



UNIVERSITÀ DI PARMA

ARCHIVIO DELLA RICERCA

University of Parma Research Repository

Analisi PCR del locus polimorfico D17S30 (YNZ22) in un campione popolazionistico parmense

This is the peer reviewed version of the following article:

Original

Analisi PCR del locus polimorfico D17S30 (YNZ22) in un campione popolazionistico parmense / Cucurachi, N.; Tagliabracci, A.; Porro, D.; Regazzi, E.; Buscemi, L.; Ferrara, S.D.. - In: RIVISTA ITALIANA DI MEDICINA LEGALE. - ISSN 1124-3376. - XV:1(1993), pp. 127-136.

Availability:

This version is available at: 11381/2785261 since: 2015-02-17T16:51:51Z

Publisher:

Published

DOI:

Terms of use:

openAccess

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available

Publisher copyright

(Article begins on next page)

RIVISTA ITALIANA
DI
MEDICINA LEGALE

Dottrina, casistica, ricerca sperimentale, giurisprudenza e legislazione

Consiglio direttivo

GUIDO ALPA - MAURO BARNI - GIACOMO CANEPA
ANTONIO DELL'ERBA - ANGELO FIORI - ANTONIO FORNARI
FRANCESCO INTRONA - RAINERI LUVONI - ROMEO POZZATO
GOFFREDO SCIAUDONE - FEDERICO STELLA

Direttore responsabile

FRANCESCO INTRONA

Organo ufficiale della Società Italiana
di Medicina legale e delle assicurazioni

ESTRATTO



MILANO

DOTT. A. GIUFFRÈ EDITORE

**ANALISI PCR DEL LOCUS POLIMORFICO D17S30 (YNZ22)
IN UN CAMPIONE POPOLAZIONISTICO PARMENSE**

di NICOLA CUCURACHI *, ADRIANO TAGLIABRACCI **, DANIELA PORRO *, ESTER REGAZZI *, LOREDANA BUSCEMI *
SANTO DAVIDE FERRARA *

Parole chiave: polimorfismi del DNA; PCR; YNZ22; genetica delle popolazioni; locus D17S30

Key words: DNA polymorphisms; PCR; YNZ22; population genetics; locus D17S30

Introduzione.

La frazione non codificante del genoma umano è costituita in grande quantità da loci ipervariabili, che mostrano un alto grado di variazione allelica. L'elevato polimorfismo di questi loci dipende dalla presenza di segmenti, o « core », di DNA ripetuti in forma tandem in numero variabile di volte (VNTR — variable number of tandem repeats) [1].

Il polimorfismo di questi loci può essere evidenziato mediante la classica tecnica del Southern Blotting [2].

Nelle indagini forensi, i reperti sottoposti ad analisi contengono spesso DNA in quantità limitata e parzialmente degradato, tanto da non rendere utilizzabile la tecnica del Southern Blotting [3, 4]; altri limiti di questa tecnica sono rappresentati dall'uso di isotopi radioattivi e dalla tediosità del metodo.

Una tecnica, ormai affermata, impiegata nelle indagini del DNA, la Polymerase Chain Reaction o PCR [5], costituisce un

* Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università di Parma, Via Gramsci, 14, 43100 Parma.

** Cattedra di Medicina Legale, Istituto di Medicina e Sanità Pubblica, Università di Ancona, Policlinico di Torrette, 60020 Torrette, Ancona.

potente strumento per l'analisi di campioni biologici anche non perfettamente conservati e/o in scarsa quantità, mediante una semplice metodica di amplificazione in vitro e successiva rilevazione mediante elettroforesi o ibridizzazione degli amplificati. Tale tecnica si è dimostrata affidabile per lo studio di polimorfismi di sequenza e di lunghezza, che vengono ormai routinariamente usati in casi forensi di identificazione personale e di indagine di paternità.

Il sistema YNZ22, situato sul cromosoma 17 (locus D17S30) appartiene ai polimorfismi di lunghezza che vanno sotto il nome di AMP-FLP's - amplifiable fragment length polymorphisms. Mancano per questo sistema indagini popolazionistiche sufficientemente estese per ottenere dati su distribuzione ed eventuali variazioni geografiche delle frequenze alleliche, necessarie per la concreta utilizzazione in ambito di identificazione personale e di paternità controversa. Al momento sono state effettuate indagini, su un limitato numero di soggetti di razza caucasica e non, negli Stati Uniti [6] e in Germania [7].

Questo studio si propone di indagare un campione rappresentativo della popolazione di Parma e di operare un raffronto dei risultati con quelli riferiti nei precedenti studi popolazionistici.

Materiali e metodi.

L'indagine è stata effettuata su 100 donatori afferenti al locale Centro Trasfusionale, non imparentati fra loro e residenti nella Provincia di Parma. Il DNA è stato estratto da 700 μ l di sangue intero con tecnica organica in fenolo-cloroformio [8].

L'amplificazione è stata programmata su Thermal Cycler (MJR PTC 100-60) per 27 cicli di:

denaturazione a 94° per 1 minuto

annealing a 63° per 1 minuto

estensione a 72° per 1 minuto

oltre ad un ciclo iniziale di denaturazione per 5 minuti e un ciclo finale di estensione per 11 minuti.

Sono stati utilizzati i Primers indicati da Budowle [7]:

5' - AAAGTGCAGAGAGAAAGGTCGAAGAGTGAAGTG

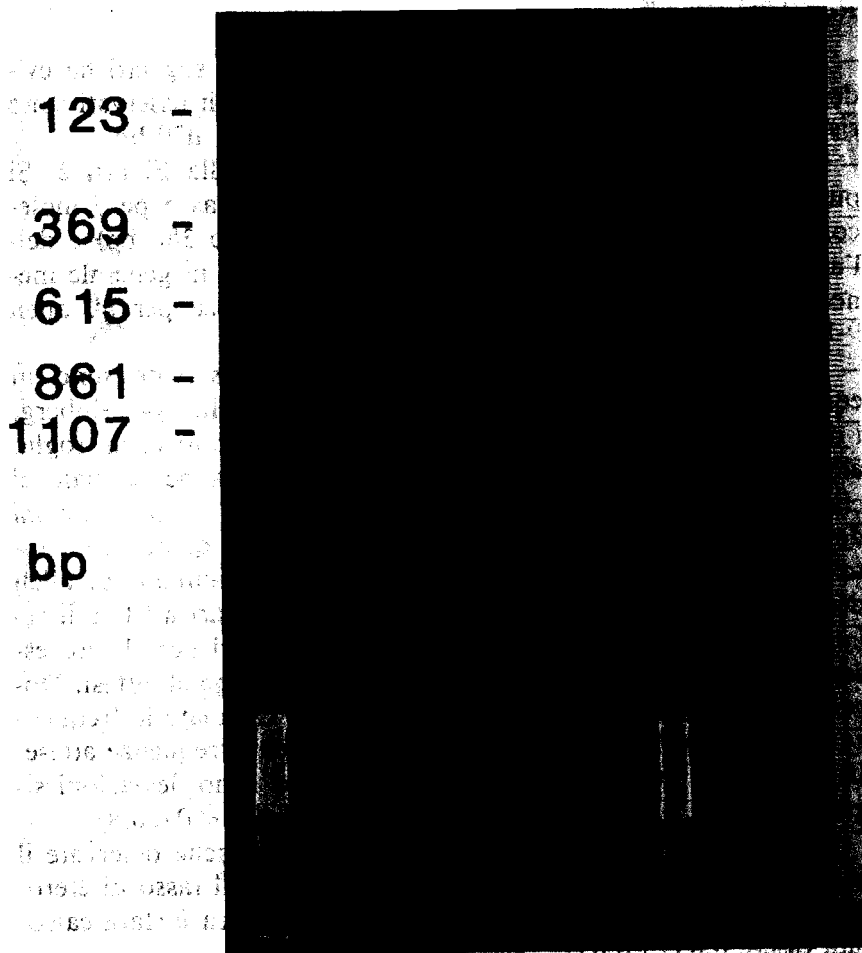
-3'

5' - AAAGGATCCCCCACATCCGCTCCCAAGTT - 3'

a concentrazione di 1 μ M in una miscela di amplificazione composta da 50 ng di DNA genomico, 200 nM di ciascun nucleotide libero, 2 unità di Taq polimerasi, 5 μ l di buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), acqua bidistillata fino al volume di 50 μ l.

Gli amplificati sono stati sottoposti a elettroforesi orizzontale in gel di Agarosio al 1,5%, in TAE 1X, a 50 V, per 16 ore. L'identificazione degli alleli è avvenuta mediante raffronto con il 123bp ladder (GIBCO-BRL) (Figura 1).

FIGURA 1 - Corsa elettroforetica in Gel di Agarosio (1,5% in TAE 1X, 16 h a 50 V) visualizzato con UV dopo colorazione in Etidio Bromuro (da sn a dx: 10-12, 123 bp Ladder, 4-9, 3-9, 4-5, 2-9, p Gem Marker, 4-10, 9-9, 4-6, 8-9, 123 bp Ladder, 2-4).



Per il calcolo del chi quadro gli alleli sono stati raggruppati in quattro gruppi (bins) secondo quanto proposto da Rand et al. [7]: l'allele 1 e 2 nel I gruppo; l'allele 3 nel II gruppo; l'allele 4 nel III gruppo; i restanti 9 alleli nel IV gruppo (Figura 2).

La diversità allelica, che equivale alla frequenza degli eterozigoti attesi, è stata calcolata con la seguente formula:

$$H = [1 - \sum X_i^2] / [n / n - 1]$$

dove X_i è la frequenza allelica e n il numero degli alleli.

Il potere di discriminazione (P_D) è stato calcolato come $1 - \sum (P_i)^2$, dove P_i è la frequenza di ogni genotipo.

Risultati

L'indagine effettuata in un campione di 100 soggetti ha evidenziato un numero di alleli uguale a 13. Gli alleli osservati sono risultati essere di peso corrispondente a $170 \text{ bp} \pm n70 \text{ bp}$.

La distribuzione allelica è rappresentata nella Figura 2. Si può notare una netta prevalenza degli alleli di basso peso molecolare, con assoluta prevalenza dell'allele 4 (peso 380 bp) e dell'allele 2 (peso 240 bp). Fra gli alleli più pesanti, in generale meno rappresentati, si nota una maggiore frequenza per gli alleli 9-10.

Per verificare se le frequenze alleliche osservate sono in equilibrio con quelle attese secondo la legge di Hardy-Weinberg, i dati relativi al campione indagato sono stati inseriti in un foglio elettronico, che dopo aver calcolato la frequenza percentuale di ciascuna forma allelica, ha sommato il numero di osservazioni dei singoli alleli in gruppi di alleli (bins) secondo quanto mostrato in Tabella 1. Considerato, infatti, l'elevato numero di alleli del sistema, con un numero teorico di genotipi pari a 91, e il relativamente basso numero di individui tipizzati, vi potrebbero essere differenze notevoli fra i genotipi osservati e quelli attesi. Dopo questa operazione sono state nuovamente calcolate le frequenze osservate per i vari gruppi e le corrispondenti frequenze attese. Il test del chi quadro ha mostrato che non vi sono deviazioni significative fra i valori osservati e quelli attesi ($0,7 < P < 0,8$).

Sulla base dei valori delle frequenze genotipiche osservate il P_D del sistema indagato è risultato pari a 0,94. Il tasso di eteroziguità è risultato pari a 0,80. La diversità allelica è stata calcolata essere $0,833 \pm 0,037$.

FIGURA 2 - Distribuzione allelica del sistema polimorfico YNZ22 nella popolazione della Provincia di Parma.

YNZ22

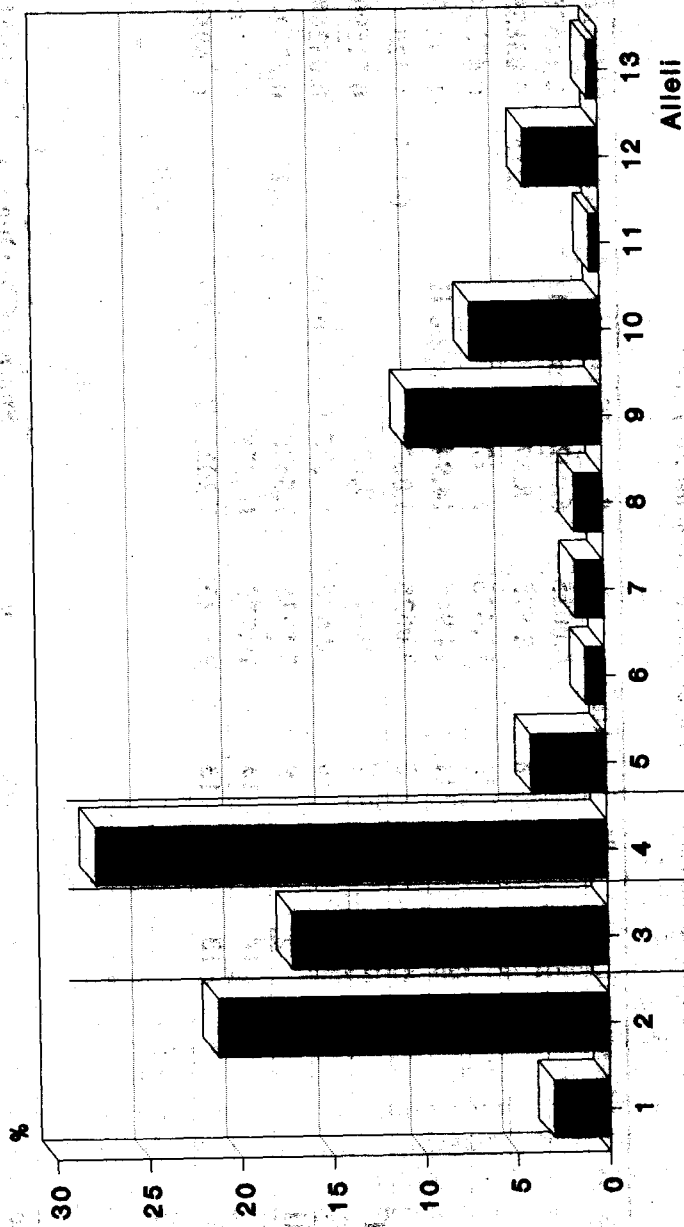


TABELLA 1 - Somma delle osservazioni alleliche in gruppi (bins) e calcolo del chi quadro.

Genotipi	Osservati	%	Attesi	%	Frequenza Genica	Chi-Quadro
I-I	7		6,0025	6,0025	Gruppo I	0,165765306
I-II	8		8,575	8,575		0,038556851
I-III	16		13,475	13,475		0,473144712
I-IV	11		14,945	14,945	Gruppo II	1,041353295
II-II	5		3,0625	3,0625		1,225765306
II-III	7		9,625	9,625		0,715909091
II-IV	10		10,675	10,675	Gruppo III	0,042681499
III-III	9		7,5625	7,5625		0,275
III-IV	14		16,775	16,775		0,459053651
IV-IV	13		9,3025	9,3025	Gruppo IV	1,469659366
						0,305
					Totale	
						1
Totale	100	100	100		Somma Chi Quadro	5,90513288
					(0,70 < P < 0,80; 9 g.l.)	

I risultati del presente lavoro sono stati raffrontati con quelli effettuati precedentemente su altre popolazioni [6, 7]. La distribuzione percentuale degli alleli rilevata dalla nostra indagine è risultata analoga a quella rilevata su campioni popolazionistici di simile ampiezza indagati in Germania e negli Stati Uniti (Figura 3).

Discussione e conclusioni.

L'analisi del sistema polimorfico del DNA YNZ22 in un campione di popolazione parmense ha rilevato la presenza dei 13 comuni alleli. La separazione delle bande alleliche dopo elettroforesi in agarosio è stata netta e la identificazione dei vari alleli agevole. Ciò dipende dal numero di paia di basi — 70 — di cui è costituita la sequenza base.

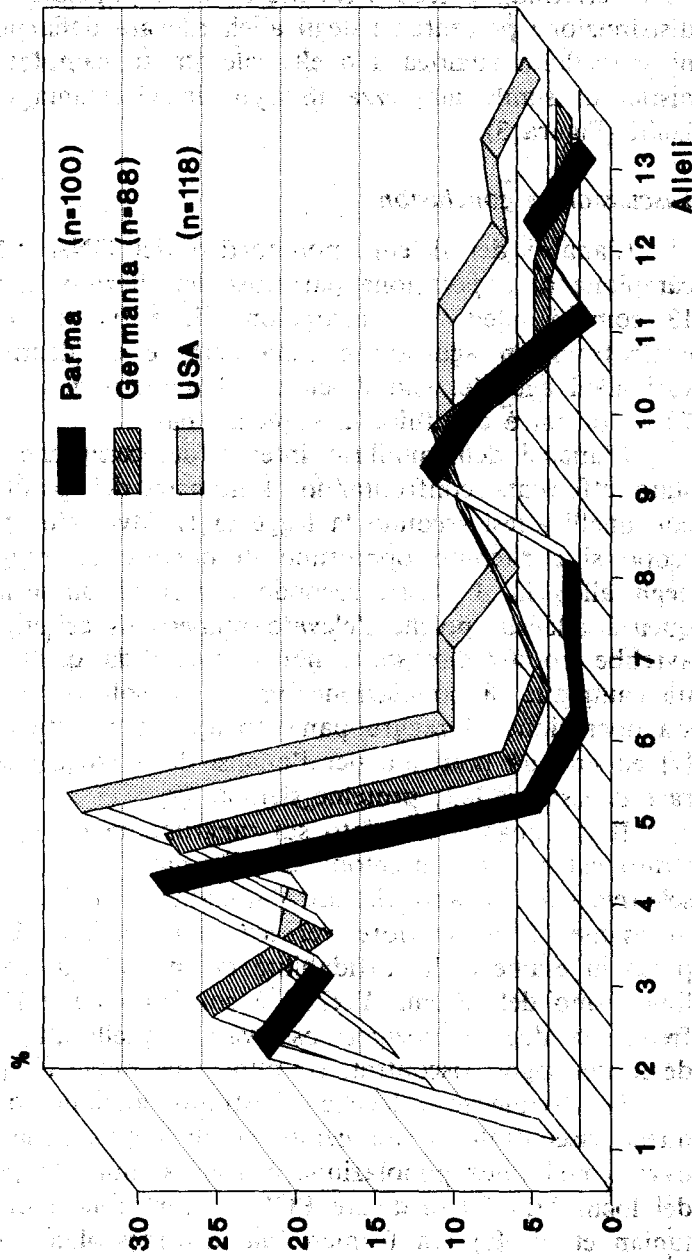
L'analisi dell'equilibrio interno del campione esaminato è stata effettuata confrontando il numero dei genotipi osservati con quelli attesi secondo la legge di Hardy-Weinberg. A questo scopo si è ritenuto opportuno di operare un raggruppamento degli alleli in 4 classi, secondo criteri di omogeneità di frequenza allelica, poiché l'elevato numero di genotipi attesi (91) avrebbe potuto discostarsi notevolmente da quelli osservati in un campione di popolazione limitato a soli 100 soggetti. Questa operazione di raggruppamento appare statisticamente valida [7] ed era già praticata per l'analisi della frequenza di varianti rare di sistemi delle proteine sieriche [9].

Il chi quadro calcolato sui raggruppamenti operati ha mostrato valori che consentono di affermare l'assenza di pressioni selettive che possano alterare l'attendibilità del campione preso in esame. Una ulteriore verifica della validità del campione preso in esame e dell'affidabilità del metodo di analisi del polimorfismo del sistema YNZ22 è consistita nel raffronto fra la frequenza degli eterozigoti osservati e quelli attesi. Il numero degli eterozigoti riscontrati si colloca nel range di quelli attesi.

Le frequenze alleliche mostrano andamento analogo a quelle riscontrate in un campione di popolazione tedesca [7], ovvero nell'unica popolazione caucasica indagata per il sistema del locus D17S30 mediante PCR. Il campione indagato da Batanian et al. [6] era formato da una mescolanza di caucasici, neri, ispanici e altri non specificati. Ciò nonostante, le frequenze alleliche di questo eterogeneo campione mostrano valori

FIGURA 3 - Confronto fra la distribuzione allelica della popolazione della Provincia di Parma con quella tedesca (Rand et al.) e con quella statunitense (Bateman et. al.).

YNZ22



simili a quelli riscontrati nella popolazione caucasica (Figura 3).

Il potere discriminativo (P_D) relativo al locus polimorfico D17S30 è risultato pari a 0,94, valore particolarmente elevato se confrontato con il P_D dei comuni sistemi immunologici ed elettroforetici utilizzati nei laboratori di Emogenetica Forense.

In definitiva, sulla base dei risultati ottenuti dalla presente indagine, che sarà in futuro estesa ad un più ampio campione popolazionistico, si può affermare che il sistema polimorfico di lunghezza YNZ22 è tecnicamente affidabile. L'indagine elettroforetica ha dimostrato trattarsi di alleli che consentono l'allestimento di un database da impiegare in tema di identificazione e di calcolo biostatistico di paternità.

RIASSUNTO

È stata eseguita un'indagine del sistema polimorfico YNZ22 (locus D17S30) su un campione popolazionistico della Provincia di Parma. Dopo amplificazione PCR è stata effettuata elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio-bromuro, che ha consentito l'evidenziazione di 13 varianti alleliche. Il calcolo del X^2 non ha evidenziato deviazioni rispetto all'equilibrio di Hardy-Weinberg. Il Potere Discriminativo (P_D) del sistema indagato è risultato pari a 0,94. La distribuzione delle frequenze alleliche è risultata simile a quella di altre popolazioni caucasiche. L'elevato Potere Discriminativo e l'assenza di evidenti pressioni selettive rendono il sistema polimorfico indagato suscettibile di efficace utilizzo in campo medico-legale.

SUMMARY

Analysis of polymorphic system YNZ22 (locus D17S30) was carried out in a population sample from the Province of Parma. After PCR amplification, agarose gel electrophoresis and ethidium-bromide staining were performed, and thirteen alleles were found. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was shown by the X^2 -test. The Discriminating Power (P_D) value for the analysed system was found to be 0,94. Allelic frequency distribution was found to be similar to that of other Caucasian populations. The high Discriminating Power and lack of selective pressure make the analysed polymorphic system particularly valuable in forensic investigation.

BIBLIOGRAFIA

- [1] FOWLER J.C.S., BURGOYNE L.A., SCOTT A.C., HARDING H.W., *Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation - A concise review relevant to forensic biology*, J. For. Sci. 33, 1111, 1988.

- [2] SOUTHERN E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*, J. Mol. Biol. 98, 503, 1975.
- [3] WERRETT D.I., *DNA Fingerprinting*, Int. Crim. Police Rev., September-October, 21, 1987.
- [4] GILL P., LYGO J.E., FOWLER S.J., WERRETT D.I., *An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes*, Electrophoresis 8, 38, 1986.
- [5] SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ER-
LICH H.A., ARNHEIM N., *Enzymatic amplification of beta-globin geno-
mic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell ana-
emia*, Science 230, 1350, 1985.
- [6] BATANIAN J.R., LEDBETTER S.A., WOLFF R.K., NAKAMURA Y, WHITE
R., DOBYNS W.B., LEDBETTER D.H., *Rapid diagnosis of Miller-Dieker
syndrome and isolated lissencephaly sequence by the polymerase chain
reaction*, Hum Genet 85, 555, 1990.
- [7] RAND S., PUERS C., SKOWASCH K., WIEGAND P., BUDOWLE B.,
BRINKMANN B., *Population genetics and forensic efficiency data of 4
AMPFLP's*, Int J Leg. Med. 104, 329, 1992.
- [8] BUDOWLE B., BAECHEL F.S., *Modification to improve the effective-
ness of restriction fragment length polymorphism typing*, Appl.
Theor. Electrophor. 1, 181, 1990.
- [9] TAGLIABRACCI A., GIORGETTI R., *Tf, Pi and Gc variants: a study by
isoelectrofocusing with immobilized pH gradients*, in Adv. For. Hae-
mogenet., W.R. Mayr Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1988,
p. 197.