwi pobranej na EDTA izolowano DNA stosując metodę nieenzymatycznej ekstrakcji (12), która wg. naszych doświadczeń dawała w porównaniu do metody z DATB (Easy Blood DNA Prep, A&A Biotechnology, Gdańsk) i klasycznej metody izolacji DNA (4) najwyższy odzysk. Pełne porównanie w/w metod zawarte zostało w innej pracy (14). Jakość wyizolowanego DNA badano metodą elektroforezy w żelu agarozowym a jego ilość oznaczano metodą fluorymetryczną.

Ekstrakcja DNA z kości

Ekstrakcję prowadzono wg. metody Hochmeistera i Budowle (7).

Amplifikacja metodą PCR lokus D1S80

Primery D1S80:

Do amplifikacji lokus D1S80 używano primerów (9) o następujących sekwencjach:

Primer 1: 5' – GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G – 3'

Primer 2: 5' – GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC – 3'

Warunki amplifikacji:

używano od 5–10ng matrycowego DNA, 1U Taq polymerase (Ampli Taq Perkin–Elmer lub Taq polymerase Promega), 1 μM każdego z primerów, 200 μM każdego z nukleotydów, 1,5mM MgCl₂, 10xPCR buffer (Promega lub Perkin–Elmer) oraz ultrafiltrowanej wody do końcowej objętości 25 μl. Mieszaninę reakcyjną przykrywano 25 μl oleju mineralnego. Amplifikacje prowadzono (Biometra Triothermoblock lub Polychain II, Polygen, Niemcy), w następujących warunkach: denaturyzacja wstępna – 95°C/2min, a następnie 28 cykli amplifikacyjnych składających się z denaturacji 94°C/1min, hybrydyzacji primerów 67°C/1min i wydłużania 72°C/4min. Proces kończono elongacją 72°C przez 10min.

Elektroforeza i detekcja produktów PCR.

Produkty PCR (2–4 μl) rozdzielano na poziomym żelu poliakrylamidowym (20x12x0.045cm; 7.5%T, 3%C, sieciowanym piperazynodwukrylamidem PDA) w nieciągłym systemie buforowym (1, 17). Rozdział prowadzono przy stałym natężeniu prądu (20mA) w temperaturze 12°C, do momentu osiągnięcia przez błękit bromofenylowy łącznika anodowego. Elektroforegramy barwiono metodą z azotaniem srebra (1).

Nomenklatura alleli D1S80.

Allele systemu D1S80 oznaczono wg. nomenklatury przyjętej przez ISFH (International Society of Forensic Haemogenetics) opierającej się na opisywaniu allelu poprzez ilość jednostek repetytywnych (5). Allele określano porównując z “drabinami alleli” (Perkin–Elmer) lub przygotowanymi w Instytucie Medycyny Sądowej Uniwersytetu w Münster, Niemcy).

Obliczenia statystyczne

Z zaobserwowanych częstości alleli obliczono oczekiwaną częstość genotypów stosując równanie Hardy’ego–Weinberga (H–W). Zgodność obserwowanych i oczekiwanych częstości z równaniem H–W badano testem χ^2 . Obserwowaną heterozygotyczność porównywano z nieobciążoną estymacją częstości heterozygot (h) ± błąd standardowy dla h (13). Siłę dyskryminacji obliczano ze wzoru:

$$PD = 1 - \sum(Pi)^2$$

gdzie Pi jest częstością każdego genotypu.

Współczynnik dyskryminacji (DI) obliczono wg. Wong’a i wsp. (19). Znamienność statystyczną różnic w częstościach alleli dla różnych populacji obliczano stosując test χ^2 dla tabeli czteropolowej lub wielopolowej, uwzględniając poprawki w przypadku porównywania ilości obserwacji mniejszych niż 5.

WYNIKI I DYSKUSJA

Metody ekstrakcji DNA.

Do izolacji DNA z 207 próbek krwi stosowano szybką (1 godzina), nie wymagającą stosowania odczynników organicznych i proteiny K oraz bardzo wydajną

metodę izolacji DNA (12). Izolacja DNA tą metodą stosowana jest w naszym Zakładzie od końca 1992 roku i z powodzeniem sprawdza się w metodzie PCR jak i RFLP.

Rozdział elektroforetyczny produktów PCR.

Stosowany system rozdziału fenotypów D1S80 daje bardzo czytelne rozdziały i nie powoduje trudności w ich prawidłowym nazwaniu. Przy 20 cm żelu możliwe jest rozdzielenie drabiny alleli D1S80 na długość blisko 6 cm. Przy przestrzeganiu ilości DNA dodawanego do amplifikacji uzyskuje się czyste amplifikaty bez dodatkowych nieswoistych produktów. Sporadycznie uzyskiwane dodatkowe frakcje pojawiają się poza zakresem drabiny alleli i nie sprawiają trudności interpretacyjnych.

Genetyka populacyjna lokus D1S80

DNA wyekstrahowane przedstawioną metodą dało amplifikację we wszystkich analizowanych próbkach. Z 207 analizowanych próbek, 54 poddano podwójnym oznaczeniom (ponowna izolacja i amplifikacja), stwierdzając pełną powtarzalność wyników we wszystkich podwójnie przebadanych przypadkach. W badanej populacji 207 osób zaobserwowano 19 alleli oraz 59 genotypów ze 190 teoretycznie możliwych dla tej ilości alleli. Tabela I przedstawia rozkład obserwowanych fenotypów D1S80 dla badanej populacji 207 osób. Rozkład częstości genotypów jest bi-modalny. Najczęstszymi genotypami są 18/24 (17,87%) oraz 24/24 (13,52%). Częstość pozostałych genotypów nie przekracza 5%. W badanej populacji stwierdzono allele w zakresie od 18 do 41 powtórzeń. Nie obserwowano alleli 34,35 i 38–40. Najczęstsze allele zgodnie z oczekiwaniami to 24 i 18 (Tabela II) występujące z częstością odpowiednio 36,23 i 20,05%. Rzadko obserwowano allele pośrednie, które nie odpowiadały dokładnie allelom w drabinach alleli. W takiej sytuacji allel przypisywano do najbliższego allelu o niższej ilości tandemowych powtórzeń (zgodne z zaleceniami Komisji Serologicznej PTMSiK). Tego typu interallele mogą być efektem, jak się sugeruje, innej ruchliwości fragmentów o bardzo zbliżonej długości, ale innej sekwencji (8). Interallele obserwuje się znacznie rzadziej podczas rozdziału produktów na wertykalnych żelach poliakrylamidowych. Częstości najczęstszych alleli 18 i 24 są zbliżone do tych, które obserwowano dla innych populacji Kaukazoidów w Europie i wahają się dla allelu 18 od 19,8% (Niemcy) (16) do 30,7% (Finlandia) (15), a dla allelu 24 od 26% (Lublin) (11) do 38% (Holandia) (10). (Tabela III). Porównanie częstości alleli 18 i 24 występujących w populacji Polski Północnej z częstościami obserwowanymi w populacjach europejskich przedstawionych w Tabeli III, nie wykazało różnic znamiennej statystycznie dla allelu 24 i 18 z wyjątkiem znamiennej statystycznie różnicy zaobserwowanej dla allelu 18 przy porównaniu jego częstości w populacji polskiej i fińskiej ($\chi^2 = 10.3151$; $P < 0.0001$).

Rycina 1 przedstawia porównanie częstości alleli D1S80, obserwowanych dla populacji badanych w Zakładzie Medycyny Sądowej w Lublinie oraz w Gdańsku. W obu przypadkach uzyskano podobny rozkład częstości, chociaż w przypadku populacji badanej w Lublinie uzyskano wyraźnie niższą częstość allelu 24 (26,0%) niż dla populacji badanej w naszym Zakładzie (36,23%). Różnica ta nie jest jednak znamienna statystycznie ($\chi^2 = 3.5903$; $P = 0.0770 + 0.084$ SE). Statystycznie znamienne różnice pomiędzy populacjami badanymi w Lublinie i Gdańsku stwier-

Tabela I Częstości obserwowanych genotypów D1S80 w populacji 207 osób z Polski Północnej.

Frequency of D1S80 genotypes observed in 207 unrelated Poles from North Poland.

Genotyp Genotype	Obserwowana ilość/% Number observed/%	Genotyp Genotype	Obserwowana ilość/% Number observed/%
18-18	6/2.90	24-24	28/13.53
18-20	3/1.45	24-25	9/4.35
18-22	5/2.42	24-26	3/1.45
18-23	2/0.97	24-27	1/0.48
18-24	37/17.87	24-28	3/1.45
18-25	3/1.45	24-29	7/3.38
18-26	2/0.97	24-30	1/0.48
18-27	2/0.97	24-31	9/4.35
18-28	5/2.42	24-32	3/1.45
18-29	2/0.97	25-25	2/0.97
18-31	7/3.38	25-26	2/0.97
18-36	1/0.48	25-27	1/0.48
18-37	2/0.97	25-28	2/0.97
19-24	1/0.48	25-29	3/1.45
20-22	1/0.48	25-31	1/0.48
20-23	2/0.97	25-32	1/0.48
20-24	4/1.93	26-27	1/0.48
20-37	1/0.48	26-29	2/0.97
21-23	1/0.48	26-32	1/0.48
21-24	1/0.48	26-36	1/0.48
21-28	1/0.48	27-31	1/0.48
22-22	1/0.48	28-28	2/0.97
22-24	6/2.90	28-30	3/1.45
22-28	2/0.97	28-33	1/0.48
22-29	1/0.48	29-31	1/0.48
22-30	1/0.48	29-37	2/0.97
22-32	1/0.48	31-31	2/0.97
23-24	9/4.35	31-36	1/0.48
23-27	1/0.48	31-41	1/0.48
23-29	1/0.48		

Tabela II Częstości alleli układu D1S80 w populacji 207 osób z Polski Północnej.

Allele frequency of D1S80 in a population of 207 persons from North Poland

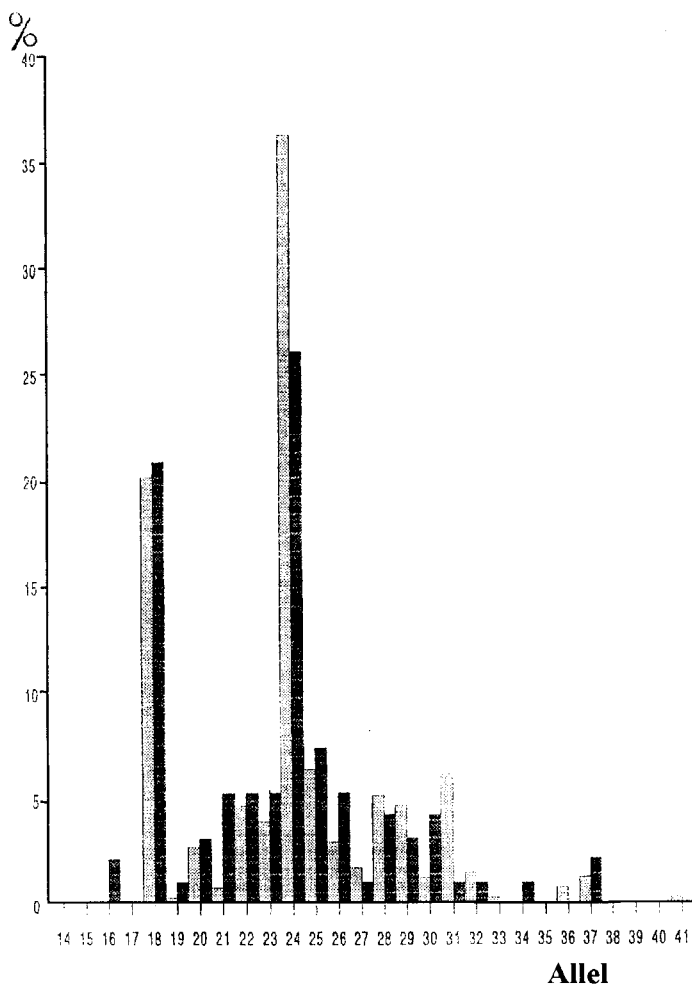
Allel Allele	Częstość Frequency	Allel Allele	Częstość Frequency
18	0.2005	31	0.0604
19	0.0024	32	0.0145
20	0.0266	33	0.0024
21	0.0072	34	—
22	0.0459	35	—
23	0.0386	36	0.0072
24	0.3623	37	0.0121
25	0.0628	38	—
26	0.0290	39	—
27	0.0169	40	—
28	0.0507	41	0.0024
29	0.0459		
30	0.0121		

Tabela III Porównanie niektórych parametrów badanych populacji europejskich dla układu D1S80.

Comparison of some European population parameters of D1S80 system.

Kraj Country	N	Najczęstsze allele Most frequent alleles	Heterozygotyczność heterozygosity	Współczynnik dyskryminacji (DP)
Dania Denmark (18)	210	18 (22.4%); 24 (37.1%)	0.77	0.93
Finlandia Finnland (15)	140	18 (30.7%); 24 (31.1%)	0.77	0.92
Hiszpania Spain (2)	203	18 (22.4%); 24 (37.2%)	0.80	–
Holandia Netherland (10)	150	18 (21.7%); 24 (38.0%)	0.71	0.94
Niemcy Germany (17)	218	18 (24.5%); 24 (36.7%)	0.81	–
Niemcy Germany (16)	250	18 (19.8%); 24 (34.6%)	0.86	–
Szwajcaria Switzerland (6)	100	18 (23.0%); 24 (34.5%)	0.82	–
Polska Lublin Poland (11)	48	18 (20.8%); 24 (26%)	0.75	–
Polska Gdańsk Poland	207	18 (20.0%); 24 (36.2%)	0.80	0.94

dzono dla allelu 21 ($\chi^2 = 6.4882$; $P = 0.0200 + 0.0044$ SE) oraz dla allelu 31 ($\chi^2 = 5.7906$; $P = 0.0180 + 0.0042$ SE). Globalne porównanie częstości alleli D1S80 (od allelu 16 do 41) dla populacji badanej w Lublinie i w Gdańsku wykazało, że różnią się one znacząco statystycznie ($\chi^2 = 38.1600$; $P = 0.0060 + 0.0024$ SE). W badanej populacji 207 osób obserwowano heterozygotyczność w wysokości 80.2%. Obliczenie oczekiwanej częstości heterozygot (h) oraz błędu standardowego dla h dało wartość 0.812 ± 0.027 , czyli bardzo zbliżoną do wartości obserwowanej. Zgodność obserwowanej i oczekiwanej heterozygotyczności świadczy o wiarygodności metody umożliwiającej prawidłowe określenie genotypu i sugeruje jednocześnie brak znaczącej ilości błędnych typowań np. poprzez utratę alleli (ang. allelic drop out) manifestującej się zwiększoną ilością homozygot w populacji. Heterozygotyczność D1S80 w różnych krajach Europy waha się od 0.71 (Holandia) (10) do 0.86 (Niemcy) (16). Dla badanej populacji obliczono również siłę dyskryminacji i współczynnik dyskryminacji (19) dla układu D1S80, które wynoszą odpowiednio 0.935 i 0.0706. Wysoka wartość siły dyskryminacji oraz niska wartość współczynnika dyskryminacji potwierdzają dużą przydatność układu D1S80 do celów identyfikacyjnych. W celu określenia potencjalnego odchylenia



Rycina 1. Diagram przedstawiający porównane częstości rozkładu alleli lokus D1S80 dla populacji lubelskiej (11) i gdańskiej.

Populacja badana w Gdańsku – ciemniejsze słupki; populacja badana w Lublinie – jaśniejsze słupki.

Fig. 1. Diagram shows comparison of allele distribution of D1S80 locus for Lublin (11) and Gdańsk population.

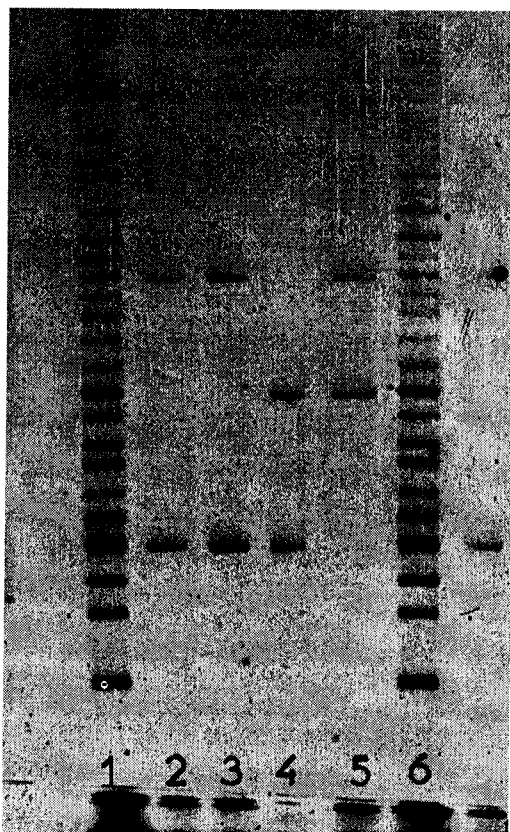
Gdańsk population – dark bars. Lublin population – light bars.

od prawa równowagi Hardy'ego–Weinberga zastosowano test χ^2 . W tym celu utworzono 5 grup alleli (I – 18, II – 19–23, III – 24, IV – 25–28 and V – 29–41) dających 15 klas genotypów (3). W badanej populacji dla układu D1S80 nie stwierdzono niezgodności z prawem Hardy'ego–Weinberga ($\chi^2 = 17.178$, $df = 13$, $0.2 > P > 0.1$). Uzyskane dane populacyjne D1S80 dla Polski północnej pozwalają więc aktualnie na obliczenie częstości fenotypów D1S80 w sprawach identyfikacyjnych.

Zastosowanie układu D1S80 do badania śladów biologicznych.

Układ D1S80 wprowadzony został w naszym Zakładzie jako drugi po amelogenieinie do badań identyfikacyjnych śladów biologicznych na początku 1993 roku. Nasze doświadczenia wskazują na dużą jego przydatność do badania plam biologicznych szczególnie w przypadkach amplifikacji DNA izolowanego z plam nasienia i cebulek włosowych oraz tkanek miękkich. W niektórych przypadkach możliwe jest uzyskanie amplifikacji D1S80 z DNA izolowanego z kości.

Rycina 2 przedstawia zastosowanie układu D1S80 do badań identyfikacyjnych ludzkiego szkieletu. Prawie kompletny szkielet z resztkami tkanek miękkich znaleziony został w wodzie. Przypuszczano, że są to zwłoki zaginionej kobiety, do której zabójstwa przyznał się jej mąż, twierdząc jednak zdecydowanie iż ciało po zabójstwie w całości spalił w domowym piecyku. Amplifikacja sekwencji swoistych dla płci (amelogenina) oraz oględziny szkieletu potwierdziły, że szkielet ten pocho-



Rycina 2. Badanie identyfikacyjne. Profile D1S80 uzyskane po amplifikacji DNA wyizolowanego ze szkieletu kobiety (ścieżka 5 – fenotyp 24/29), oraz trzech próbek porównawczych: mężczyzny (ścieżka 2 – fenotyp 18/29) oraz jego dwojga dzieci (ścieżka 3 – fenotyp 18/29 i ścieżka 4 – fenotyp 18/24). Ścieżka 1 i 6 drabiny alleli D1S80. Katoda u góry ryciny.

Fig. 2. Identification analysis. Profiles of D1S80 obtained after amplification of DNA isolated from woman's skeleton (lane 5 – phenotype 24/29) and of three compared samples (lane 2 – phenotype 18/29) and two their children (lane 3 – phenotype 18/29 and lane 4 – phenotype 18/24). Lanes 1 and 6 contain allelic ladders of D1S80. Cathode at the top.

dzi od kobiety. W celu stwierdzenia czy znaleziony szkielet faktycznie jest szkieletem zaginionej, wyizolowano DNA z krwi podejrzanego, dwójki jego dzieci oraz z substancji zbitej kości NN kobiety. U obojga dzieci stwierdzono obecność alleli występujących u ich ojca jak i DNA wyizolowanym ze szkieletu (Rycina 2). Podobną zgodność jak w przypadku układu D1S80 stwierdzono również w układach SE33, TC11 (wyniki nie zamieszczone w pracy). Amplifikacja układu Apo B dała wynik negatywny. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość uzyskania amplifikacji układu D1S80 z DNA izolowanego z kości o znaczym stopniu zaawansowania degradacji, będących również materiałem, w którym ilość ludzkiego DNA jest zazwyczaj znikoma.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen RC., G.Graves, B.Budowle: *Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver*. BioTechniques 1989, 7, 736. – 2. Alonso A., P.Martin, C.Albarran, M.Sancho.: *Amplified fragment length polymorphism analysed of the VNTR locus D1S80 in central Spain*. Int. J.Leg Med. 1993, 105, 311. – 3. Brenner C., Morris JW.:. *Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes; validation and other studies*. W: Proceedings for the International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, USA, 1990, 21–53. – 4. Budowle B., F.S.Baechtel: *Modification to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing*. Appl Theor Electroiphor, 1990, 1, 181. – 5. *DNA recommendations – 1992 report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphism*. Int J. Leg Med 1992, 104, 63. – 6. Hochmeister MN. B.Budowle, UV Borer, R.Dirrhofer: *Swiss population data on the loci HLA-DQ α , LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, Gc and D1S80*; Forensic Sci Int. 1994, 67, 175. – 7. Hochmeister MN., B.Budowle, UV. Borer, U.Eggmann, CT Comey, R.Dirrhofer: *Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains*. J.Forensic Sci, 1991, 36, 1649. – 8. Huang NE., R.Chakraborty, B.Budowle: *D1S80 allele frequencies in a Chinese population*. Int J. Leg Med 1994, 107, 118. – 9. Kasai K. Nakamura Y, R.White: *Amplification of variable number of tandem repeats (VNTR) locus pMCT1180 by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science*. J.Forensic sci, 1990, 35, 1196. – 10. Kloosterman Ad., B.Budowle, P. Daselaar: *PCR – amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus*. Int J. Leg Med, 1993, 105, 257.
11. Kozioł P., M.Ciesielska: *Oznaczanie genotypów lokus D1S80 metodą PCR*. Arch. Med. Sąd i Krym. 1993, 43, 206. – 12. Lahiri DK., S.Bye, JI.Nurnberg Jr, M E. Hodes. M.Crisp: *A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than nine other methods tested*. J.Bioch. Bioph. Meth. 1992, 25, 193. – 13. Nei M., Roychoudhury AK.: *Sampling variances of heterozygosity and genetic distance*. Genetics, 1974, 76, 379. – 14. Pawłowski R., A.Welz., A. Burkiewicz: *Porównanie wydajności i jakości DNA izolowanego z krwi ludzkiej trzema różnymi metodami*. Ann Acad Med Gedan, 1994, 24, 23. – 15. Sajantila A., B.Budowle, M.Strom, V.Johnson, M.Luka, L.Pel-

tonen, C.Ehnholm: *PCR amplification of alleles at the D1S80 locus: Comparison of Finnish and a North American Caucasian population sample, and forensic evaluation.* Am J.Hum Genet., 1992, 50, 816. – 16. Schnee–Griese J., G.Blass, S.Herrmann, HR, Schneider, R.Foerster, G.Bassler, W.Pflug: *Frequency distribution of D1S80 alleles in the German population,* Forensic Sci Int. 1993, 59, 131. – 17. Skowasch K., P.Wiegand, B.Brinkmann: *pMCT118 (D1S80); a new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles.* Int. J Leg Med. 1992, 105, 165. – 18. Thymann M., LJ.Nellmann, G.Masumba, L.Irgens–Møller, N.Morling: *Analysis of the locus D1S80 by amplified fragment length polymorphism technique (AMP–FLP), frequency distribution in Danes. Intra and inter laboratory reproducibility of the technique.* Forensic Sci. Int. 1993, 60, 47. – 19. Wong Z., V.Wilson, I.Patel, S.Povey, AJ. Jeffreys: *Characterisation of a panel of highly variable minisatelites clones from human DNA;* Ann Hum Genet, 1987, 51, 269.

Podziękowania

Autor wyraża serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Berndowi Brinkmannowi z Instytutu Medycyny Prawnej w Münster za dostarczenie drabiny alleli dla lokus D1S80 oraz umożliwienie dokonania komputerowych obliczeń statystycznych (Carmody test) znamienności różnic częstości alleli pomiędzy różnymi populacjami.

Adres autora:

Katedra Medycyny Sądowej

ul. Skłodowskiej–Curie 3a

80–210 Gdańsk – Wrzeszcz

Nadesłano do Redakcji: 1995–02–07

Zakwalifikowano do druku: 1995–04–26