

Null Allele in the D18S51 Locus Responsible for False Homozygosities and Discrepancies in Forensic STR Analysis

Yong-Bin Eom[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan 331-718, Korea

Short tandem repeats (STRs) loci are the genetic markers used for forensic human identity test. With multiplex polymerase chain reaction (PCR) assays, STRs are examined and measured PCR product length relative to sequenced allelic ladders. In the repeat region and the flanking region of the commonly-used STR may have DNA sequence variation. A mismatch due to sequence variation in the DNA template may cause allele drop-out (i.e., a "null" or "silent" allele) when it falls within PCR primer binding sites. The STR markers were co-amplified in a single reaction by using commercial PowerPlex[®] 16 system and AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification kits. Separation of the PCR products and fluorescence detection were performed by ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer with capillary electrophoresis. The GeneMapper[™] ID software were used for size calling and analysis of STR profiles. Here, this study described a forensic human identity test in which allelic drop-out occurred in the STR system D18S51. During the course of human identity test, two samples with a homozygous (16, 16 and 21, 21) null genotype at D18S51 locus were discovered using the PowerPlex[®] 16 system. The loss of alleles was confirmed when the samples were amplified using AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification kit and resulted in a heterozygous (16, 20 and 20, 21) genotype at this locus each other. This discrepancy results suggest that appropriate measures should be taken for database comparisons and that null allele should be further investigated by sequence analysis and be reported to the forensic community.

Key Words: Null allele, Homozygosity, Discrepancy, Forensic short tandem repeat (STR) analysis

서 론

법의학적인 개인식별은 각종 사건 현장 증거물에서 유전자형을 검출함으로써 피의자 또는 피해자와 관련성 및 사건 현장 존재여부를 확정하는데 중요하다 (Eom, 2009). PowerPlex[®] 16 system과 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification 키트는 현재 법의학적인 유전자분석 기법에서 가장 보편적으로 사용하고 있는 것으로 다중 증합효소 연쇄반응 (multiplex polymerase chain reaction)으로 여러 개의 단기일렬반복 (short tandem repeat; STR) 마커들을 동시에 증폭하여 분석하게 된다. 이 분석기법들은 많은 STR 마커를 공유하지만 똑같은 시발체 (primer)를 사용하지는

않는다. 각각의 유전자자리 특이 시발체들은 STR 유전자자리에 인접한 고도로 보존된 뉴클레오티드 서열을 표적으로 한다. 이러한 시발체 결합 부위가 고도로 보존적이지만, 가끔 이 주형 DNA 부위에서 돌연변이가 일어날 수 있다 (Oberacher et al., 2008). 만약 시발체 결합 부위에 돌연변이가 생기면, 시발체가 주형 DNA에 결합하지 못해 그 대립유전자를 증폭하지 못하므로 대립유전자 소실의 결과를 초래한다.

많은 유전자자리에서 D8S1179 (Budowle et al., 2001; Han et al., 2001; Leibelt et al., 2003), D13S317 (Rubocki et al., 2000; Boutrand et al., 2001), D16S539 (Nelson et al., 2002), CSF1PO (Budowle et al., 1999), vWA (Kline et al., 1998) 대립유전자 소실 (allelic dropout)의 예가 보고되어 왔다. PowerPlex[®] 16 system 키트의 정확한 시발체 염기서열이 공개되어 (Masibay et al., 2000) 있는 반면에 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification 키트의 시발체 염기서열은 공개되어 있지 않다. 이 두 키트 사이의 시발체 결합 부위에서 염기서열 변이의 확인은 거의 안되었지만, 그럼에도 불구하고 이러한 돌연변이에 의한 DNA 프로파일

*접수일: 2011년 5월 9일 / 수정일: 2011년 6월 18일
채택일: 2011년 6월 21일

[†]Corresponding author: Yong-Bin Eom, Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, 456 Ssangyong-Dong, Seobuk-Gu, Cheonan-City, Chung Nam, 331-718 Korea.
Tel: +82-41-570-4166, Fax: +82-41-570-4258
e-mail: omnibin@kornu.ac.kr



Fig. 1. Electropherograms showing results of DNA typing. STR profiles were analyzed on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer after co-amplification of thirteen STRs plus the Amelogenin with PowerPlex® 16 System Kit. Profile show that the D18S51 locus is homozygous (16, 16 and 21, 21) genotype.

링 결과의 불일치를 보고하는 것은 중요하다 (Budowle et al., 2001). 법의학적 유전자분석 실험실들 사이의 높은 재현성을 유지하기 위해, 낮은 수준의 대립유전자 소실과 각 키트들 사이의 높은 일치율이 요구된다.

본 연구의 목적은 법의학적 유전자분석 기법으로 사용되고 있는 DNA 프로파일 분석을 13개 유전자자리의 STR 마커와 XY 염색체 분석을 위해 Amelogenin 유전자자리를 모두 포함하는 PowerPlex® 16 system과 AmpFISTR® Identifiler® PCR amplification 키트를 사용해서 한국인의 D18S51 유전자자리에서 null 유전형을 확인함으로써 대립유전자 소실로 인해 법의학적 개인식별에서 잘못 판단할 위험성을 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

타액반 시료

법의학적 개인식별을 위해 면봉도말 채취한 타액반 (salivary stain) 시료는 검사에 앞서 개인 신상정보를 완전히 삭제하여 익명 상태의 시료를 대상으로 중복 실험을 원칙으로 하여 실시하였다.

DNA의 추출

타액반 시료는 QIAamp® DNA Micro Kit를 QIAcube™ (QIAGEN®, Hilden, Germany) 자동화 기기에서 각각의 사용자 매뉴얼에 따라 genomic DNA를 추출하였다.

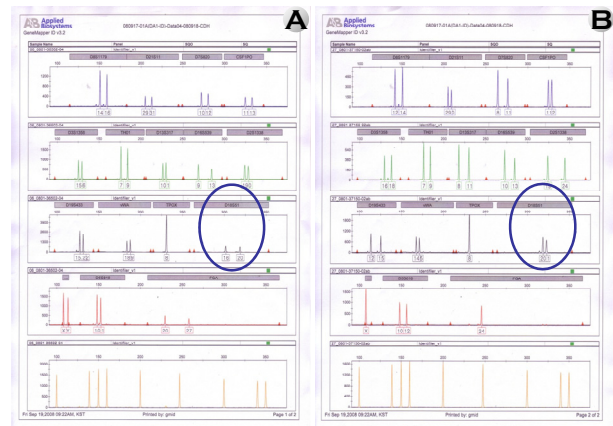


Fig. 2. Electropherograms showing results of DNA typing. STR profiles were analyzed on an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer after co-amplification of thirteen STRs plus the Amelogenin with AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit. Profile show that the D18S51 locus is heterozygous (16, 20 and 20, 21) genotype.

DNA의 정량

추출한 DNA는 2% agarose gel에서 control DNA (K562)와 함께 전기영동하여 육안으로 확인한 후, 각각의 시료에서 사람 genomic DNA 전체 양은 Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, CA, USA)를 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)에서 사용하여 각각 정량화하였다.

DNA 프로파일링

정량된 DNA를 1 ng 농도로 맞추어 PowerPlex® 16 System (Promega, WI, USA), AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, USA) 각각의 사용자 매뉴얼에 따라 GeneAmp® 9700 system (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 증폭하였다. 증폭 산물의 유전형은 ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 분석하였고, DNA 프로파일은 GeneMapper™ ID Software (Applied Biosystems)를 사용하여 결정하였다.

결 과

D18S51 유전자자리에서 대립유전자 소실

PowerPlex® 16 System (Promega, WI, USA) 키트를 사용한 경우 두 개의 DNA 검체에서 D18S51 (16, 16), D18S51 (21, 21)의 동형접합성 (homozygosity) 결과를 보였다 (Fig. 1).

Table 1. Homozygosity and Heterozygosity results of Forensic STR analysis

Locus	Genotype	Homozygosity [†]		Heterozygosity [‡]	
D18S51		16, 16	21, 21	16, 20	20, 21
Amelogenin		XY	XX	XY	XX

[†] Homozygosity genotype was analyzed by PowerPlex[®] 16 System Kit,

[‡] Heterozygosity genotype was analyzed by AmpFISTR[®] Identifiler PCR Amplification Kit with ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer.

D18S51 유전자자리에서 이형접합성 결과

상기 동형접합성 (대립유전자 소실) 결과를 재확인 하기 위해 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 D18S51 (16, 20), D18S51 (20, 21)의 이형접합성 (homozygosity) 결과를 얻었다 (Fig. 2).

DNA 프로파일 비교

DNA 프로파일링 결과는 성별 마커인 Amelogenin 유전자자리에서 검체A는 남성을 나타내는 XY를, 검체B는 여성을 나타내는 XX를 보였고, 12개 STR 유전자자리에서 PowerPlex[®] 16 System과 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit 모두 똑같은 대립유전자를 보였지만 D18S51 유전자자리에서 PowerPlex[®] 16 System는 동형접합성결과를 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit는 이형접합성 결과를 보였다 (Table 1).

이러한 결과는 D18S51 유전자자리 인접 부위에 돌연변이로 인해 PowerPlex[®] 16 System 시발체가 priming을 하지 못해 증폭산물이 만들어지지 않았기 때문인 것으로 판단되었다.

고 찰

법의학적 유전자분석에 의한 개인식별 검사에서 신뢰할만한 결과를 얻기 위해서는 표적 유전자자리에 특이적이고 강력한 유전자 증폭이 필수적이다. 표적 부위안의 대립유전자를 증폭하는 것이 실패하는 경우는, 주형 DNA의 양이 불충분할 때 (Schlenk et al., 2004), PCR 조건이 좋지 않을 때 (Roberson et al., 1998), 시발체가 불일치할 때 (Kwok et al., 1990; Boutrand et al., 2001; Han et al., 2001; Nelson et al., 2002; Leibelt et al., 2003; Clayton et al., 2004) 등이다.

13개의 STR 마커들을 증폭하기 위한 상품화 키트의 시발체들은 분석하고자 하는 STR 유전자자리에 인접한

고도로 보존된 뉴클레오티드 서열을 표적으로 한다. 이들 시발체 결합 부위가 고도로 보존되었다 할지라도, 이 부위 안에서의 DNA 돌연변이로 인해 시발체 결합 부위가 변이되었을 때는 그 대립유전자의 증폭이 잘 안되었던 경우가 보고되었다 (Heinrich et al., 2004).

D18S51 유전자자리의 PowerPlex[®] 16 STR 분석 시스템의 경우 두 개의 DNA 검체에서 동형접합성 (대립유전자 소실) 결과를 보여 검체의 재증폭과 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification 키트를 사용하여 재검사 함으로서 D18S51 유전자자리의 이형접합성 결과를 확인하였다. 염기서열 결정법으로 확인하지 않았지만 돌연변이가 생긴 주형 DNA와 PowerPlex[®] 16 system 키트에서 사용된 시발체 서열 사이의 불일치가 대립유전자 소실 (동형접합성) 결과를 야기한 것으로 사료된다. Delamoye 등은 상용 유전자 분석 키트들 사이의 불일치 결과가 시발체 결합부위의 돌연변이 3116G>A (GenBank M64982)에 의해 야기되었으며 (Delamoye et al., 2004), Amarin 등도 DNA 염기서열 분석을 하지는 않았지만 PowerPlex[®] 16 system 키트에 의해서는 동형접합성 결과를 AmpFISTR[®] Identifiler[®] PCR amplification 키트로는 이형접합성 결과의 예를 보고하였다 (Amarin et al., 2004). 그러므로 본 연구에 보인 대립유전자 소실 결과는 Amarin 등의 연구와 비교하여 해석될 수 있을 것이다.

동종 골수 이식 치료 환자의 법의학적 유전자형 분석에 의한 개인식별을 실시하는 경우, 키메라 현상은 결과 해석 과정에서 잘못 배제 (false exclusion)시키거나 두 명의 유전자가 혼합된 것으로 오인되어 DNA 프로파일 해석 결과와 정황 증거가 일치하지 않는 혼란을 초래할 수 있음을 보고하였다 (Eom, 2010). 따라서 이형접합성 결과가 두 명의 유전자가 혼합된 키메라 현상으로 오인되지 않으려면 법의학적 유전자분석에 의한 개인식별 검사에 보다 많은 수의 STR 마커를 사용할 필요성과 Applied Biosystems사의 AmpFISTR[®] PCR Kit들에서 사용되고 있는 시발체의 염기서열을 공개하는 것이 서로 다른 시발체를 사용하는 키트들간의 결과 불일치와 대립유전자

소실 결과 (null allele)의 오류를 막는데 필요하다고 생각된다.

결론적으로, 법의학적 개인식별을 목적으로 하는 STR 마커를 이용한 유전자형 분석에서 null allele 등의 대립유전자 소실로 개인식별 결과가 불일치하거나 유전자 자료 은행의 결과와 13 STR 마커들 중 오직 한 유전자자리에서 결과가 일치하지 않을 경우에는, 서로 다른 시발체 서열을 사용하는 두 제조사의 키트를 사용하는 것이 시간이 많이 소요되고 고비용의 단점이 있더라도 중복 실험의 의의가 있으며, 사용된 키트나 방법을 유전자 자료은행 데이터 베이스에 입력할 때 반드시 표기하는 것이 필요하고, 염기서열 분석을 통한 시발체 인접 부위의 돌연변이를 확인하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2011도 나사렛대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

REFERENCES

- Amorin A, Alves C, Pereira L, Gusmao L. Progress in forensic genetics: Genotyping inconsistencies and null alleles using AmpFISTR[®] Identifiler[®] and PowerPlex[®] 16 kits (Doutremepuich C, Morling N, Eds). 2004. Vol 10, pp. 176-178. *Experta Medica*, Elsevier. Amsterdam, Nederland.
- Boutrand L, Egyed B, Furedi S, Mommers N, Mertens G, Vandenberghe A. Variations in primer sequences are the origin of allele drop-out at loci D13S317 and CD4. *Int J Legal Med*. 2001. 114: 295-297.
- Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, US Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans and Trinidadians. *J Forensic Sci*. 1999. 44: 1277-1286.
- Budowle B, Masibay A, Anderson SJ, Barna C, Biega L, Brenneke S, Brown BL, Cramer J, DeGroot GA, Douglas D, Duceman B, Eastman A, Giles R, Hamill J, Haase DJ, Janssen DW, Kupferschmid TD, Lawton T, Lemire C, Llewellyn B, Moretti T, Neves J, Palaski C, Schueler S, Sgueglia J, Sprecher C, Tomsey C, Yet D. STR primer concordance study. *Forensic Sci Int*. 2001. 124: 47-54.
- Clayton T, Hill S, Denton L, Watson S, Urquhart A. Primer binding site mutation affecting the typing of STR loci contained within the AmpFISTR[®] SGM[™] Plus kit. *Forensic Sci Int*. 2004. 139: 255-259.
- Delamoye M, Duverneuil C, Riva K, Leterreux M, Taieb S, De Mazancourt P. False homozygosities at various loci revealed by discrepancies between commercial kits: implications for genetic databases. *Forensic Sci Int*. 2004. 143: 47-52.
- Eom YB. Evaluation of DNA Extraction Methods from Low Copy Number (LCN) DNA Samples for Forensic DNA Typing. *J Exp Biomed Sci*. 2009. 15: 229-232.
- Eom YB. Forensic STR analysis of mixed chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Biomed Sci*. 2010. 16: 193-196.
- Han GR, Song ES, Hwang JJ. Non-amplification of an allele of the D8S1179 locus due to a point mutation. *Int J Legal Med*. 2001. 115: 45-47.
- Heinrich M, Muller M, Rand S, Brinkmann B, Hohoff C. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *Int J Legal Med*. 2004. 118: 361-363.
- Kline MC, Jenkins B, Rodgers S. Non-amplification of a vWA allele. *J Forensic Sci*. 1998. 43: 250.
- Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acid Res*. 1990. 18: 999-1005.
- Leibelt C, Budowle B, Collins P, Daoudi Y, Moretti T, Nunn G, Reeder D, Roby R. Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. *Forensic Sci Int*. 2003. 133: 220-227.
- Masibay A, Mozer TJ, Sprecher C. Promega Corporation reveals primer sequences in its testing kits. *J Forensic Sci*. 2000. 45: 1360-1362.
- Nelson MS, Levedakou EN, Matthews JR, Early BE, Freeman DA, Kuhn CA, Sprecher CJ, Amin AS, McElfresh KC, Schumm JW. Detection of a primer-binding site polymorphism for the STR locus D16S539 using the Powerplex 1.1 system and validation of a degenerate primer to correct for the polymorphism. *J Forensic Sci*. 2002. 47: 345-349.
- Oberacher H, Pitterl F, Huber G, Niederstatter H, Steinlechner M, Parson W. Increased forensic efficiency of DNA fingerprints through simultaneous resolution of length and nucleotide variability by high-performance mass spectrometry. *Hum Mutat*. 2008. 29: 427-432.
- Roberson JM, Walsh-Weller J. *Forensic DNA Profiling Protocols:*

An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions (Thomson J, Eds). 1998. pp. 121-154. Humana. Totowa, USA.

Rubocki RJ, Duffy KJ, Shepard KL, McCue BJ, Shepherd SJ, Wisecarver JL. Loss of heterozygosity detected in a short

tandem repeat (STR) locus commonly used for human DNA identification. *J Forensic Sci.* 2000. 45: 1087-1089.

Schlenk J, Seidl S, Braunschweiger G, Betz P, Lederer T. Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing. *Int J Legal Med.* 2004. 118: 55-61.
