Komercijalni STR sustavi: vrijednost i doprinos u forenzičnoj DNA analizi

Urlić, Marta

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:333405

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

MARTA URLIĆ

KOMERCIJALNI STR SUSTAVI: VRIJEDNOST I DOPRINOS U FORENZIČNOJ DNA ANALIZI

Završni rad

Split, 2019. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

MARTA URLIĆ

KOMERCIJALNI STR SUSTAVI: VRIJEDNOST I DOPRINOS U FORENZIČNOJ DNA ANALIZI

COMMERCIAL STR KITS: VALUE AND CONTRIBUTION IN A FORENSIC DNA ANALYSIS

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, 2019. godina

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 MOLEKULA **DNA** **1**
1.2.1. PRIKUPLJANJE I DOSTAVA UZORAKA 2
1.2.2. IZOLACIJA DNA 2
1.2.3. ODREĐIVANJE KVALITETE I KOLIČINE DNA 3
1.2.4. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM 4
1.3. VARIJABILNOST DNA **5**
1.3.1.KRATKI PONAVLJAJUĆI SLJEDOVI 5

2 CILJ RADA 8

3 MATERIJALI I METODE 9

3.1 MULTIPLEKSNI STR-SUSTAVI **9**
3.2 AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR AMPLIFICATION KIT **10**
3.2.1 OPIS I SVRHA 10
3.2.2. SADRŽAJ KITA I POHRANA 11
3.2.3. IZVOĐENJE PCR REAKCIJE 12
3.2.4. RAZDVAJANJE UMNOŽENIH PRODUKATA 13
3.2.5. ANALIZA PODATAKA 13
3.3 AMPF*l*STR® Identifiler® PLUS KIT **14**
3.3.1. OPIS I SVRHA 14
3.3.2. MULTIPLEKS ANALIZA 16
3.3.3. SADRŽAJ KITA I POHRANA 17
3.3.4. EKSPERIMENTI 17
3.4 AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR AMPLIFICATION KIT **21**
3.4.1. OPIS I SVRHA 21
3.4.2.MULTIPLEKS ANALIZA 22
3.4.3. SADRŽAJ KITA I POHRANA 23
3.4.3. EKSPERIMENTI 23
3.5 *PowerPlex*® 16 SYSTEM **24**
3.5.1. OPIS 24
3.5.2. SADRŽAJ KITA I POHRANA 25

3.5.3. PREDNOSTI KORIŠTENJA LOKUSA KOJE PRUŽA **PowerPlex** ®16 SYSTEM 26
3.6 Yfiler™ PLUS PCR AMPLIFICATION KIT 27
3.6.1. OPIS I SVRHA 27
3.6.3. EKSPERIMENTI 30

4 REZULTATI 32

4.1. AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR AMPLIFICATION KIT 32
4.2. AmpF*l*STR® Identifiler® PLUS KIT 33
4.3. AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR AMPLIFICATION KIT 34
4. 4. *PowerPlex*® 16 SYSTEM 35
4. 5. Yfiler™ PLUS PCR AMPLIFICATION KIT 36

5 RASPRAVA 37

6 ZAKLJUČCI 39

7 LITERATURA 40

8 SAŽETCI 41

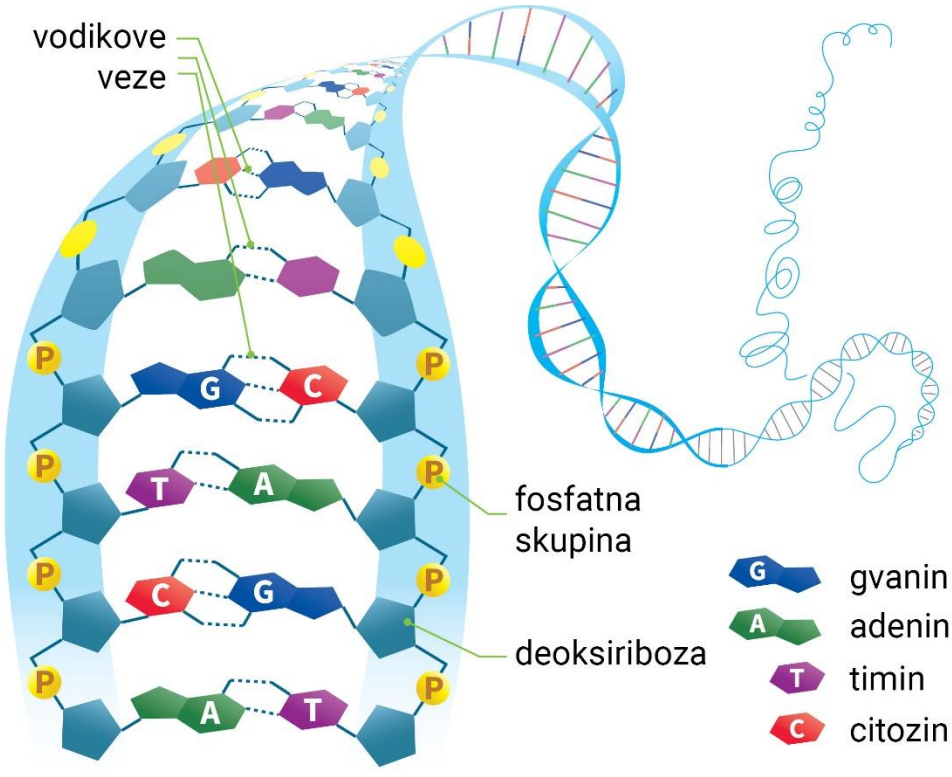
8.1 SAŽETAK 41
8.2 ABSTRACT 42

9 ŽIVOTOPIS 43

1 UVOD

1.1 Molekula DNA

Deoksiribonukleinska kiselina, (*engl. deoxyribonucleic acid, DNA*) osnovni je genetički materijal. Građena je od dva polinukleotidna lanca međusobno povezana vodikovim vezama (slika 1-1). Svaki nukleotid sastavljen je od triju podjedinica: šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i nukleotidnih baza koje sadržavaju dušik, a to su: purini - adenin(A) i gvanin (G) te pirimidini - citozin (C) i timin (T). U dvostrukoj uzvojnici DNA adenin se uvijek spaja dvostrukom vodikovom vezom s timinom (A-T), a citozin trostrukom vodikovom vezom s gvaninom (C-G). Ljudski genom sadržava oko 3 x 10^9 nukleotidnih jedinica (1).



Slika 1.1. Prikaz dvostruke spiralne uzvojnice molekule DNA (2).

1.2 Analiza DNA

Analiza DNA danas nedvojbeno ima veliku ulogu u forenzičnim znanostima. Tehnike analize DNA i rezultati koji se na njoj temelje opće su prihvaćeni u pravnim sustavima diljem svijeta. Proces analize može se podijeliti u nekoliko osnovnih, međusobno povezanih, koraka: prikupljanje i pohrana uzoraka, izolacija DNA molekule, kvantificiranje DNA, umnažanje DNA te detekcija i interpretacija rezultata (1).

1.2.1. Prikupljanje i dostava uzoraka

Uzorak za analizu DNA može biti bilo koji biološki materijal, koji sadrži staničnu jezgru: krv, urin, slina, feces, dlake, sjemena tekućina, kosti ili zubi. Osim u biološkim uzorcima, DNA se može naći i na nekim materijalnim predmetima, kao što su odjeća, obuća, alati, oružje, čaše itd. Zahvaljujući razvoju modernih metoda moguće je analizirati uzorke koji sadržavaju minimalne količine DNA ili čak degradiranu DNA molekulu. Prikupljanje uzoraka i njihova dostava u laboratorij ključan je dio cjelokupne analize jer je molekula DNA osjetljiva i podložna promjenama zbog temperature, vlažnosti, svijetla i raznih drugih čimbenika koji će utjecati na njenu daljnju obradu (1,3).

1.2.2. Izolacija DNA

Unutar stanice, molekula DNA se ne nalazi u čistom obliku, nego je udružena s brojnim molekulama kao što su proteini ili masti koje je potrebno ukloniti jer se kemijske reakcije kao što je amplifikacija DNA ne mogu zbivati u prisutnosti tih molekula. Izdvajanje DNA može se napraviti uz pomoć nekoliko metoda:

a) Izdvajanje DNA organskim otapalima

Ovom metodom uklanjaju se proteini i druge molekule pa tako izdvojena DNA ostaje sačuvana čista i u velikoj koncentraciji. U prvoj fazi postupka, ovisno o količini uzorka, doda se određena količina digestivnog pufera, koji čine kemikalije poput trishidroksimetilaminometana (TRIS), natrijevog klorida (NaCl), natrij-dodecil-sulfata (SDS) i etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) čija je uloga stvoriti uvjete u kojima će kasnije dodana proteinaza K moći obaviti svoju funkciju cijepanja proteina. Do »čiste DNA« se dolazi najprije centrifugiranjem pa otopinom fenol-kloroforma. Zatim slijedi precipitacija, odnosno taloženje, DNA koje se temelji na izmjeničnom

ispiranju apsolutnim i 70%-tnim alkoholom. Uzorak se potom filtrira upotrebom $Centrikon^{®}$ epruveta s mikrofilterima, u kojima se nastala smjesa ispire kroz ultramembranu čiji je promjer pora takav da na sebi zadržava molekule DNA. Nakon toga DNA se ispire i sakuplja u tubicu. Ova metoda je pogodna za izolaciju male količine DNA i skuplja je od prve te se rjeđe i koristi.

b) Izdvajanje DNA »$\mathrm{Chelex}^{®}$ 100« metodom

Izdvajanje DNA u prisutnosti tvorničkog pripravka nazvanog $\mathrm{Chelex}^{®}$ 100 još je jedna metoda izolacije DNA, pogodna za uzorke u kojima se očekuje mala količina DNA. Nakon zagrijavanja pripravak se veže za ione (poput Mg^{2+}), koji se nalaze u stanici, a DNA se oslobađa. Nadalje, sve molekule vezane za $Chelex^{®}$ 100 se uklone te ostaje čista DNA koja se onda umnaža lančanom reakcijom polimerazom (PCR).

c) Izdvajanje DNA »Qiagen« metodom

Princip ove metode zasniva se na uporabi kemikalija u sastavu Qiagen kompleta i odnosi se na digestiju korištenjem proteinaze K, prenošenje uzorka na tzv. silika-membranu, pročišćavanje i ispiranje molekule DNA u posebnim tubicama. Uz set kemikalija, u Qiagen kompletu dobiju se i postupnici optimizirani za velik broj različitih uzoraka (npr. puna krv, krvne, mrlje, dlake, kosti itd.) (1).

1.2.3. Određivanje kvalitete i količine DNA

Izolacijom se dobije količina DNA koja bi kvalitativno i kvantitativno trebala osigurati dobivanje potpunog DNA profila. Zato je iznimno važno metodama kvantifikacije odrediti stvarnu količinu DNA u uzorku te provjeriti prisutnost nečistoća koje mogu inhibirati PCR reakciju. Neke od metoda koje se koriste za kvantifikaciju su: spektrofotometrijsko određivanje količine DNA, »Yield« gel metoda, utvrđivanje DNA uz pomoć posebno napravljenih sondi koje se vežu za ljudsku DNA te dvije najkorištenije: PCR-reakcija u realnom vremenu te hibridizacijska (*slot-blot*) metoda.

Hibridizacijskom metodom se mogu utvrditi vrlo male količine DNA molekule u nekom uzorku. Metoda se bazira na hibridizaciji sonde koja sadrži ulomke humane DNA sa DNA izoliranom iz uzorka. Najkorišteniji komercijalni komplet za DNA hibridizaciju je *QuantiBlot Human DNA*

Quantification Kit (Applied Biosystem) koji koristi sekvenciju sa 17. ljudskog kromosoma kao DNA sondu.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu *(engl. Quantitative Real-Time PCR,* QRT-PCR) zasniva se na detekciji i kvantifikaciji fluorescentno obilježene reporterske molekule, čiji signal raste s povećanjem broja kopija produkta u reakcijskoj smjesi. Trenutačno najkorišteniji komercijalni kompleti primjenjivani za ovu metodu su: $Quantifiler^{TM}$ *Human DNA Identification Kit,* koji služi za kvantifikaciju neovisnoj o spolu i $Quantifiler^{TM}$ *Y Male Human DNA Identification Kit* koji kvantificira isključivo DNA muške osobe, oba proizvođača *Applied Biosystems* (1)

1.2.4. Lančana reakcija polimerazom

Lančanu reakciju polimerazom (PCR) prvi put je 1985.godine opisao Kary Mullis sa suradnicima, kao tehniku *in vitro* umnažanja ulomaka DNA, uz katalitičko djelovanje enzima DNA- polimeraze izdvojene iz bakterije *E. coli.* Nešto kasnije, isti je tim suradnika zamijenio navedenu polimerazu sa termostabilnom DNA-polimerazom izdvojenom iz bakterije *Thermus aquaticus* (*Taq*). Ova metoda je izazvala revoluciju na područjima molekularne genetike i biologije jer je omogućila eksponencijalno umnažanje DNA te se i danas koristi se kao jedna od temeljnih metoda u forenzičnoj analizi, ali i u kliničkoj molekularnoj dijagnostici različitih bolesti (infektivne bolesti, monogenske bolesti, tumori, itd.) (1,4).

Sastavnice potrebne za uspješno odvijanje lančane reakcije polimerazom su: kalupna DNA iz uzorka, set DNA početnica (primera), slobodni deoksriboinukleotidi, stabilna Taq polimeraza te pufer koji sadrži ione magnezija.

Jedna od osnovnih karakteristika PCR je brza i precizna izmjena temperature u sva tri njena koraka: denaturacija, hibridizacija (engl. *annealing*) te sinteza (ekstenzija, elongacija). Ova tri koraka čine samo jedan ciklus u PCR reakciji koji se, u cilju dobivanja željene količine fragmenata DNA, ponavlja 20 do 40 puta.

Denaturacija molekule DNA odvija se pri temperaturi od 94℃ do 96℃, što uzrokuje pucanje vodikovih veza izmedu komplementarnih baza te razdvajanje polinukleotidnih lanaca. Zatim slijedi snižavanje temperature na 55-65℃ pri čemu se fluorescentno obilježene DNA početnice po principu komplementarnosti vežu sa svojim 5’ krajem na 3’ kraj već razdvojenih lanaca i tako

postavljaju početnu sekvencu nužnu za rad DNA polimeraze. Ponovnim zagrijavanjem reakcijske smjese na 72℃ osigurava se maksimalna aktivnost Taq polimeraze. Enzim koristi slobodne nukleotide i sintetizira nove lance molekule DNA. Ciklusi se nadalje ponavljaju dok se ne dobije dovoljna količina ulomaka DNA (25-35 ciklusa), a konačni produkt je spreman za analizu (5).

1.3. Varijabilnost molekule DNA

Analiza DNA u sudskoj medicini zasniva se na spoznaji da se samo 0,5% molekule DNA razlikuje kod svake osobe. Upravo taj mali dio molekule sadržava veliki broj tzv. *polimorfizama* (grč. *poly* – mnogo; *morphe* – oblik), odnosno razlika u sekvenci DNA između pojedinih osoba. S obzirom da većina gena nije tolerantna spram mutacija, u lokusima koji kodiraju proteine uglavnom postoji samo jedan oblik gena. Oni geni koji podnose mutacije imaju više od jednog oblika tj. imaju alelomorfne gene ili alele. Postoji nekoliko oblika polimorfizama, jedan od kojih su promjene u duljini DNA između dvaju homolognih segmenata, koji se nazivaju mikrosatelitna ponavljanja (1).

1.3.1.Kratki ponavljajući sljedovi

STR (eng. *short tandem repeats*) su sljedovi duljine 2-7 (prema nekim izvorima od 1 do 10) baznih parova koji se na definiranom lokusu ponavljaju određeni broj puta. Broj ponavljanja se razlikuje od osobe do osobe, ali moguće je da dvije osobe imaju jednake alelne varijante na nekom STR-lokusu pa čak i da se poklapaju na dva ili tri STR-lokusa. Jasno definiranje kratkih ponavljajućih sekvenci kao molekularnih polimorfizama uvjetovano je masovnom primjenom STR-biljega u forenzičnoj genetici. Najčešće uključivani u analize individualne i populacijske raznolikosti su oni STR-biljezi čije se sekvence sastoje od 4 baze tj. tetranukleotidni STR-lokusi, no svoju praktičnu primjenu pronašli su i pojedini trinukleotidni i pentanukleotidni sustavi. Komercijalni multipleksni sustavi često pružaju mogućnost analize tetra- i penta- lokusa i na taj način daju rezultate s visokom razinom indeksa isključivanja.

Poželjne osobine pojedinog STR lokusa su:

1. izražena učestalost heterozigotnosti
2. jasno definirani ponavljajući nizovi

3. jasno određene alelne varijante
4. jednostavno i pouzdano umnažanje

Postoji više tipova STR lokusa:

1. strukturno jednostavni – jedan tip ponavljajućeg niza
2. strukturno jednostavni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti
3. strukturno složeni – dva ili više tipova ponavljajućeg niza
4. strukturno složeni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti
5. kompleksni – više ponavljajućih nizova s prisutnim insercijskim DNA sekvencijama
6. hipervarijabilni

U listopadu 1993. godine DNA komisija ISHF-a (Interantional Society of Forensic Haemogenetics) je preporučila nomenklaturu STR-lokusa i alenih varijanti koja je u upotrebi i danas. Naziv STR-lokusa sadrži broj kromosoma na kojem je pronađen, tako npr. D21S11 znači da je riječ o DNA-sekvenci (**D**) smještenoj na 21. kromosomu (21), koja predstavlja slijed prisutan u jednoj kopiji na samo jednom mjestu u genomu (**S**) i to je 11. otkriveni i kategorizirani biljeg na 21. kromosomu (11). Ako se slijed pojavljuje na više mjesta, umjesto slova S koristi se slovo Z (1).

Većina sustava koji se primjenjuju u forenzičnim ispitivanjima imaju ponavljanja duljine 4pb (tetranukleotidi) ili 5pb (pentanukleotidi) koja se, ovisno o lokusu, pojavljuju od 5 do približno 50 puta. Velika prednost ovih sustava jest da je pojavljivanje tzv. *stutter*-ulomaka vrlo rijetka. Pojam *stutte*r odnosi se na pojavljivanje DNA-ulomaka koji su za jedan ponavljajući slijed kraći od očekivane vrpce. Ovaj problem javlja se posebice pri analizi miješanih tragova kada se treba utvrditi jeli ulomak koji se pojavljuje *stutter* ili možda pripada nekom drugom izvoru. *Stutter* se pojavljuje relativno često kod tetranukleotidnih ponavljajućih sekvencija dok je prema rezultatima sustava koji omogućuju analizu pentanukleotidnih ponavljanja (npr. *PowerPlex* 16) njihova pojava znatno rjeđa. U SAD-u je izabrano 13 STR lokusa za nacionalnu bazu podataka o osuđivanim prijestupnicima i ta se baza podataka naziva Kombiniranim DNA indeksnim sustavom (engl. *Combined DNA Indexing System* – CODIS). Prednosti novih STR-sustava su mnogobrojne, prva od njih jest ta da se više lokusa amplificira istodobno (multipleksne reakcije). Druga je mogućnost izravne detekcije ovih sustava za testiranje bez uoptrebe sondi. Jedna početnica svakog para fluorescentno je obilježena pa je moguće razlikovati PCR-multiplekse prema razljičitim valnim

duljinama svijetlosti. Danas su dostupni industrijski proizvedeni kompleti reagensa koji se primjenjuju u različitim automatiziranim sustavima za detekciju.

2 CILJ RADA

Prikazati karakteristike dostupnih komercijalnih STR kitova, usporediti njihovu vrijednost i značajnost u primjeni za komercijalne svrhe.

3 Materijali i metode

3.1 Multipleksni STR-sustavi

Najčešći STR-sustavi danas dostupni za primjenu u rutinskom forenzičnom radu uključuju: PowerPlex® 16 System (Promega, Madison, VI, SAD), AmpFLSTR Profiler Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), AmpFLSTR Profiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), AmpFLSTR Cofiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), AmpFLSTR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), AmpFLSTR SGM Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Osim navedenih postoje i brojni drugi STR-sustavi koji se upotrebljavaju u svakodnevnom radu, a u nastavku ćemo se osvrnuti na njih pet (1).

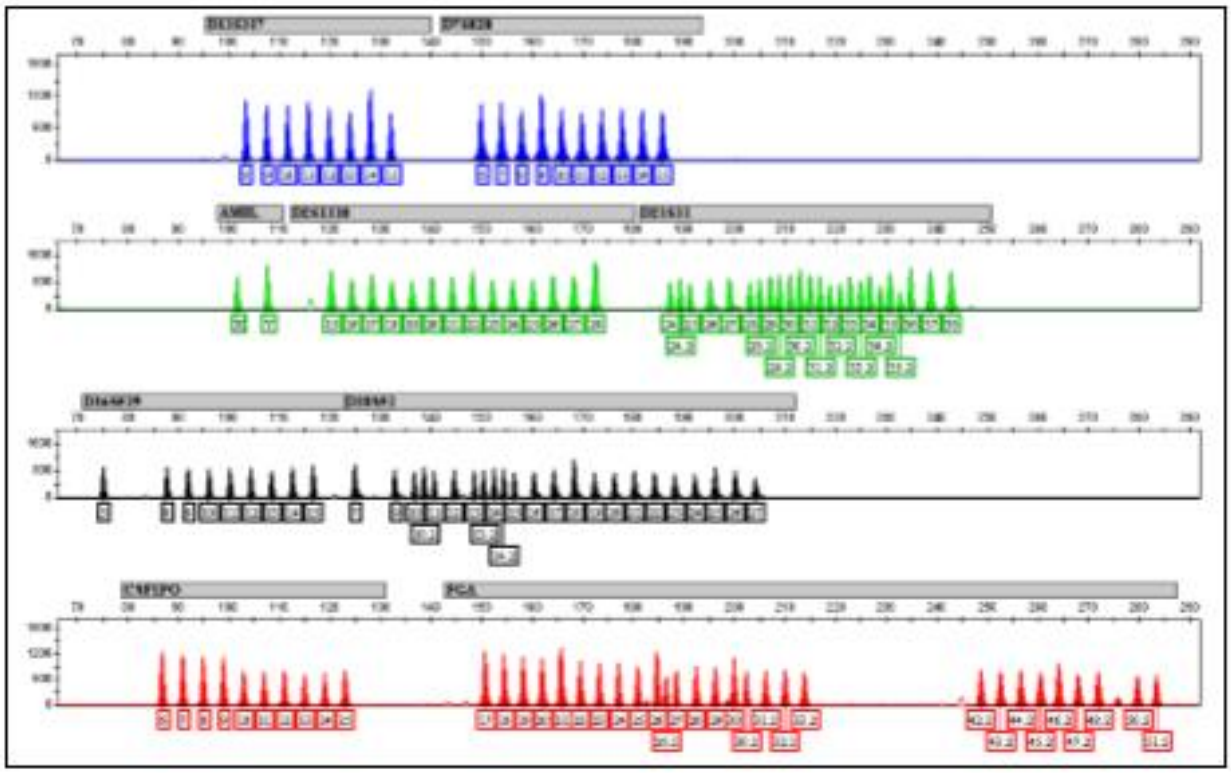
3.2 AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit

3.2.1 Opis i svrha

AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit jest multipleks STR-sustav koji je optimiziran za genotipiziranje degradirane DNA molekule. U jednoj PCR reakciji koristi osam STR.lokusa i jedan spol-determinirajući marker – Amelogenin. Raspon lokusa varira između 70 i 283 nukleotida uz prisustvo ne-nukleotidnih povezivača kako bi se postigla odgovarajuća udaljenost između lokusa. Kombinacijom sustava 5 flourescentnih boja i inkluzije ne-nukleotidnih povezivača omogućena je istovremena amplifikacija i separacija osam STR-lokusa i Amelogenina tijekom DNA analize. Lokusi korišteni u ovom komercijalnom kitu, njihova kromosomska lokacija te ljestvica alela koja se koristi za genotipiziranje dobivenih rezultata prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR amplifikacijski kit lokusa i alela (6)

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 007
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	6-FAM™	11
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		7, 12
Amelogenin	X:p22.1-22.3 Y:p11.2	X, Y	VIC®	X, Y
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	NED™	9, 10
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	PET®	11, 12
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24, 26



Slika 3.1. AmpF*l*STR® MiniFiler™ ljestvica alela (6).

3.2.2. Sadržaj kita i pohrana

MiniFiler™ Kit sadrži dovoljnu količinu sljedećih reagensa koji su potrebni za 100 reakcija, koristeći 25µL/reakciji :

- Master Mix – sadrži enzime, soli, dNTP, proteine nosače i 0.05 % natrijev azid

čuva se na vrlo niskim temperaturama od -15 do -25 °C, a nakon prve upotrebe na 2 do 8 °C

- Kontrolna DNA – sadrži 0.10 ng/µL humane genomske DNA muške osobe unutar natrijevog azida i pufera
- Set početnica (primera) – sastoji se od primera, koji omogućavaju amplificiranje ljudske DNA u oba smjera
- Ljestvica alela – sadrži već amplificirane alele (6)

Također, za MiniFiler ™ Kit postoji panel standarda potreban za PCR amplifikaciju, procjenu PCR produkta te genotipiziranje, a to su:

- **Kontrolna DNA 007** – pozitivna kontrola za evaluaciju učinkovitosti seta
- **GeneScan™ 500 LIZ® ili GeneScan™ 600 LIZ® standard veličine** – donose precizne rezultate mjerenja za *MiniFiler™*
- **Ljestvica alela –** konstruirana je za točnu karakterizaciju alela koji se amplificiraju u kitu te ju je za potrebe genotipiziranja nužno provesti pod istim uvjetima zajedno s ostalim nepoznatim uzorcima

Važno je naglasiti da su fluorescentne boje koje se nalaze na DNA početnici posebno osjetljive na svijetlost te je potrebno zaštiti set početnica, amplificiranu DNA, ljestvicu alela te standard veličine od svijetla kada nisu u upotrebi (6)

3.2.3. Izvođenje PCR reakcije

Prije izvođenja same PCR reakcije potrebno je pripremiti amplifikacijske reakcije i to se radi u nekoliko koraka:

1. Izračunati volumene svake komponente potrebne za pripremu reakcija
2. Pripremiti reagense, tako da se najprije otopi reakcijska smjesa za PCR i set primera, zatim se svi dostupni reagensi vorteksiraju, uključujući enzim te se sve kratko centrifugira prije otvaranja bočica
3. Pripremi se reakcijska smjesa
4. Vorteksira se reakcijska smjesa te se kratko centrifugira
5. Otpipetira se 15µL reakcijske smjese u reakcijske jažice ili tubice
6. Priprema DNA uzorka radi se uz pomoć TE pufera koji sadrži jako malo količinu EDTA, a potrebno je pripremiti:
    - Uzorak DNA koji analiziramo
    - Negativnu kontrolu
    - Pozitivnu kontrolu
7. Zatvoriti jažice ili tubice
8. Centrifugurati tubice na 3000 rpm, približno 20 sekundi

9. Amplificirati uzorke u termocycleru (npr. GeneAmp PCR sustavu 9700 ili Veriti 96-Well Thermal Cycler)

Završni reakcijski volumen smjese iznosi 25µL. Slijedi sama PCR reakcija u kojoj se umnaža ciljna DNA molekula. Po završetku reakcije, dobivene uzorke potrebno je pohraniti i zaštititi od svjetla (6).

3.2.4. Razdvajanje umnoženih produkata

Kapilarna elektroforeza se izvodi u svrhu razdvajanja dobivenih PCR produkata odnosno njihove analize. Instrumenti za izvođenje kapilarne elektroforeze su brojni, a neki od njih koji odgovaraju MiniFiler Kitu su Applied Biosystems 3100/3100-Avant te Applied Biosystems 3500/3500xL (6).

3.2.5. Analiza podataka

Analiza dobivenih rezultata može se vršiti uz pomoć različitih računalnih programa. Jedan od njih je GeneMapper ID Software, koji služi za automatsko genotipiziranje u forenzičke svrhe. Nakon postupka elektroforeze, softver koji prikuplja podatke pohranjuje informacije o svakom pojedinom uzorku u .fsa formatu. Koristeći GeneMapper ID Software se zatim mogu analizirati i interpretirati podaci iz tih datoteka (6).

3.3 AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit

3.3.1. Opis i svrha

AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit je STR multipleksni sustav, koji amplificira 15 tetranukleotidnih ponavljajućih lokusa i spolno-determinirajući biljeg Amelogenin u samo jednoj PCR reakciji:

- Svih trinaest lokusa sadržanih u CODIS lokusima se nalaze u ovom kitu
- Dva su dodatna lokusa uključeni: D2S1338 i D19S433. Ovi lokusi se nalaze i u AmpFlSTR SGM Plus Kitu
- Kombinacija ovih 15 lokusa je u skladu s nekoliko globalnih preporuka

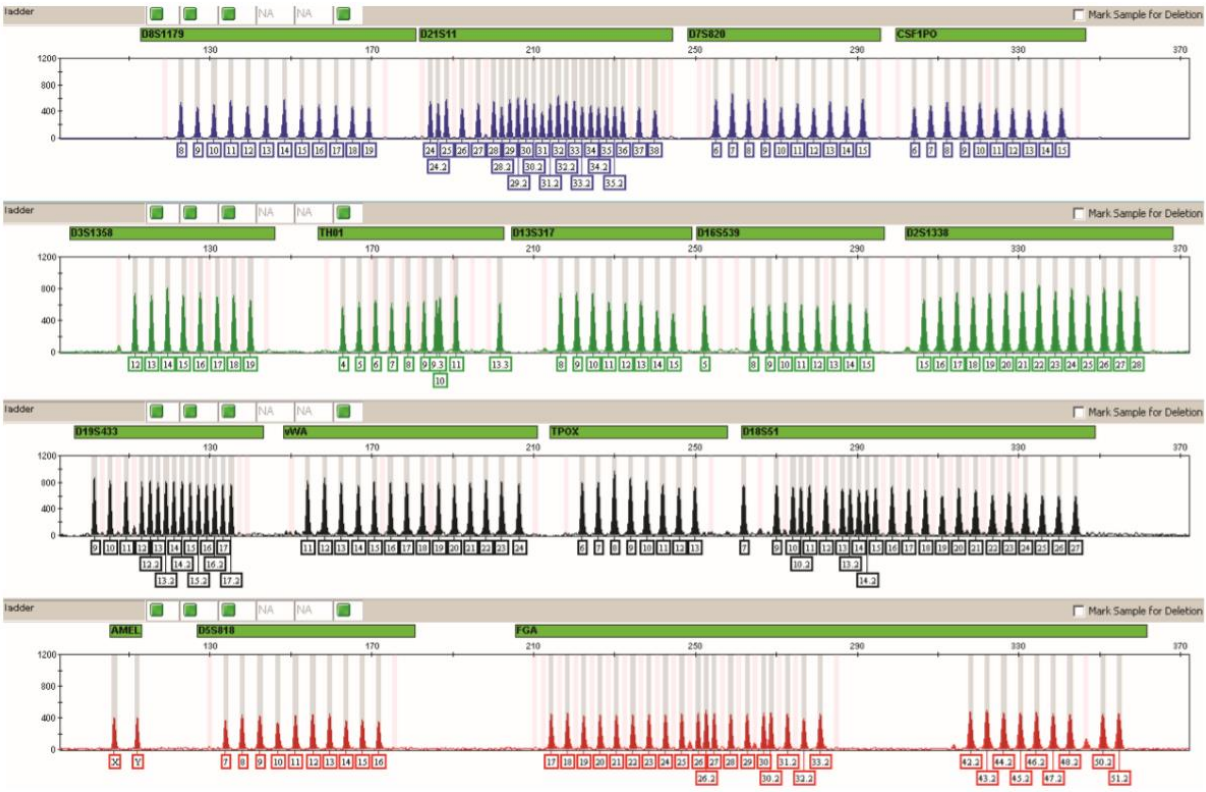
AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit predstavlja multipleks sustav sa 16 lokusa jednake snage razlučivanja kao, ali bolje osjetiljivosti te daje bolju robusnost od prijašnje generacije AmpF*l*STR® Identifiler® Kit-a. Ovaj komercijalni kit koristi modificirane PCR uvjete za pojačavanje osjetljivosti, novu formulu pufera za poboljšanje učinkovitosti kod inhibiranih uzoraka te poboljšani proces za sintezu DNA i tehnike pročišćavanja primera, na način da minimizira prisustvo bojom označenih artefakata i tako dovodi do stvaranja jasnije elektroforetske pozadine.

Ne-nukleotidni povezivači zajedno sa sustavom 5 fluorescentnih boja, smješteni između primera i fluorescentne boje, omogućuju istovremeno umnažanje i uspješno razdvajanje svih 16 lokusa tijekom DNA analize.

Lokusi koji se amplificiraju u setu, njihove lokacije na kromosomima te odgovarajući fluorescentni obilježivač prikazani su u sljedećoj tablici (7):

Tablica 2. AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit lokusi i aleli (7)

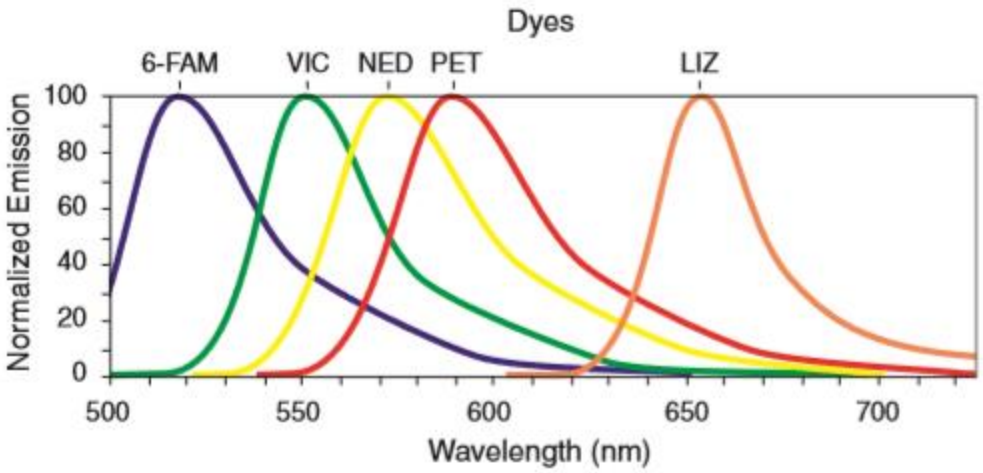
Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Identifiler® Plus Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13‡
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30§
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11#
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15
vWA	12p12-pter	11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8‡‡
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	PET®	X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11§§
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24



Slika 3.2. AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit ljestvica alela (7).

3.3.2. Multipleks analiza

Tehnologija višestrukog fluorescentnog bojenja omogućila je analizu većeg broja lokusa, uključujući i one lokuse koji sadrže preklapajuće alele. Njihovo razlikovanje omogućeno je korištenjem lokus-specifičnih početnica označenim drugim bojama. AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit koristi 5 različitih fluorescentnih boja od kojih svaka emitira svoj maksimum fluorescencije na različitoj valnoj duljini (iako postoje preklapanja boja u emisijskom spektru), a to su: 6-$FAM^{™}$ koja emitira svijetlost pri najmanjoj valnoj duljini i prikazuje se kao plava, nakon nje slijedi $VIC^{®}$ kao zelena te $NED^{™}$ kao žuta, $PET^{®}$ kao crvena, a $LIZ^{®}$ kao narančasta (7).



Slika 3.3. Emisijski spektar 5 boja koji koristi AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit (7).

3.3.3. Sadržaj kita i pohrana

AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit sadrži dovoljnu količinu materijala da bi se izvelo 50, 100, 200 ili čak 1000 amplifikacija sa samo 25µL volumena reakcijske smjese. Komponente ovog komercijalnog kita su:

- Master Mix – sadrži enzime, soli, dNTP-ove, proteine nosače i 0.04 % natrijev azid
- Kontrolna DNA – sadrži 0.10 ng/µL ženske DNA u 0.05% natrijevom azidu i puferu
- Set primera - sadrži primere za oba smjera kretanja u DNA amplifikaciji, naprijed i natrag
- Ljestvica alela – sadrži alele prisutne u setu

Proces PCR reakcije, elektroforeze te detekcije i analize dobivenih rezultata pobliže je objašnjen u poglavlju 1 (7).

3.3.4. Eksperimenti

Eksperimenti za evaluaciju učinkovitosti AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit -a provedeni su prema DAB standardima za jamstvo kvalitete (*DNA Advisory Board*) u listopadu 1998. godine. Također dodatna validacija izvedena je prema preporučenim SWGDAM smjernicama (*Scientific Working*

Group on DNA Analysis Methods). Ovi eksperimenti pokazali su se prikladnima za proizvođače komercijalnih STR kitova namijenjenih forenzičnim analizama (7).

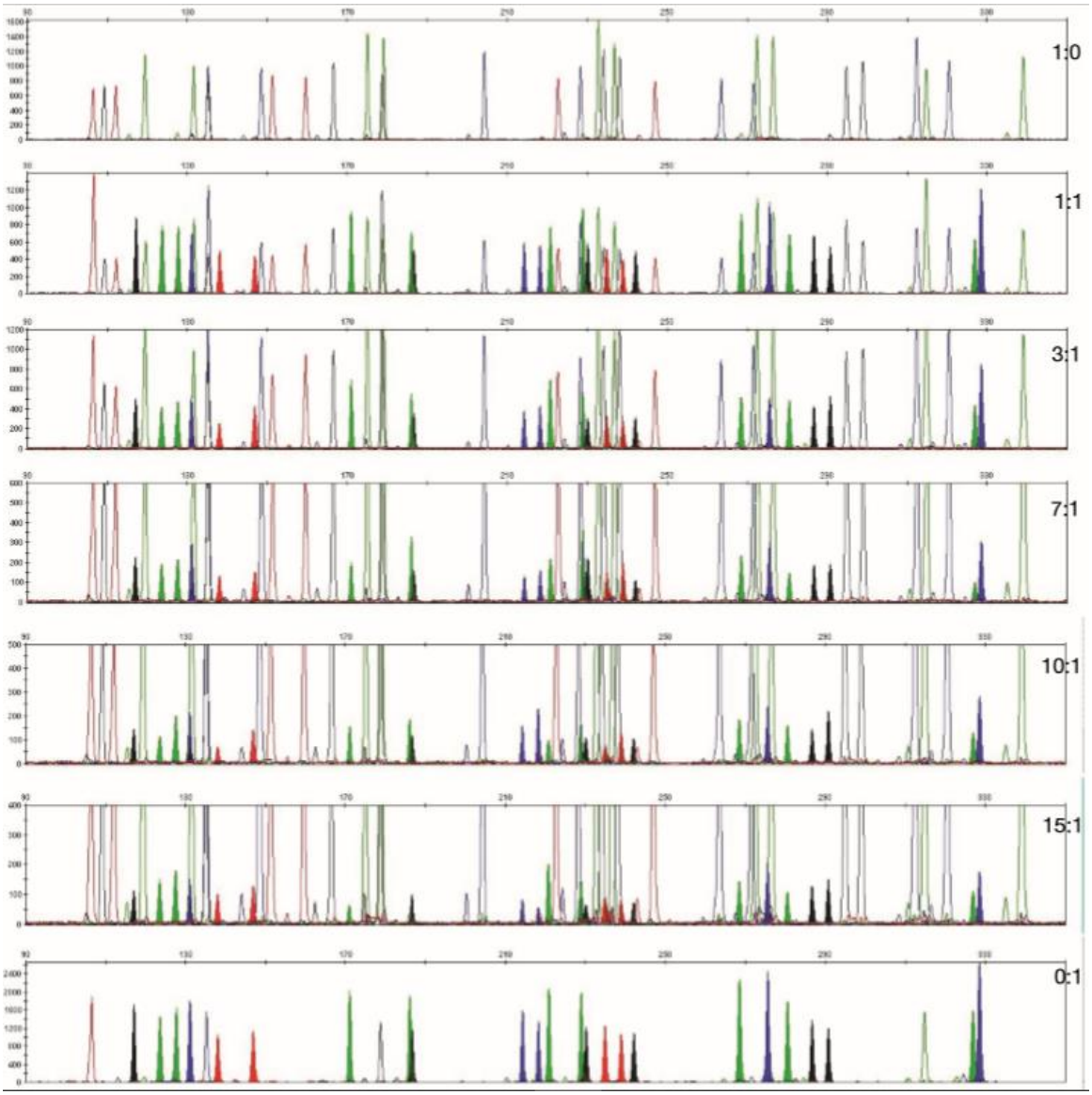
3.3.4.1. Studije mješovitih uzoraka

Dokazni uzorci kao što su biološke tekućine i/ili tkiva mogu sadržavati DNA koja potječe od više pojedinaca i takvi uzorci su sastavni dio forenzičnog rada. Stoga je od esencijalne važnosti da to sustav prepozna pri analizi. Pomiješani uzorci se mogu razlikovati od uzoraka koji potječu od samo jednog izvora prema:

- Prisustvu više od 2 alela po lokusu
- Učestalosti pojave vrška (engl. *peak*) na *stutter* poziciji, koja je veća nego kod uzoraka samo jedne osobe
- Značajna neuravnoteženost kod alela za heterozigotni genotip

Omjer visina vršaka definira se kao visina nižeg vrška podijeljena sa visinom višeg vrška, izražen u postotcima. Ako se primijeti neuobičajeno nizak omjer kod jednog lokusa, ali nema nikakvih drugih indikacija da je uzorak miješani, uzorak se može iznova amplificirati i analizirati da se dokaže je li neuravnoteženost reproducibilna. Neuravnoteženost u lokusu može biti uzrokovana degradiranom DNA, prisutnošću inhibitora, premalom količinom DNA, mutacijom kod početnica, pojavu alela koja sadrži jako rijetku sekvencu koja se ne može učinkovito amplificirati kao i ostali aleli.

Smjesa koja je sadržavala mješavinu dvije genomske DNA analizirana je u različitim omjerima (0:1, 1:1, 3:1, 7:1, 10:1, 15:1, 1:0), a ukupna količina iznosila je 1 ng. Uzorci su umnoženi u GeneAmp® PCR sustavu 9700 te analizirani kapilarnom elektroforezom i detektirani uz pomoć Applied Biosystems® 3130x/ genskog analizatora. Rezultati su prikazani na slici:



Slika 3.4. Amplificirana smjesa DNA u različitim omjerima (7).

Iz slike 3.4 razvidno je kako su aleli koji su bili prisutni u manjoj količini u omjeru i ne preklapaju se s vršcima prisutnim u većoj količini su istaknuti. Kod omjera 3:1, 7:1, 10:1 vršci alela u manjoj količini su smjesta tipizirani, dok kod omjera 15:1 rezultati su pokazali puni ili parcijalni profil za manjeg prinosnika (7).

Tablica 3. Genotip miješanih DNA uzoraka (7)

Locus	Profile Sample A	Profile Sample B
D8S1179	11, 14	10, 11
D21S11	29, 35	31.2, 32.2
D7S820	8, 10	11
CSF1PO	8, 10	12
D3S1358	14, 17	15, 16
TH01	7, 8	6, 9.3
D13S317	12, 13	9, 11
D16S539	10, 11	9, 12
D2S1338	17, 23	17, 20
D19S433	11, 17.2	13
vWA	14, 17	17, 19
TPOX	9, 10	8, 11
D18S51	15, 16	13, 14
AMEL	X, Y	X
D5S818	11, 13	8, 10
FGA	19, 25	22, 23

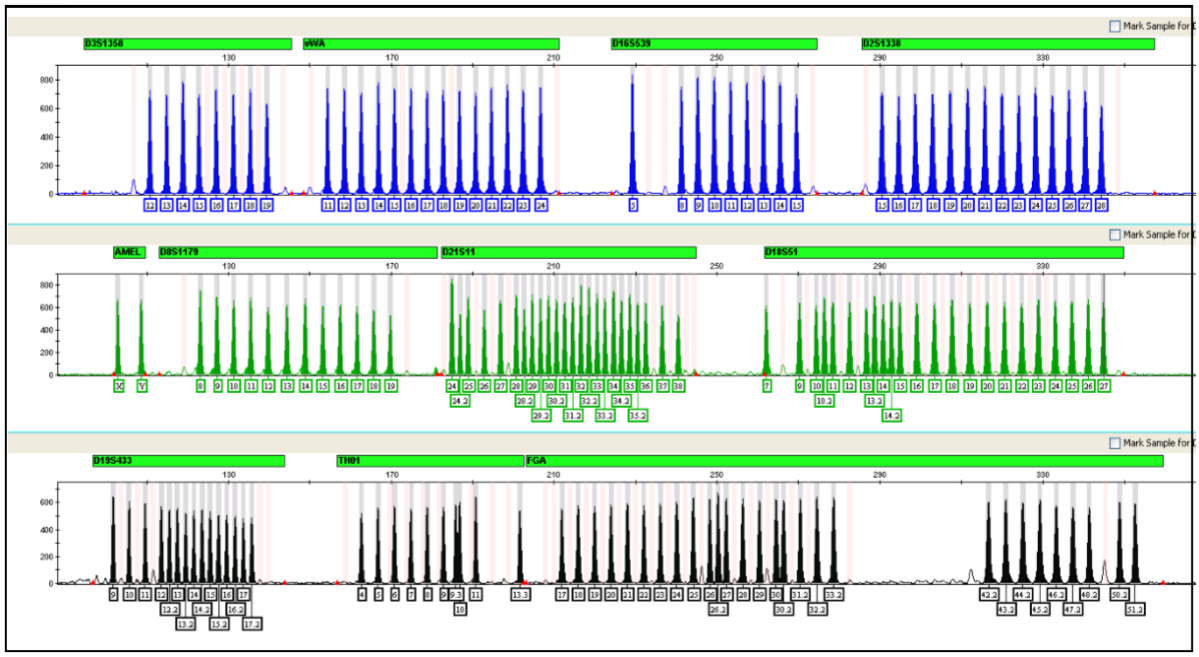
3.4 AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit

3.4.1. Opis i svrha

AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR amplifikacijski kit je multipleks sustav kratkih ponavljajućih sljedova, može umnožiti 10 tetranukleotidnih lokusa i jedan spolno-determinirajući marker Amelogenin u samo jednoj PCR amplifikaciji. Ovaj komercijalni kit donosi jednake sljedove početnica za sve lokuse kao i ostali AmpF*l*STR® kitovi, ne uključujući i prethodno opisani MiniFiler™ kit, te ne uključuje degeneriranu neoznačenu početnicu za lokus D8S1179 koji je kasnije uključen u AmpF*l*STR® kitove (8).

Tablica 4. AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit lokusi i aleli (8)

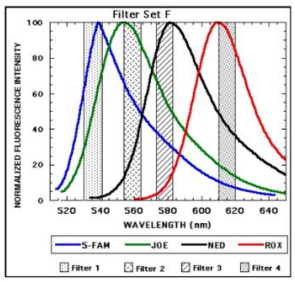
Locus designation	Chromosome location	Alleles included in AmpF*l*STR® SGM Plus® Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 007
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	5-FAM™	15, 16
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		14, 16
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		9, 10
D2S1338	2q35–37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	JOE™	X, Y
D8S1179†	8	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		12, 13
D21S11	21q11.2–q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		7, 9.3
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24, 26



Slika 3.5. AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit ljestvica alela (8).

3.4.2.Multipleks analiza

Kako bi se uspješno izvršila analiza više lokusa, uključujući i lokuse koji sadrže alele preklapajućih veličina, AmpFlSTR SGM Plus kit koristi početnice označene različitim bojama. Fluorescentne boje uključene u kit su 5-FAM™ koja emitira svijetlost na najmanjoj valnoj duljini i prikazuje se kao plava, iza nje slijedi JOE™ koja se prikazuje kao zelena, NED™ kao žuta te ROX™ kao crvena boja. Iako svaka boja emitira svijetlost na drugoj valnoj duljini, javljaju se poneka preklapanja u emisijskom spektru (8).



Slika 3.6. Emisijski spektar četiriju boja korištenih u AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (8)

3.4.3. Sadržaj kita i pohrana

AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit sadrži dovoljno materijala za 100 umnažanja, 50 µL/amplifikaciji, a njegov sadržaj čine:

- Reakcijska smjesa – sadrži $MgCl_2$, dNTP-ove, goveđi serum, albumin i 0.05% natrijev azid u puferu
- Set početnica – sadrži umnožene alele (prikazano u ljestvici alela)
- Kontrolna DNA – sadrži 0.10 ng/µL humane DNA muške osobe pohranjene u pufer
- DNA polimeraza – sadrži enzime s aktivnošću od 5 U/µL (8)

3.4.3. Eksperimenti

Koristeći AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR komercijalni kit provedena su razna istraživanja u svrhu validacije samog proizvoda i na taj način se utvrdila njegova efikasnost, pouzdanost i učinkovitost. Provedeni postupci nisu samo zadovoljili, nego su bili bolji od očekivanih smjernica navedenih u TWGDAM-u (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*) te DAB standardu kvalitete (8).

3.4.3.1. Specifičnost vrste

Kako se nerijetko u forenzičnim uzorcima može pronaći i DNA koja nije humanog podrijetla, AmpF*l*STR® SGM Plus® kit omogućava određeni stupanj specifičnosti koji se odnosi točno na primate za tu vrstu koja se testira (izuzev lokusa za amelogenin). Eksperimenti su provedeni s ciljem da bi se istražilo na koji način AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit omogućava interpretiranje rezultata dobivenih iz DNA koja nije ljudskog podrijetla:

- Primati – gorila, čimpanza i makaki majmun
- Ne-primati – hrčak, štakor, zec, mačka, pas, svinja, kokoš, krava i riba
- Bakterije i kvasci – *Legionella, Escherichia, Listeria, Neisseria, Vibrio, Citrobacter, Salmonella, Candida, Saccharomyces i Rhodotorula*

Svi amplificirani uzorci primata su proizveli fragmente unutar raspona 75-350 baznih parova i rezultati su pokazali značajan slijed homolognosti između primata i ljudske DNA za lokuse AmpF*l*STR® SGM Plus® komercijalnog kita.

Uzorci bakterije, kvasca, hrčka, štakora, zeca, mačke, kokoši i ribe nisu proizveli nikakav mjerljivi produkt, dok su uzorci psa, krave i svinja proizveli fragment veličine od 103 bp. Ovaj fragment je za 4 bazna para kraći od specifičnog produkta veličine 107 bp u primata (8).

3.5 *PowerPlex*® 16 System

3.5.1. Opis

PowerPlex ®16 System omogućava ko-amplifikaciju i detekciju čak 16 različitih lokusa (petnaest STR lokusa i Amelogenin) u tri boje, uključujući: Penta E, D18S51, D21S11, TH01 i D3S1358 lokuse čije su početnice označene fluoresceinskom bojom (FL); FGA, TPOX, D8S1179, vWA i Amelogenin čije su početnice označene tetra-metilrodaminom (TMR); Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 i D5S818 čije su početnice označene trećom bojom 6-karboksi-4'5'-dikloro-2'7'-dimetiloksi-fluorescein (JOE) (Tablica 5). Ovaj komercijalni sustav optimiziran je za rad na GeneAmp® PCR System 9700 termo bloku. PowerPlex ®16 System sadrži sve materijale potrebne za umnažanje STR regija već purificirane DNA molekule, osim AmpliTaq Gold DNA polimeraze (9).

Tablica 5. PowerPlex ®16 System lokusi i aleli (9)

STR Locus	Label	Chromosomal Location	GenBank® Locus and Locus Definition	Repeat Sequence[1] 5′→ 3′
Penta E	FL	15q	NA	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (23)
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA Complex (23)
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, human tyrosine hydroxylase gene	AATG (23)
D3S1358	FL	3p	NA	TCTA Complex
FGA	TMR	4q28	HUMFIBRA, human fibrinogen alpha chain gene	TTTC Complex (23)
TPOX	TMR	2p24-2pter	HUMTPOX, human thyroid peroxidase gene	AATG
D8S1179	TMR	8q	NA	TCTA Complex (23)
vWA	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31, human von Willebrand factor gene	TCTA Complex (23)
Amelogenin[2]	TMR	Xp22.1-22.3 and Y	HUMAMEL, human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein	NA
Penta D	JOE	21q	NA	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO, human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	NA	GATA
D7S820	JOE	7q11.21-22	NA	GATA
D13S317	JOE	13q22-q31	NA	TATC
D5S818	JOE	5q23.3-32	NA	AGAT

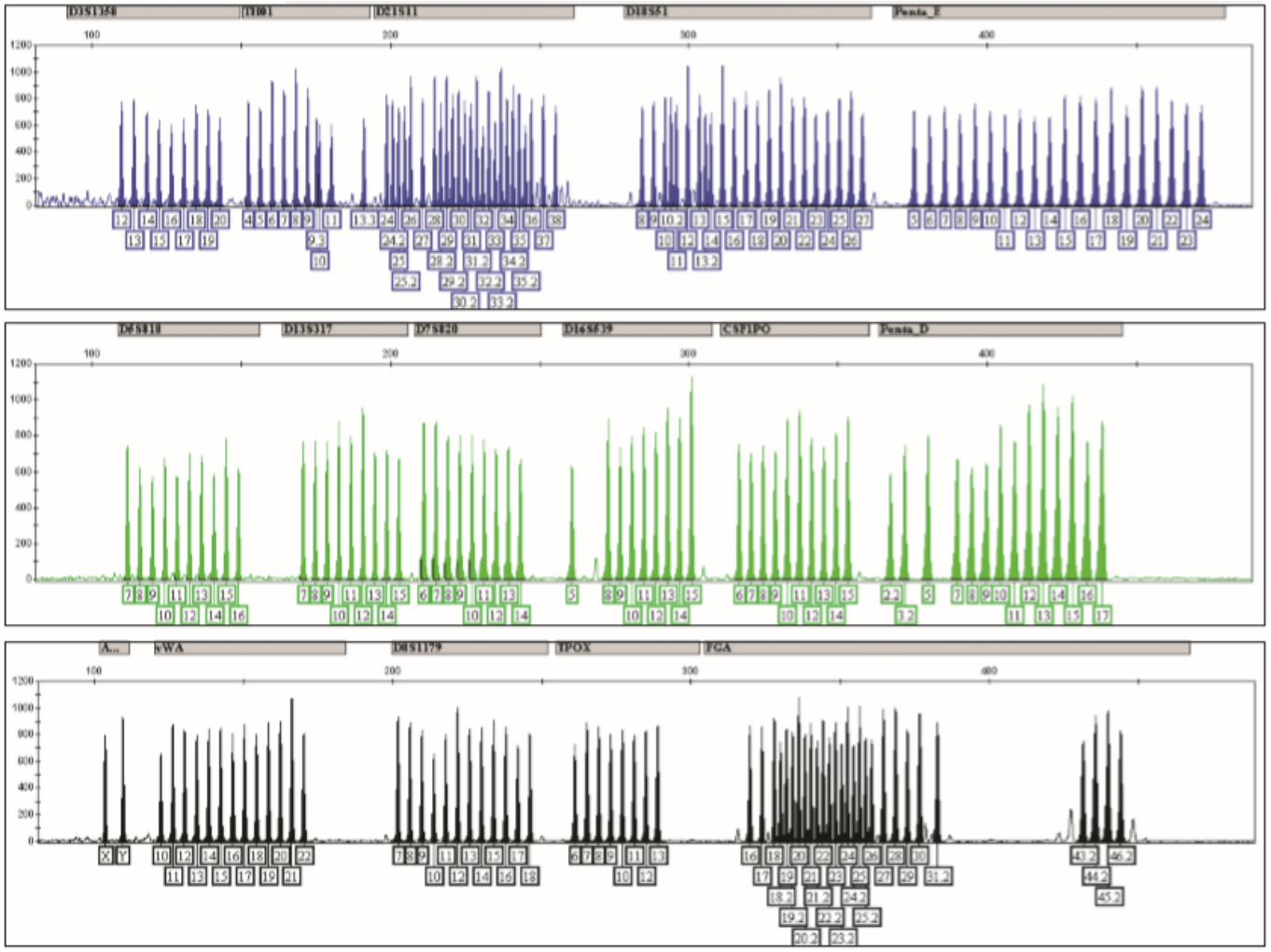
3.5.2. Sadržaj kita i pohrana

PowerPlex ®16 System sadrži dovoljno reagensa da se provede 100 reakcija od 25µL po jednoj reakciji i u njemu se nalazi:

- Preamplifikacijska komponenta (označena plavo) – pufer, smjesa parova početnica i DNA molekula
- Postamplifikacijska komponenta (označena bež) – ljestvica alela, standard veličina parova baza, protokol

Ljestvica alela se sprema u zasebnu, zatvorenu vrećicu za slanje te se nakon otvaranja treba prebaciti u postamplifikacijsku kutiju.

Sve se komponente kita pohranjuju na -20°C , a parovi početnica, ljestvica alela i internacionalni standard veličina parova baza su posebno osjetljivi na svijetlost i moraju se držati u mraku. Preporuča se da se preamplifikacijski i postamplifikacijski sadržaj čuva i koristi odvojeno. (9).



Slika 3.7. PowerPlex ®16 System ljestvica alela (9).

3.5.3. Prednosti korištenja lokusa koje pruža PowerPlex ®16 System

Lokusi uključeni u sustav PowerPlex ®16 odabrani su na način da zadovolje potrebe nekoliko svjetskih standardizacijskih tijela kao što je CODIS (*Combined DNA Index System*), američka nacionalna baza podataka optuženih prijestupnika. PowerPlex 16 System umnaža svih trinaest CODIS lokusa u jednoj reakciji (9).

Također ovaj sustav sadrži dva visoko polimorfna, pentanukleotidna lokusa, Penta E i Penta D sa izrazito niskom pojavnošću *stutter-a*. Ovi lokusi značajno pridonose diskriminacijskoj snazi samog sustava koji je upravo zbog toga u mogućnosti razlučiti sporove oko očinstva čak 100%-tno (9).

Za PowerPlex ®16 System pomno su odabrani STR lokusi i početnice u svrhu izbjegavanja ili barem smanjenja artefakata kao što su dodavanje terminalnih nukleotida ili pogrešno sparivanje baza (oba vezana uz *Taq* polimerazu). Međutim, pojavnost ovih artefakata primarno ovisi o lokusima i DNA koji se umnažaju u reakciji (9).

Adicija termalnih nukleotida nastaje kad Taq polimeraza nadodaje, najčešće adenin, na 3' kraj već amplificiranih fragmenata DNA bez posebne pravilnosti. Učinkovitost kojom se to pojavljuje varira kod različitih sljedova početnica. Upravo zbog toga pojavljuje se slijed za jednu bazu kraći nego što je očekivano tj. artefakt. U svrhu ispravka, sljedovi početnica su modificirani te je produžen završni korak od 60°C po 30 minuta kako bi se postigli uvjeti za izvršenje potpune adicije nukleotida, kada se po preporuci koristi velika količina predloška DNA (9).

3.6 Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit

3.6.1. Opis i svrha

Yfiler™ Plus Amplification Kit je STR multipleks sustav, optimiziran za amplifikaciju uzoraka DNA muške osobe. Ovaj sustav ima mogućnost umnažanja čak 27 Y-STR lokusa i koristi se sustavom od 6 različitih boja. Također je optimiziran za direktnu amplifikaciju sljedećih uzoraka iz samo jednog izvora bez prethodne purifikacije uzorka:

- Uzorci krvi i bukalne sluznice na tretiranim papirnatim podlogama
- Uzorci krvi na ne-tretiranim papirnatim podlogama, ali tretirani Prep-n-Go puferom
- Uzorci bukalne sluznice sakupljeni brisom i tretirani Prep-n-Go puferom

Tijekom sinteze oligonukleotida, između pojedinih početnica i boja umetnuti su ne-nukleotidni povezivači kako bi omogućili reproducibilno pozicioniranje alela olakšavajući stvaranje razmaka između lokusa. Ne-nuklotidni povezivači zajedno sa 6 fluorescentnih bojama omogućuju

istovremenu amplifikaciju i uspješno razdvajanje svih 27 Y-STR lokusa tijekom automatske DNA analize (10).

Tablica 6. Yfiler™ Plus Amplification Kit lokusi i aleli (10)

Locus designation	Alleles included in Allelic Ladder	Dye label	DNA Control 007
DYS576	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25	6-FAM™	19
DYS389I	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17		13
DYS635	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30		24
DYS389II	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35		29
DYS627	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		21
DYS460	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	VIC™	11
DYS458	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17
DYS19	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		15
YGATAH4	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		13
DYS448	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		19
DYS391	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11
DYS456	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	NED™	15
DYS390	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29		24
DYS438	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		12
DYS392	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20		13
DYS518	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49		37
DYS570	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26	TAZ™	17
DYS437	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18		15
DYS385 a/b	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		11,14
DYS449	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40		30
DYS393	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	SID™	13
DYS439	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17		12
DYS481	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32		22
DYF387S1	30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44		35,37
DYS533	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17		13

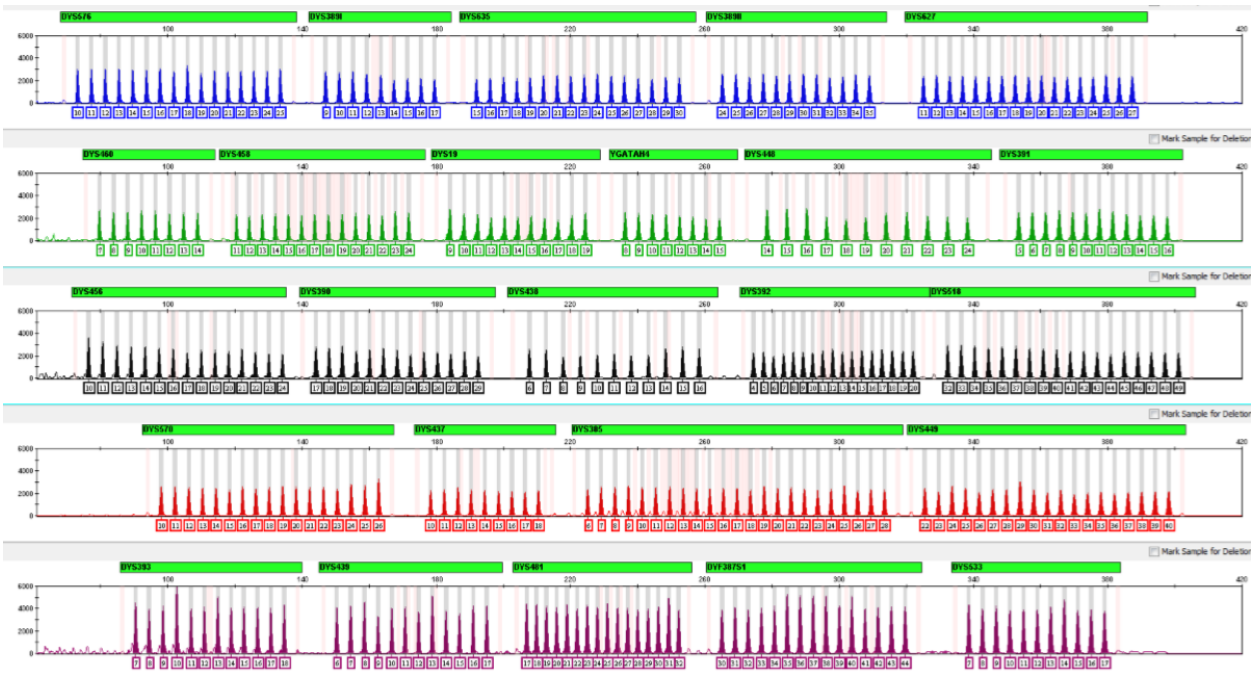
Tablica 7. Boje sadržane u kitu Y filer (10)

Dye	Color	Label
6-FAM™	Blue	Samples, allelic ladders, and controls
VIC™	Green	
NED™	Yellow	
TAZ™	Red	
SID™	Purple	
LIZ™	Orange	GeneScan™–600 LIZ™ Size Standard v2.0

3.6.2. Sadržaj kita i pohrana

Yfiler™ Plus Amplification Kit sadrži dovoljnu količinu sljedećih reagensa za izvedbu 100 ili 500 reakcija umnažanja (ovisno o verziji), koristeći 25µL/amplifikaciji:

- Yfiler™ Plus Master Mix – sadrži $MgCl_2$, dATP, dGTP, dCTP i dTTP, albumin, enzime, pufer i soli
- Yfiler™ Plus Primer Set – sadrži bojom označene, ali i neoznačene početnice u puferu koje amplificiraju Y-STR lokuse
- Yfiler™ Plus ljestvica alela – sadrži već amplificirane alele i pohranjuje se odvojeno od ostalih komponenti kita kako bi se izbjegla kontaminacija
- Kontrolna DNA – sadrži 2 ng/µL humane DNA muške osobe u 0.05% natrijevom azidu i puferu (10).



Slika 3.8. Yfiler™ Plus Amplification Kit ljestvica alela (10).

3.6.3. Eksperimenti

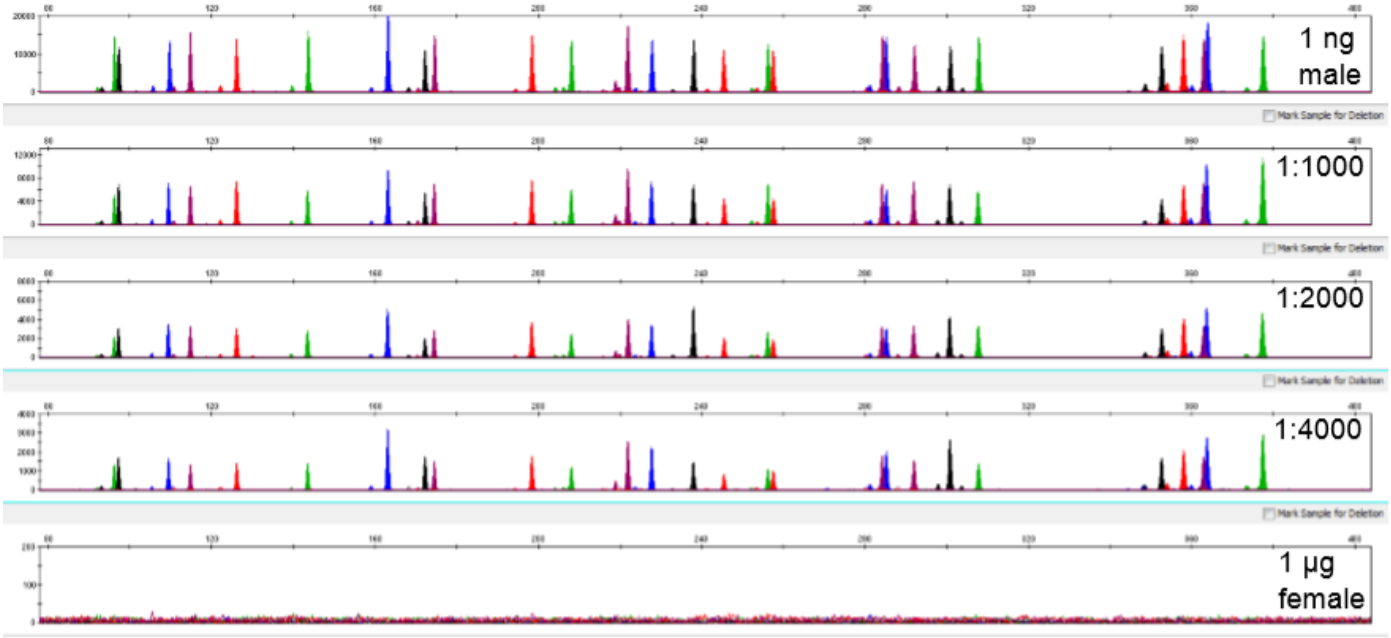
Validacija postupaka analize DNA za ljudsku identifikaciju je procjena učinkovitosti i pouzdanosti te procjena karakteristika samog postupka. Proces validacije otkriva prednosti, ali i nedostatke, koji su od iznimne važnosti prilikom interpretacije rezultata (10).

3.6.3.1. Miješani uzorci

- SWGDAM smjernica 3.8 - "Sposobnost dobivanja pouzdanih rezultata iz uzoraka koji potječu iz više izvora treba biti određena" (SWGDAM, prosinac 2012)

Dokazni uzorci koji sadržavaju tjelesne tekućine i/ili tkiva koja potječu od više pojedinaca su sastavni dio forenzične analize, stoga je od iznimne važnosti osigurati da sustavi analize DNA su u mogućnosti detektirati miješane uzorke. U slučaju Y-STR lokusa, DNA ženske osobe se ne može amplificirati uz pomoć Y-kromosom specifičnih primera. Žensko/muške miješane studije su izvršene u omjeru 1:4,00 i koristile su se DNA 3 različite ženske osobe. Nadalje, količina DNA ženske osobe stalno je iznosila 1µg dok se količina DNA muške osobe mijenjala. Rezultati su

pokazali da DNA ženske osobe nije uzrokovala nikakve interferencije kod interpretacije Y-STR profila kao što je prikazano na slici 3.9. (10).

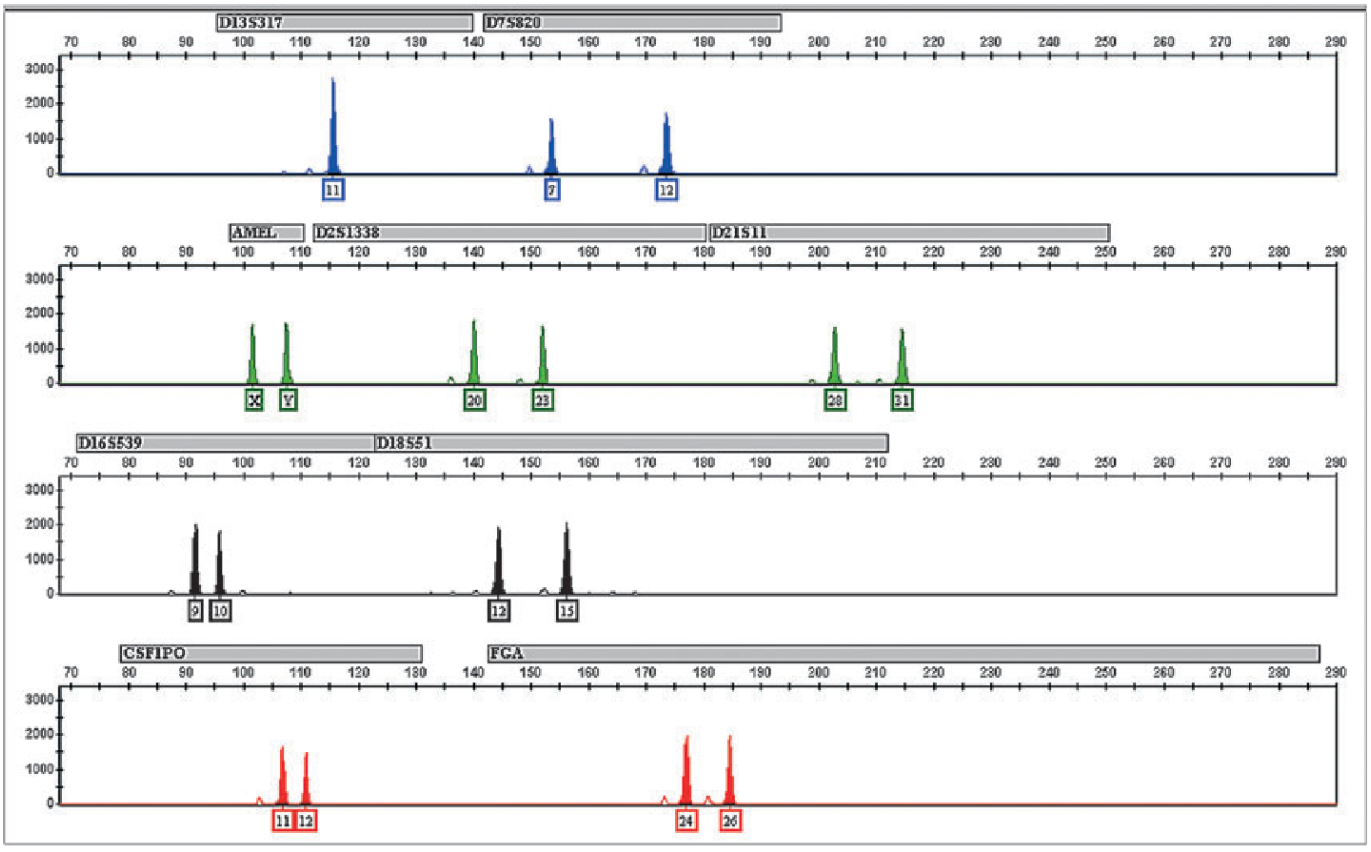


Slika 3.9. Amplificirana kontrolna DNA muške osobe, uz prisustvo DNA ženske osobe (10).

4 Rezultati

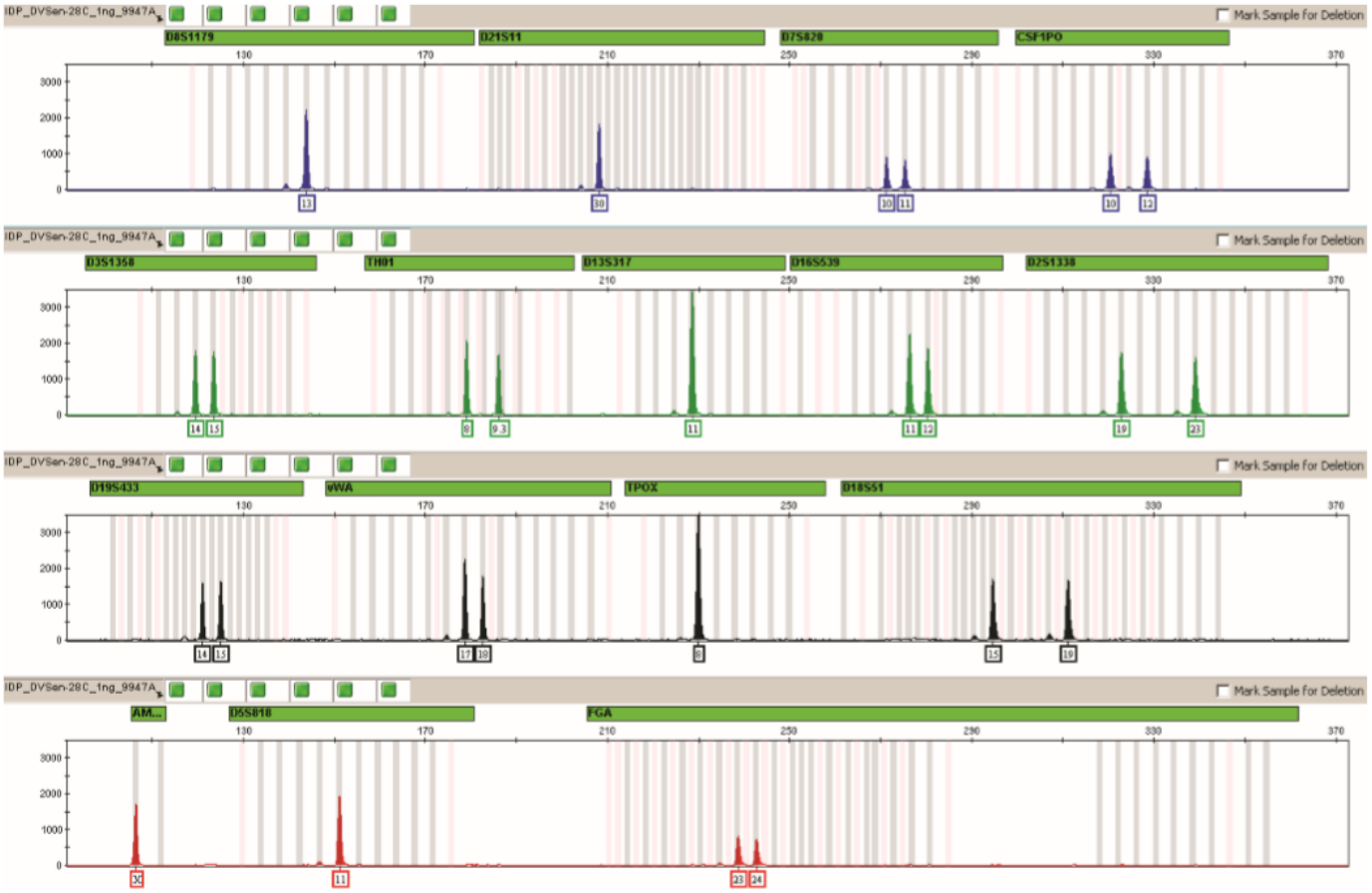
U ovom poglavlju su prikazani rezultati svih prethodno spomenutih sustava. Prikazani su grafički – elektroferogramima nastalim vizualizacijom kapilarnom elektroforezom. Na apscisi su prikazane veličine fragmenata u parovima baza (bp), a na ordinati intenzitet umnožene DNA koji je upravo proporcionalan količinu DNA. Plavom, zelenom, crnom i crvenom bojom prikazani su ispitivani lokusi. Pojava jednog signala označava homozigot dok pojava dva signala označava heterozigot.

4.1. AmpF*l*STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit



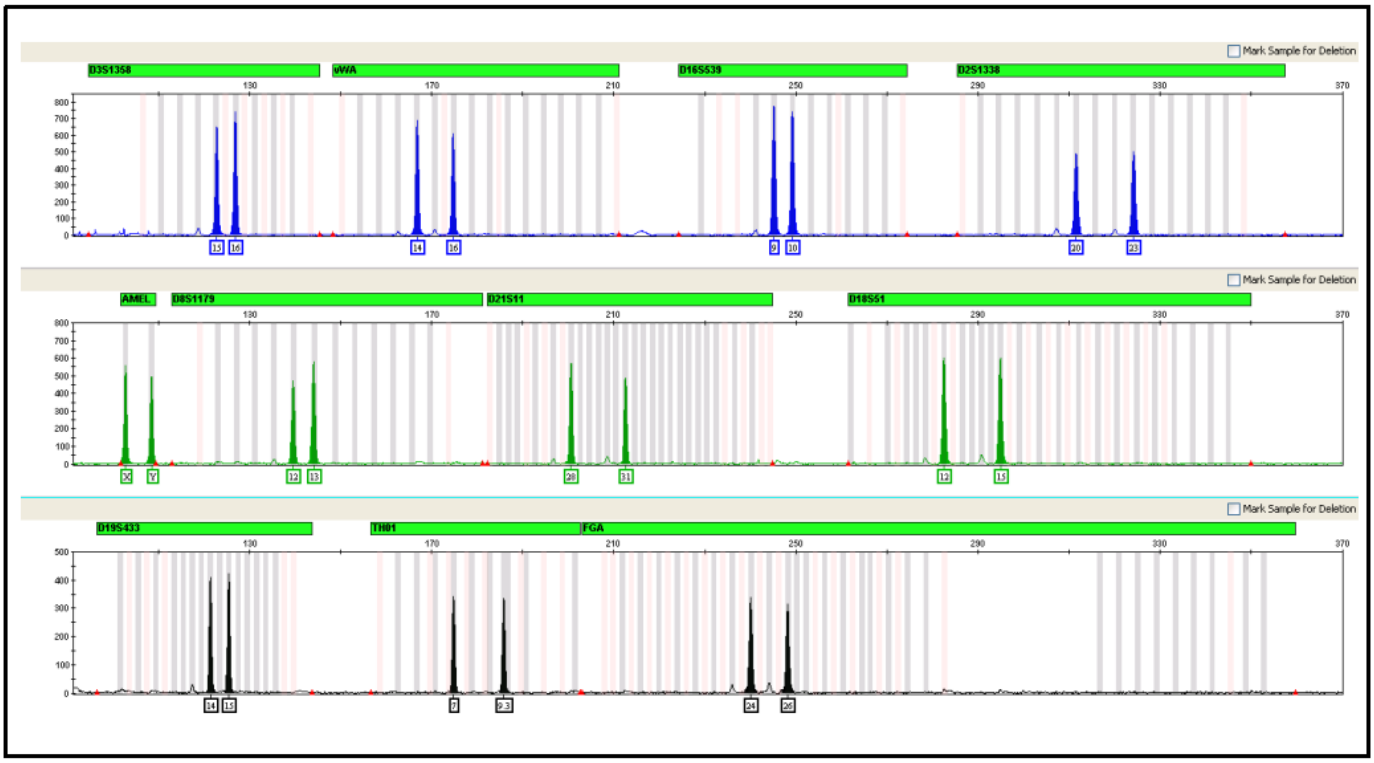
Slika 4.1. Profil kontrolne DNA 007 (500 pg) amplificirane korištenjem MiniFiler™ seta reagensa (11).

4.2. AmpF*l*STR® Identifiler® Plus Kit



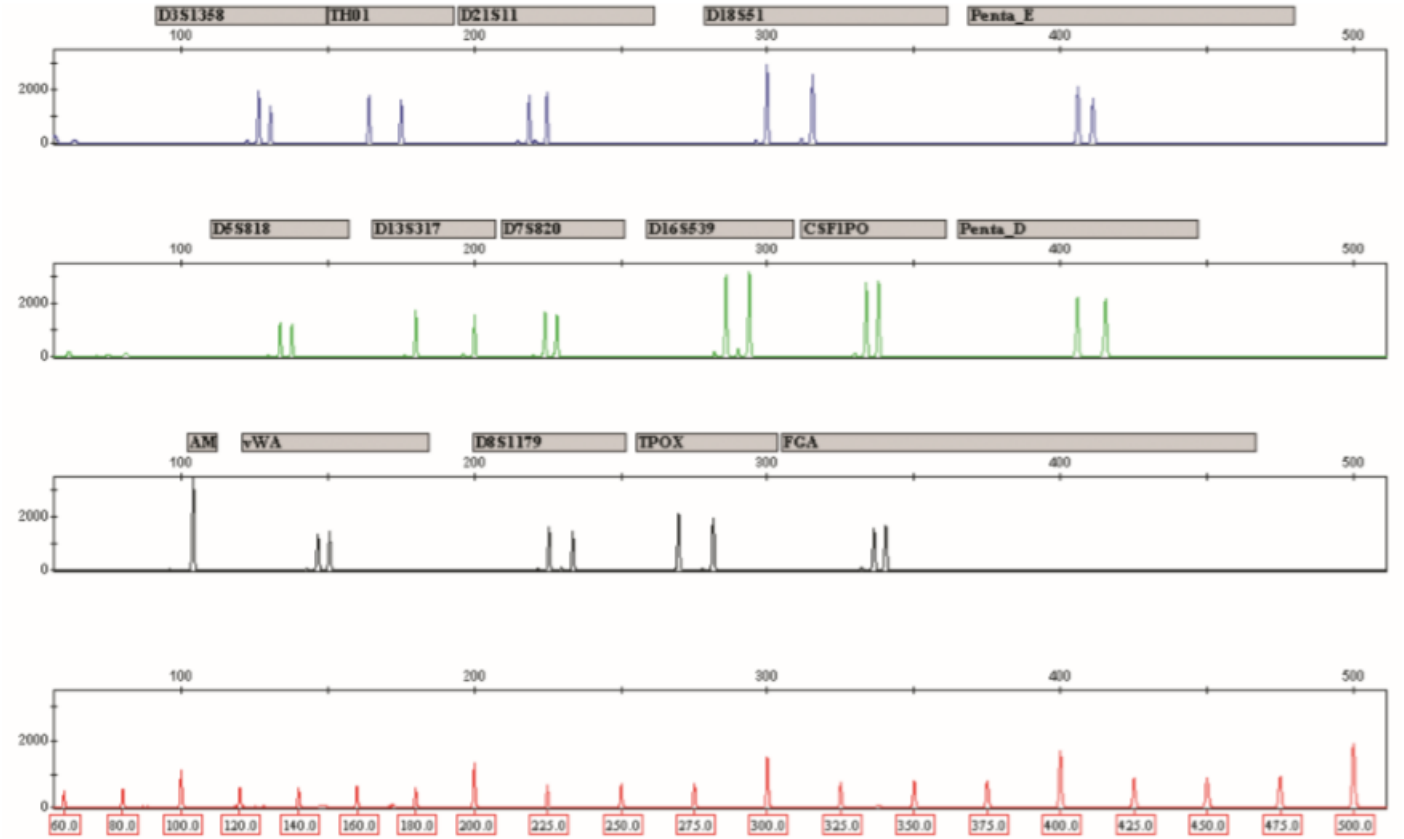
Slika 4.2. Rezultati analize kontrolne DNA 9947A umnožene u AmpF*l*STR® Identifiler® Plus setu reagensa (7).

4.3. AmpF*l*STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit



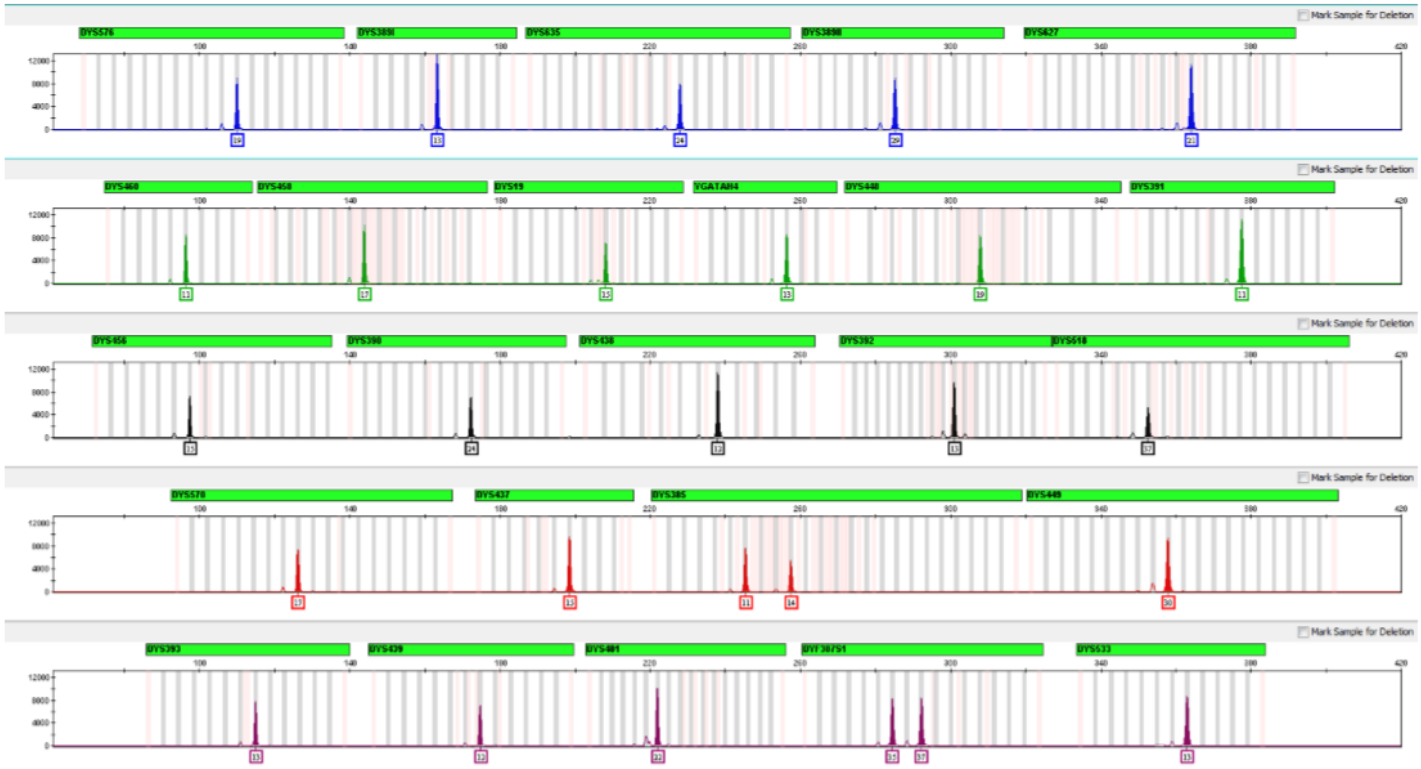
Slika 4.3. Prikaz umnožene kontrolna DNA 007 (1 ng) u SGM Plus setu reagensa te analizirane na genetičkom analizatoru Applied Biosystems 3130xl (8).

4.4. *PowerPlex*® 16 System



Slika 4.4. Prikaz rezultata amplifikacije 1ng molekule DNA u sustavu PowerPlex ®16 (9).

4. 5. Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit



Slika 4.5. Prikaz rezultata umnažanja kontrolne DNA 007 (1ng) u Yfiler™ Plus PCR setu reagensa (10).

5 Rasprava

Usporedba i interpretacija rezultata DNA analize podrazumijeva usporedbu DNA profila utvrđenoga analizom spornog traga s DNA profilom dobivenim analizom nespornog uzorka te matematičku (biostatističku) obradu podataka. Dva su osnovna pristupa u interpretaciji rezultata forenzične identifikacije. Prvi podrazumijeva priopćavanje rezultata u formi *prikazivanja učestalosti pojavljivanja* utvrđenog DNA profila u konkretnoj populaciji. Međutim, na sudovima se češće koristi drugi pristup vezan uz pojam *vjerojatnosti* označen brojem koji podrazumijeva koliko je puta veća mogućnost da trag potječe od ispitivane osobe nego da potječe od bilo koga drugoga. Samim time vrijednost rezultata ovisi komercijalnim sustavima, odnosno o broju ispitivanih lokusa u kitu. U tablici 8. prikazani je popis nekih komercijalnih sustava koji su se pojavili na tržištu od 1993. -2001. g. Može se uočiti da sustav koji je imao najviše analiziranih lokusa ima najvišu snagu isključenja slučajno odabrane osobe za razliku od npr. sustava koji su uključili samo 3 ispitivana lokusa.

DNA-identifikacijski sustavi AmpF*l*STR® MiniFiler™, AmpF*l*STR® Identifiler® Plus, AmpF*l*STR® SGM Plus® i Yfiler™ Plus izdani su od strane istog proizvođača – Applied Biosystems. Svaki od navedenih osmišljen je u svrhu DNA analize, ali se pojedinačno uvelike razlikuju prvenstveno po broju lokusa sadržanih u setu. MiniFiler amplifikacijski sustav, iako sadrži samo 8 STR lokusa, posebno se koristi pri analizi uzoraka u kojima se očekuju male količine degradirane DNA molekule. Za razliku od MiniFiler sustava, SGM Plus i Identifiler Plus setovi reagensa koriste 10 i 15 STR lokusa što uvelike doprinosi njihovoj snazi diskriminacije. SGM Plus omogućava određeni stupanj specifičnosti pri analizi uzoraka u kojima se osim humane DNA može očekivati i DNA molekula koja možda potječe od drugačijeg izvora npr. životinje, bakterije itd. Identifiler Plus set reagensa koji je od navedenih i kronološki "najmlađi", zbog svoje iznimno visoke snage diskriminacije, vjerojatnost da postoje dvije nesrodne osobe s identičnim alelnim varijantama na čak 15 STR lokusa svodi na minimum. Također, ovaj STR sustav je poboljšana verzija prethodne generacije setova jer ima modificirane PCR uvjete za poboljšanje osjetljivosti te unaprijeđeni proces pri sintezi DNA tako što minimizira prisustvo artefakata što doprinosi jasnijoj elektroforetskoj pozadini. Yfiler identifikacijski sustav se razlikuje od prethodno navedenih po tome što sadrži 27 Y STR lokusa. Ovaj set koristi takve početnice, specifične za kromosom Y,

čime je onemućena amplifikacijamolekule DNA koja pripada ženskoj osobi, ukoliko postoji u uzorku,. Također, Yfiler set reagensa ima mogućnost izravnog umnažanja DNA bez prethodne purifikacije. Naposlijetku, PowerPlex 16 set reagensa, kojeg je proizvođač kompanija Promega, sadrži 16 različitih lokusa (15 autosomalnih i 1 spolno- determinirajući – Amelogenin), od kojih je 13 tetranukleotidnih a dva su pentanukleotidna lokusa (svi prethodno spomenuti sadrže samo tetranukleotidne lokuse) koji su značajno pridonijeli sposobnosti razlučivanja u forenzičnoj DNA analizi.

Tablica 8. Prikaz različitih komercijalnih STR sustava, s nazivom proizvođača, datumom i godinom proizvodnje, lokusima sadržanim u setovima te snagom diskriminacije pojedinog seta reagensa (12)

Name	Source	Release Date	STR Loci Included	*Power of Discrimination
TH01, TPOX, CSF1PO monoplexes	Promega	Feb 1993	TH01, TPOX, CSF1PO	**1:410**
AmpFlSTR® Blue	Applied Biosystems	Oct 1996	D3S1358, VWA, FGA	**1:5000**
AmpFlSTR® Green I	Applied Biosystems	Jan 1997	Amelogenin, TH01, TPOX, CSF1PO	**1:410**
CTTv	Promega	Jan 1997	CSF1PO, TPOX, TH01, VWA (vWF)	**1:6600**
FFFL	Promega	Jan 1997	F13A1, FES/FPS, F13B, LPL	**1:1500**
GammaSTR	Promega	Jan 1997	D16S539, D13S317, D7S820, D5S818	**$1:1.8x10^4$**
PowerPlex™ (version 1.1 and 1.2 later)	Promega	Jan 1997	CSF1PO, TPOX, TH01, VWA, D16S539, D13S317, D7S820, D5S818	**$1:1.2x10^8$**
AmpFlSTR® Profiler™	Applied Biosystems	May 1997	D3S1358, VWA, FGA, Amelogenin, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820	**$1:3.6x10^9$**
AmpFlSTR® Profiler Plus™	Applied Biosystems	Dec 1997	D3S1358, VWA, FGA, Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820	**$1:9.6x10^{10}$**
AmpFlSTR® COfiler™	Applied Biosystems	May 1998	D3S1358, D16S539, Amelogenin, TH01, TPOX, CSF1PO, D7S820	**$1:8.4x10^5$**
AmpFlSTR® SGM Plus™	Applied Biosystems	Feb 1999	D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338, Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA	**$1:3.3x10^{12}$**
PowerPlex™ 2.1	Promega	Jun 1999	D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, VWA, D8S1179, TPOX, FGA, Penta E	**$1:8.5x10^{10}$**
PowerPlex™ 16	Promega	May 2000	CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, Penta D, Penta E, amelogenin	**$1:1.8x10^{17}$**
AmpFlSTR® Identifiler™	Applied Biosystems	May 2001	CSF1PO, FGA, TPOX, TH01, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D19S433, D2S1338, amelogenin	**$1:2.1x10^{17}$**

6 ZAKLJUČCI

- Otkriće i primjena komercijalnih STR-sustava označili su prekretnicu u forenzičnoj DNA analizi prvenstveno ubrzavajući sami proces identifikacije, zatim smanjujući troškove postupka te su omogućili jednostavnije prikazivanje rezultata analize.

- Uključivanjem sve više novih lokusa u nadolazeće setove reagnesa povećavala se njihova snaga diskriminacije, svodeći tako na minimum mogućnost da se dvije osobe koje nisu u srodstvu poklapaju u alelnim varijantama na više od 10 lokusa.

7 LITERATURA

1. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008
2. https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/b657b5d5-0970-476c-a890-83df2e8bb8a5/biologija-1/m02/j04/index.html, pristupljeno 21.3.2019.
3. Sutlović D, Definis Gojanović M. Priručnik o uporabi analize DNA u sudsko-medicinskoj praksi. Redak, Split, 2015.
4. Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J. i Klapper, P.E. (2000), "Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology", Clinical Microbiology Reviews, Vol. 13, 559–570.
   https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11023957
5. Pemov, A., Modi, H., Chiler, D.P. i Bavykin, S. (2005), "DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR.", Nucleic acids research, Vol. 33 No. 2, 1–9
   https://www.researchgate.net/publication/8069403_DNA_analysis_with_multiplex_microarray-enhanced_PCR
6. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit, User Guide, kolovoz 2012.
7. AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide, veljača 2015.
8. AmpFlSTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit, User Guide, kolovoz 2012.
9. PowerPlex® 16 System, Technical Manual, May 2008.
10. AmpFlSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit, User Guide, siječanj 2019.
11. https://www.semanticscholar.org/paper/Development-and-validation-of-the-AmpFlSTR-PCR-Kit%3A-Mulero-Chang/3ce7d91b1a971d39d9f133a9c46d5a49abb0b82a/figure/0 pristupljeno 10.6.2019.
12. https://www.slideserve.com/Samuel/training-on-str-typing-using-commercial-kits-and-abi-310 pristupljeno 20.6.2019.

8 SAŽETCI

8.1 Sažetak

Ciljevi rada:

Prikazati identifikacijske STR setove te usporediti njihovu vrijednost i značajnost u komercijalne svrhe.

Metode:

Opisano je pet različitih STR sustava koji se koriste u forenzičnoj DNA analizi u različite svrhe. Sadržaj svakog seta omogućuje izvođenje PCR metode pri čemu se umnaža DNA iz raznih bioloških uzoraka te se amplificirani produkti razdvajaju pa detektiraju i naposlijetku analiziraju.

Rezultati:

MiniFiler set reagensa najbolje se koristi u analizi malih količina DNA, asadrži 8 različitih lokusa za umnažanje DNA. SGM Plus identifikacijski kit sadrži 2 lokusa više, što doprinosi većoj osjetljivosti analize. Identifiler Plus i Power Plex koriste čak 15 STR lokusa te jedan spolno determinirajući marker – Amelogenin, što dodatno doprinosi njihovoj iznimnoj snazi diskriminacije.

Zaključci:

Otkriće komercijalnih STR-sustava označilo je prekretnicu u forenzičnoj DNA analizi, a uvođenje sve više lokusa u pojedine setove rezultiralo je povećanjem njihove snage diskriminacije i na taj način svelo pojavnost pogrešaka na minimum.

8.2 Abstract

Aim:

To present STR kits for forensic identification and compareits value and relevance for commercial purposes.

Methods:

Five different STR kits in use for forensic DNA analyis have been described. The content of the each kit enables the performance of PCR amplification of a DNA from different sources. The amplified products were separated and set up for detection and interpretation.

Results:

The MiniFiler kit was the best used, especially in analysis of the small amonuts of degraded DNA, and amplified 8 different loci. Two more loci are included in the SGM Plus identification kit which results in a much higher sensitivity rate. The Identifiler Plus and the PowerPlex 16 amplification kits amplify 15 different STR loci and one gender-determining marker – Amelogenin, which strongly contributes to a greater power of discrimination.

Conclusions:

Discovery of the commercial STR-kits marked a turning point in the forensic DNA analysis, and by including more and more loci in each set has enhanced the power of discrimination, which led to a error rate reduction.

9 ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Marta Urlić

Datum rođenja: 16.01.1997.

Mobitel: 091-117-3993

e-mail: marta.urlic@hotmail.com

OBRAZOVANJE:

2003. – 2011. Osnovna škola „Bol“, Split

2011. – 2015. I Gimnazija, Split

2016. – 2019. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI:

Engleski jezik – C1 razina, Učilište „Jantar“

Talijanski jezik

OSTALE AKTIVNOSTI:

2004. – 2014. Učilište „Jantar“

2005. – 2010. ASK Split

2010. – 2013. ŽOK Split 1700, Split