

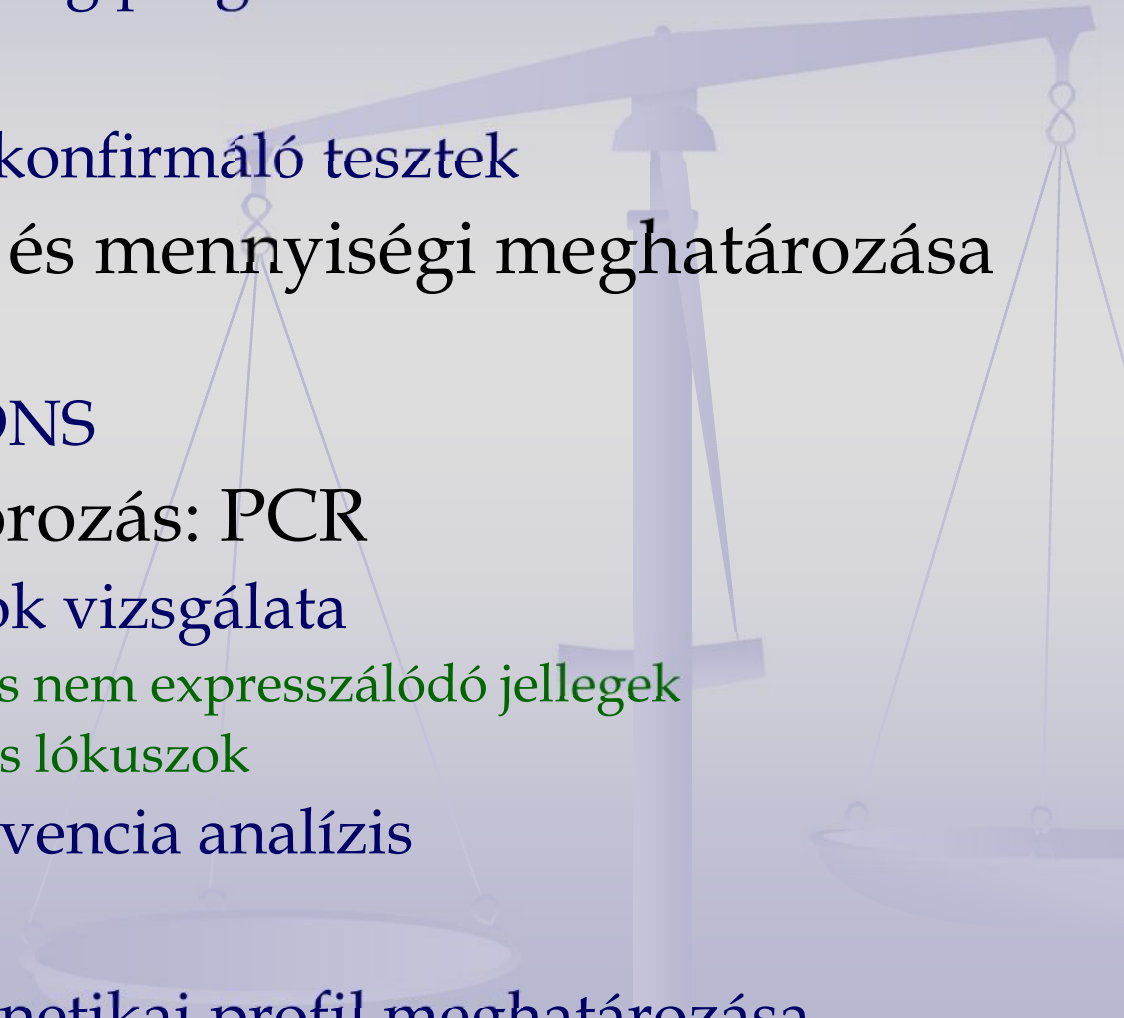
Igazságügyi genetika



Módszertani alapok

Pádár Zsolt

A vizsgálati folyamat...

- mintabiztosítás
 - vizsgálati sikeresség prognózisa
 - elővizsgálatok
 - valószínűsítő és konfirmáló tesztek
 - a DNS kinyerése és mennyiségi meghatározása
 - sejtmagi DNS
 - mitokondriális DNS
 - in vitro felsokszorozás: PCR
 - polimorf lókuszok vizsgálata
 - expresszáldó és nem expresszáldó jellegek
 - bi- és multialléles lókuszok
 - fragment és szekvencia analízis
 - detektálás
 - genotipizálás, genetikai profil meghatározása
- 

DNS kinyerési eljárások # 1

- az izolálás fő lépései
 - sejtlízis, sejtfeltárás
 - endogén nukleázok inaktiválása
 - nukleinsav elválasztása a sejttermeléstől, fehérjétől és az egyéb szennyezőktől
 - nukleinsav tisztítása
 - precipitáció, szűrés
- a DNS minta mennyiségi meghatározása
 - szükséges a PCR reakció és a detektálás optimalizálása érdekében, megvalósítható
 - fotometriás méréssel vagy gélelektroforézis alapján történő becsléssel
 - hibridizáció vagy valós idejű PCR alkalmazásával
- a megfelelő extrakció a PCR reakció korlátainak kompenzálásához is segítséget nyújt (pl. differenciált lízis)

DNS kinyerési eljárások # 2

- a kiindulási anyagok sokfélesége magában hordozza azokat a meghatározó sajátosságokat amelyeket a kivitelezendő DNS analízis típusa leginkább megkíván
 - a preparatív eljárások néhány típusa:
 - **kelátképző gyanták használata**
 - kis kiindulási mennyiséghez (kevés potenciális inhibitorhoz) ajánlott, gyors, egyszerű, egyláncú DNS-t eredményező módszerek (pl. Chelex)
 - **precipitáció, ko-precipitáció**
 - az oldatban levő (akár csekély mennyiségű) DNS koncentrációja (ko-precipitátor, pl. Pellet Paint™) precipitáló (pl. alkohol) anyagokkal, melyek néha az inhibitorokat is bekötik
 - **szerves extrakció és ultra-koncentráció**
 - munkaigényes, egészségügyi szempontból aggályos, körültekintést igénylő, a DNS fragmentálódását elősegítő, ugyanakkor mennyiségi szempontból a legjobb kihozatalt és a legtöbb inhibitortól mentes kétláncú DNS-t eredményező eljárás
 - **adszorpció**
 - automatizálható, jó megtartású, kevésbé fragmentált, általában inhibitortól mentes, kétláncú DNS-t eredményező eljárások (szilika-oszlop, mágnesgyöngy)
 - **elúció**
 - aktív kémiai komponenseket tartalmazó, a DNS degradációt hűtés nélkül is akadályozó hordozóról (pl. FTA-papír) speciális pufferral történő lemosás, mely a vérmintákból inhibitortól mentes, kétláncú DNS-t eredményez
 - a megfelelő extrakció a PCR reakció relatív templát arányból fakadó korlátainak kompenzálásához is segítséget nyújt (pl. differenciált lízis)

DNS kinyerési eljárások # 3

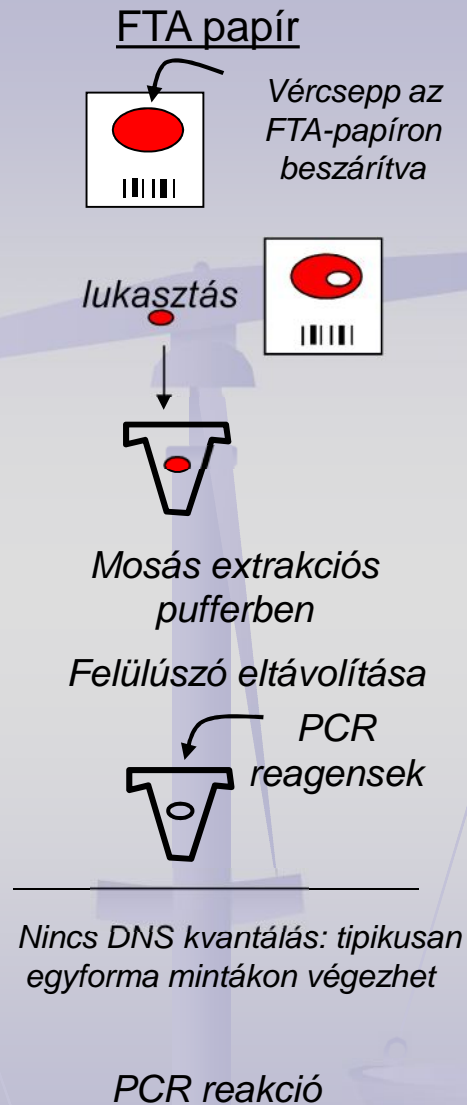
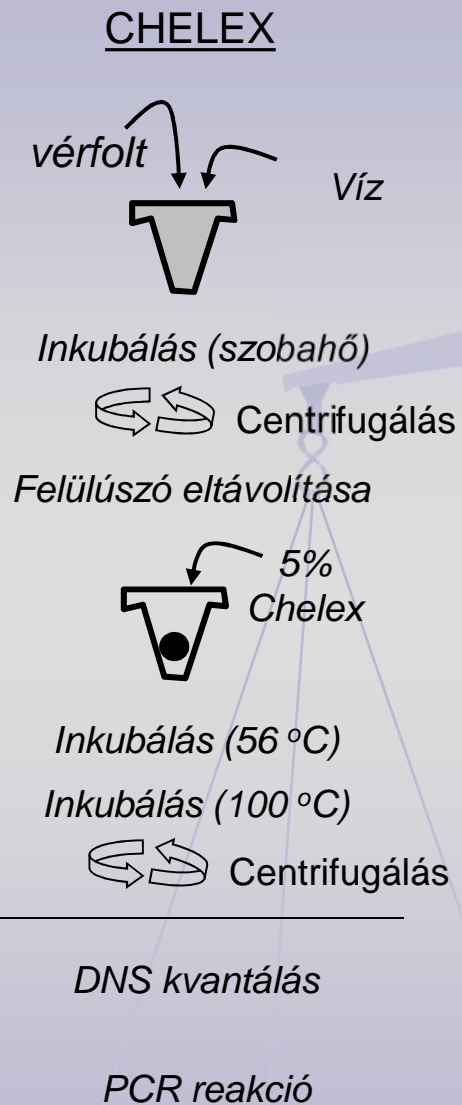
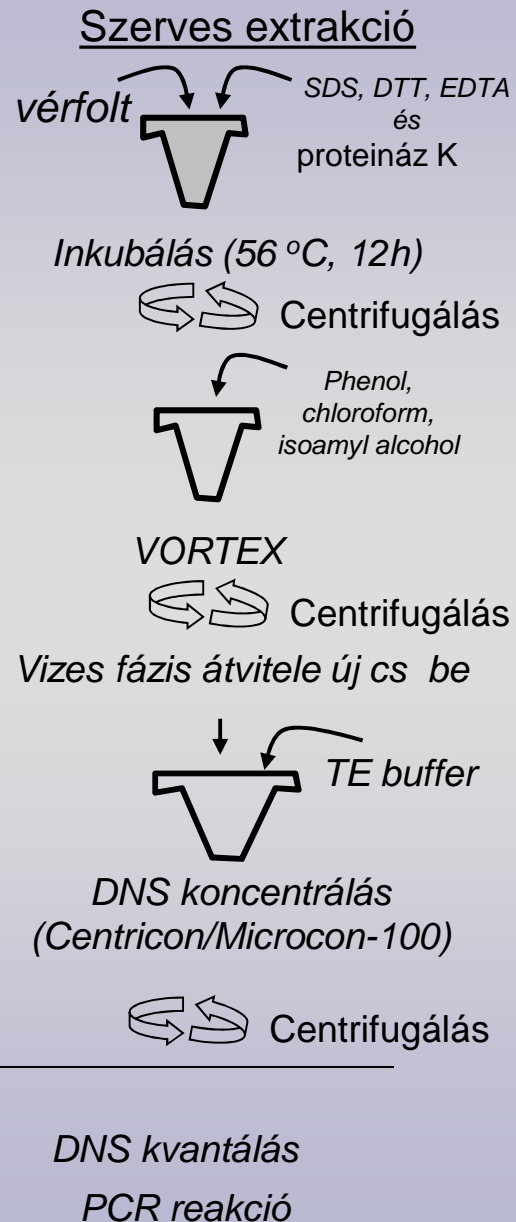


Figure 3.1, J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

DNS kinyerési eljárások # 4 - differenciált lízis

Pl.: hüvelykenet –
ondó keveredés

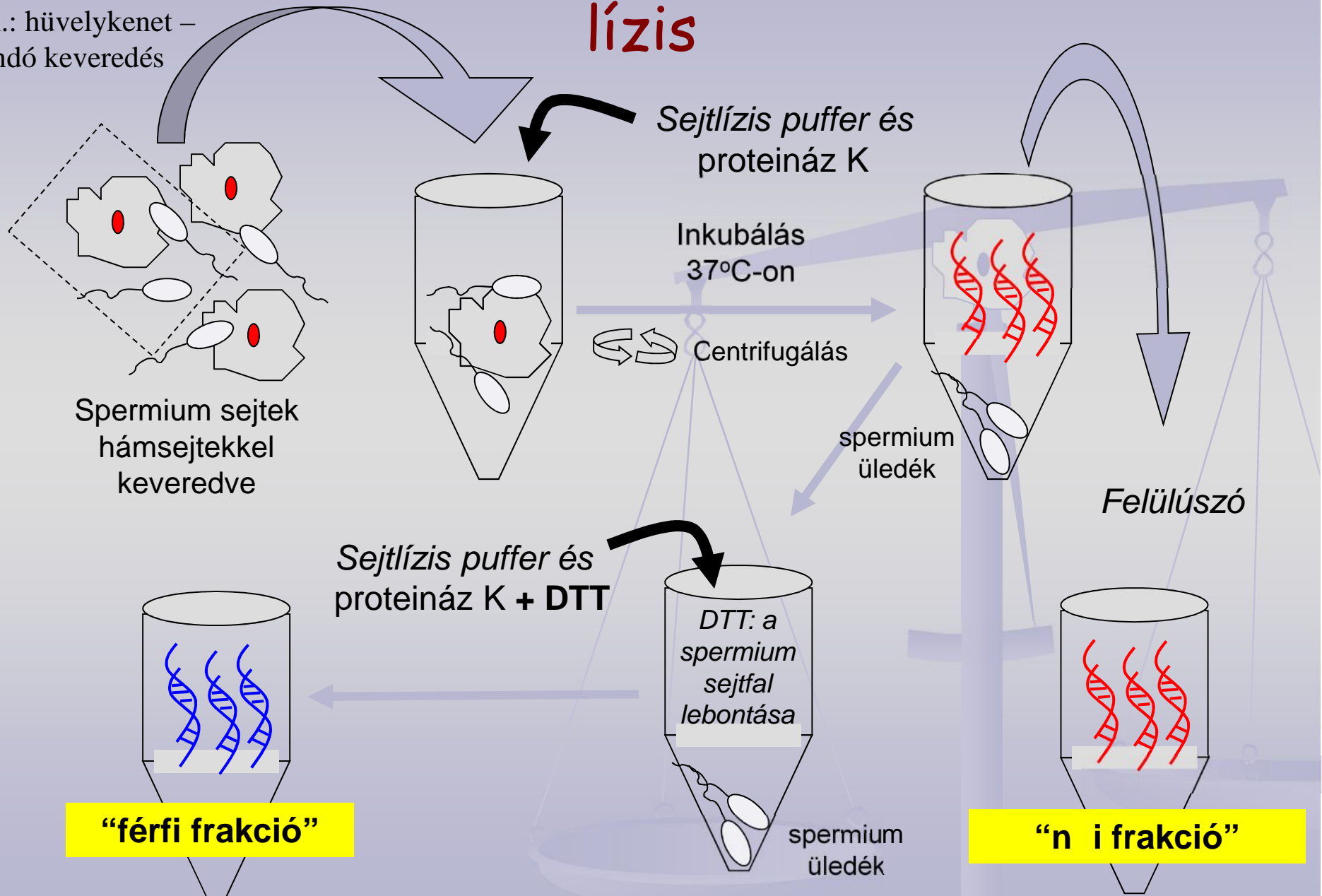


Figure 3.2, J.M. Butler (2005) Forensic DNA Typing, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

DNS kinyerési eljárások # 5 automatizált DNS extrakció

PREPFILER™ PROTOCOL

①

Lysis



- Add sample
- Add PrepFiler™ Lysis Buffer
- Incubate

②

Substrate Removal



- Remove substrate using PrepFiler™ Filter Column

③

DNA Binding



- Add PrepFiler™ Magnetic Particles & isopropanol

④

Wash/Purify



- Magnetize
- Add PrepFiler™ Wash Buffer
- Repeat 3 x

⑤

DNA Elution



- Add PrepFiler™ Elution Buffer
- Incubate
- Magnetize

⑥

Purified DNA



PrepFiler™ Automated Forensic DNA Extraction Kit with Plastics

- DNS kinyerése mágneses gyöngyökkel
 - PrepFiler™ (Applied Biosystems)

HID EVOLution™
Extraction

HID EVOLution™
qPCR/STR setup

HID EVOLution™
CE setup

PrepFiler™
Extraction

Quantifiler®
Kit Set-up

Normalize

AmpFISTR®
Kit Set-up

Capillary
electrophoresis

Available
Now

Coming Soon

DNS vizsgálati stratégiák

■ RFLP

- a mintában lévő adott mennyiségű DNS vizsgálatán alapszik ...

■ PCR

- kevésbé korlátozza a mintában lévő DNS minősége ill. mennyisége ...

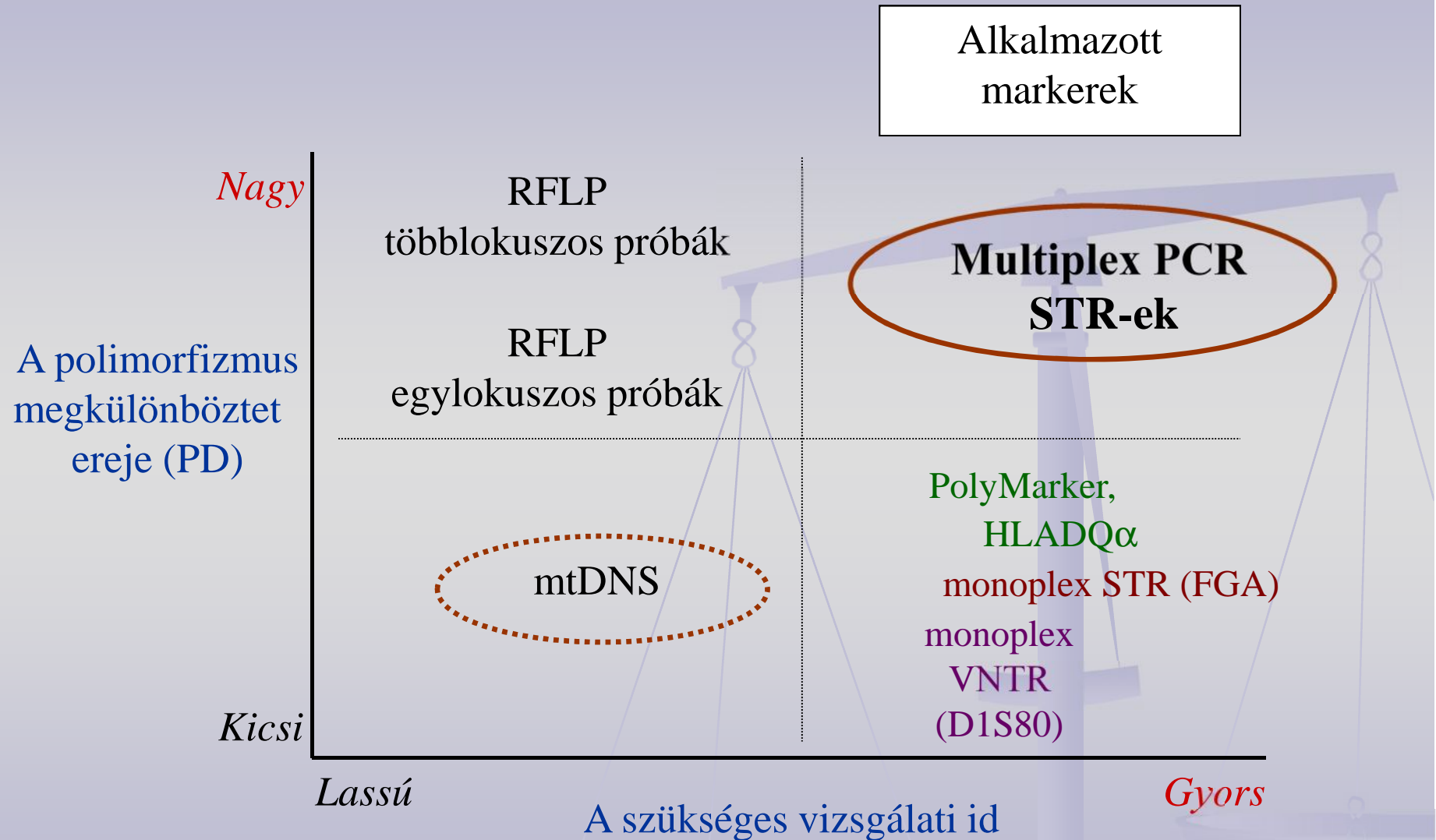
■ WGA

- mennyiségi korlátok kitágítása ...

■ FGS

- a legfinomabb analitikai felbontás ...

Igazságügyi genetikai vizsgálati módszerek

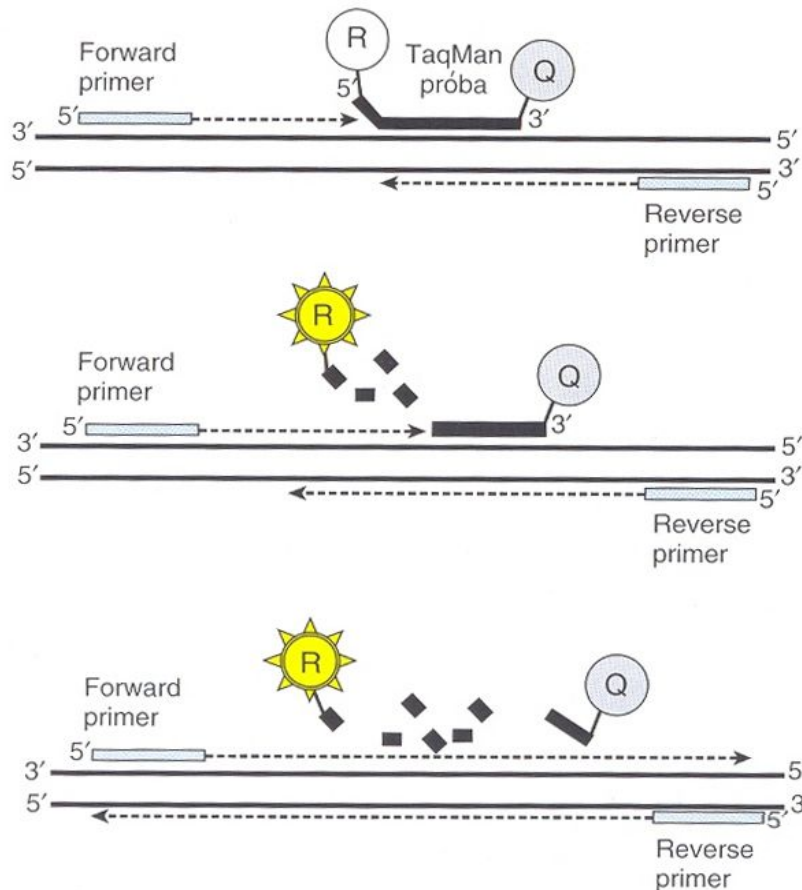


A valós idejű (Real-Time) PCR

- lehetőséget nyújt a PCR folyamat valós idejű monitorozására
 - az abszolút és relatív mennyiségi meghatározás eszköze, például
 - kópiaszám meghatározása
 - van-e egyáltalán - és mennyi - amplifikálható (pl. humán) DNS
 - pl. Qantifiler™ Duo (Applied Biosystems) , Plexor® HY (Promega) kitek
 - gátolt-e annak PCR reakcióval történő kimutatása, tipizálása
 - belső pozitív kontrollok (IPC) sokszorozódásának monitorozása
 - expressziós szint különbségének megállapítása
- a PCR folyamat végponti eredményének meghatározására
 - az igen/nem (plusz/mínusz) meghatározás lehetőségére
 - plazmid, transzgén, patogén, allergén detektálására
 - élelmiszer és GMO vizsgálatok
 - pl. Salmonella, Escherichia kitek
 - az allél diszkriminációs vizsgálatokra,
 - bi-allélikus polimorfizmusok (pl. SNP) genotipizálására
 - az egyedi vizsgálatok széleskörű tervezésére

A TaqMan® - 5' nukleáz próba (Applied Biosystems)

- A FRET technológia és az 5'-Nukleáz aktivitás ötvözete
 - FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)



Polimerizáció és
láncnövekedés

A Próba hasadása -
a "Reporter" festék
eltávolítása

A fluoreszcencia akkor jön
létre, ha a "Reporter" festék
és a "Quencher" festék nincs
egymás közelében

A polimerizáció
kiteljesedése

- a PCR specifikitását a primerek, a hibridizációt a próba biztosítja

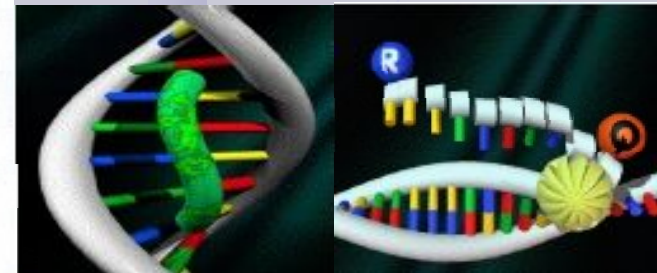
- rövidebb próbák specifikitásának megtartása

- MGB (Minor Groove Binder) próbák

- eltérő fluoreszcens jelölések

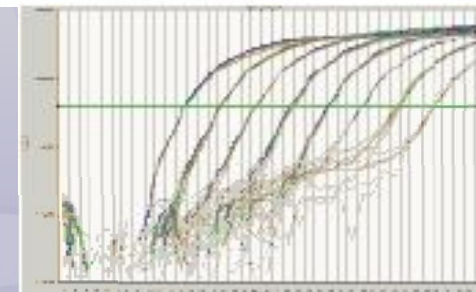
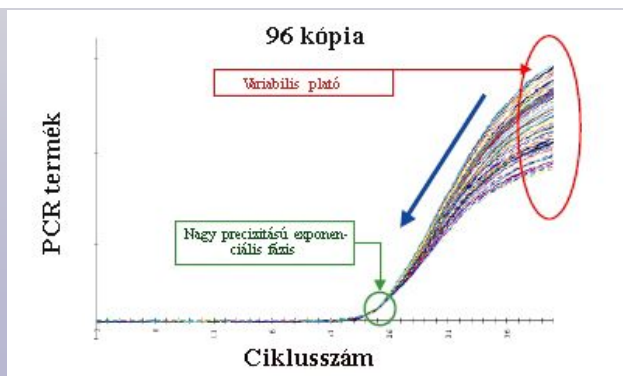
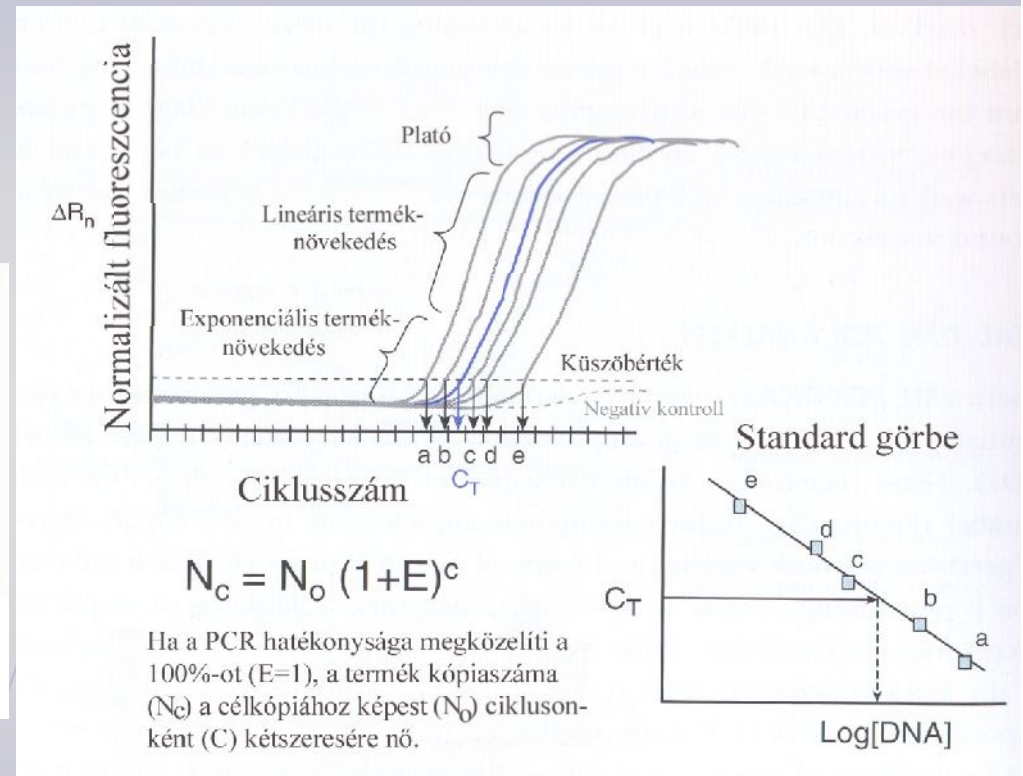
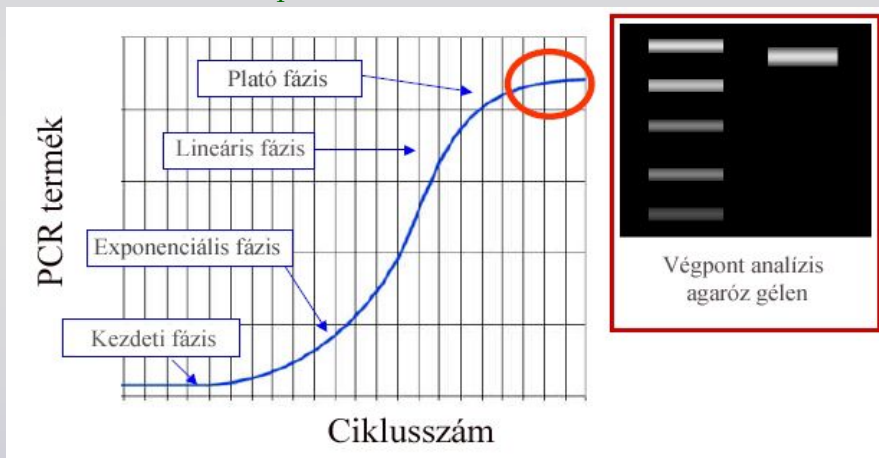
- FAM™, VIC®, TAMRA™, SYBR® Green I

- egyidejűleg több próba és belső kontroll használata



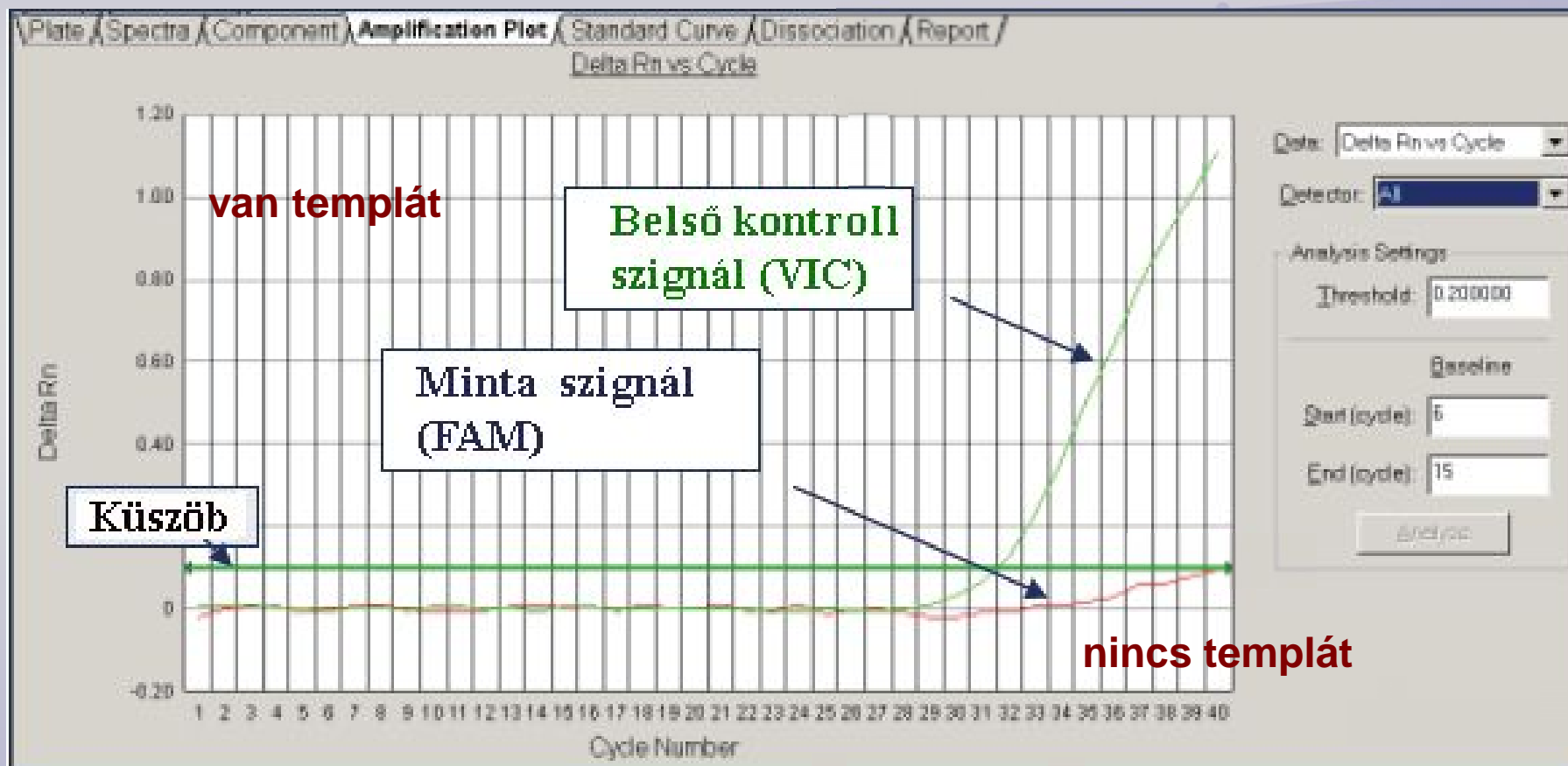
A templát mennyiségi meghatározása valós idejű PCR vizsgálattal

- PCR folyamat valós idejű monitorozása („time point” analízis)
 - exponenciális fázis nagy precizitása
 - C_T küszöb (treshold cycle) az a ciklusszám, ahol a fluoreszcencia az alapértéket meghaladja
 - abszolút és relatív kvantálás
 - C_T összehasonlítás



Belső pozitív kontroll (IPC) alkalmazása

- a belső pozitív kontroll mesterséges templát
 - PCR inhibíció kimutatása
 - az IPC szignál független a célszakasz kiindulási kópiaszámától



A DNS amplifikálása # 1

- a sokszorozás célja a szubanalitikus mennyiségű DNS mennyiségének megnövelése az analitikai vizsgálat érzékenységi szintje fölé
 - kvalitatív PCR
 - általános a hossz- és szekvenciális polimorfizmusok vizsgálatánál. A hossz-polimorfizmusok (pl. STR) esetén néha (pl. primer jelölés) szemi-kvantitatív is lehet.
 - kvantitatív PCR
 - valós idejű PCR, általános a DNS kópiaszám (mennyiség - *hTERT*, *RNU2*, *SRY*, *TSPY-DYZ5*) meghatározása, vagy
 - egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) kimutatásánál
- a sokszorozás megvalósítható
 - kereskedelmi forgalomban levő „kit”-ekkel, illetve
 - egyéni kivitelezéssel - ekkor azonban **nem a gyártó ellenőrzi**
 - a specifikusságot
 - melléktermékek, átermékek, mutációs allélek- vagy allélhiányok lehetőségét
 - a hatékonyságot
 - azzal együtt, hogy a ciklusszám nem korlátlan
 - **32 ciklus felett a műtermékek képződésének rizikója kifejezett**
 - az érzékenységet
 - ami egy vagy többkópiás szakaszok esetében eltérő
 - a megbízhatóságot
 - a kritikus (általánostól eltérő) minták sokszorozási megfelelőségét
 - az analitikai vizsgálat érzékenysége a detektálástól is függ
 - fluoreszcenncel jelölt primerek vagy nukleotidok lézeres detektálása szenzitív, de
 - eltérő lehet különböző szekvenciális környezetben lokalizált polimorf pontok (pl. heteroplazmia) kimutatása esetén

A DNS amplifikálása # 2

- a sokszorozáshoz a korlátozó tényezők hatásainak kiküszöbölésére többféle amplifikálási stratégiát használhatunk
 - **multiplex rendszerek**
 - a PCR technika napjainkban általánosnak mondható, egy reakcióelegyben több adekvát primer-pár alkalmazásával kivitelezett amplifikáció
 - a különböző primerek (polimorf markerek) többféle módon jelölhetők
 - többféle detektálási alternatíva alkalmazható
 - STR vizsgálatok (elektroforetikus elválasztás, lézeres detektálás)
 - szekvenciális polimorfizmusok (reverz „dot blot” hibridizálás)
 - a vizsgálati kapacitás és hatékonyság számottevően növelhető,
 - a több polimorf hely egyidejű vizsgálata nagyobb egyedi megkülönböztethetőséget jelent
 - a mennyiségi korlátok (fajlagos templát igény) jelentősen csökkenthetők
 - a vizsgálatok költséghatékonysága nő
 - jellemző korlátokkal rendelkeznek
 - alacsony kópiaszám mellett a reakció sztochasztikája kifejezett
 - a preferenciális amplifikálódás esélye a templát fragmentálódása nélkül is számottevő
 - kevert templát DNS esetén a relatív kimutatási küszöb (a minor komponens major komponens melletti megjelenése) kevésbé uniform
 - **monoplex rendszerek**
 - a PCR technika korai szakaszában általánosnak mondható, egy reakcióelegyben egy adekvát primer-pár alkalmazásával kivitelezett amplifikáció
 - napjainkban leginkább egyedi és/vagy ellenőrzési célból alkalmazzák, például
 - („flanking”) mutációs allél-variánsok - allél beesés-kiesés („drop in-out”) - ellenőrzése
 - viszonylag hosszú polimorf régiók analízise (VNTR - D1S80)
 - multiplex rendszerek preferenciális amplifikálódásának kiküszöbölése

A DNS amplifikálása # 3

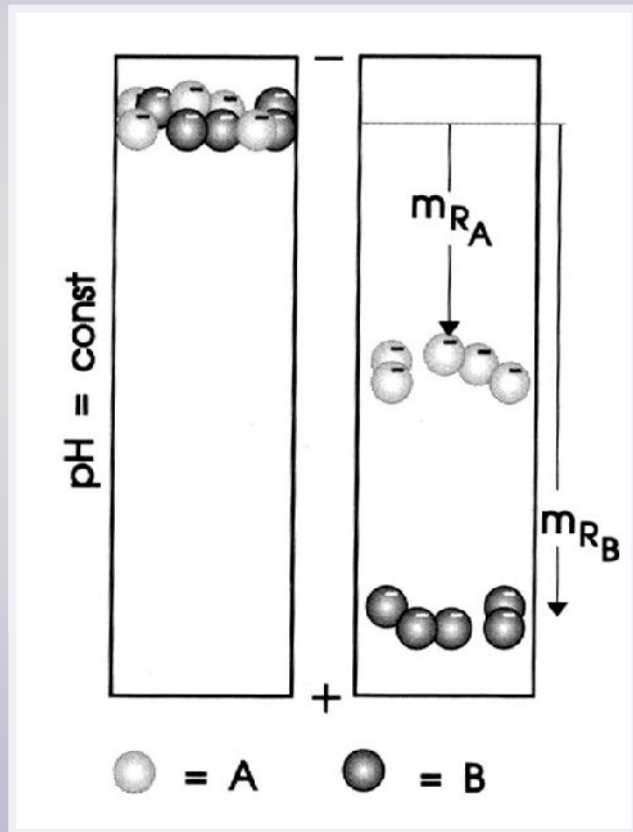
- az egyedi rendszerek kialakításakor jelentkező lényeges szempontok
 - primerek tervezése során
 - az általános megfontolásokon kívül, az amplikonok (fragmenshossz) méretének meghatározása
 - a rövid amplikonok sokszorozási sikeressége kevés és/vagy degradált templát esetén is megfelelő lehet,
 - a multiplexitás lehetősége
 - a primer multimerizáció esélyének elkerülése
 - a jelölés-detektálás optimalizálása
 - az additív szekvenciák (pl. „pig-tailing”) mérlegelése
 - a reakciómix összeállításánál
 - az általános megfontolásokon kívül a polimeráz kiválasztása
 - az inaktivitás („hot start”)
 - a 3'-5' exonukleáz aktivitás, és
 - a templát független nukleotid addíció figyelembe vétele
 - az optimalizáláskor
 - a PCR kondíciók, koncentráció viszonyok beállítása
 - az érzékenyítéskor a specifitás megtartása mellett
 - a templát igény minimalizálása
 - a validálás során
 - a standardizálására és az adekvát (pl. diagnosztikai patológiai, igazságügyi) célú felhasználás érvényesítésére



Elektroforetikus elválasztási alapműszerek

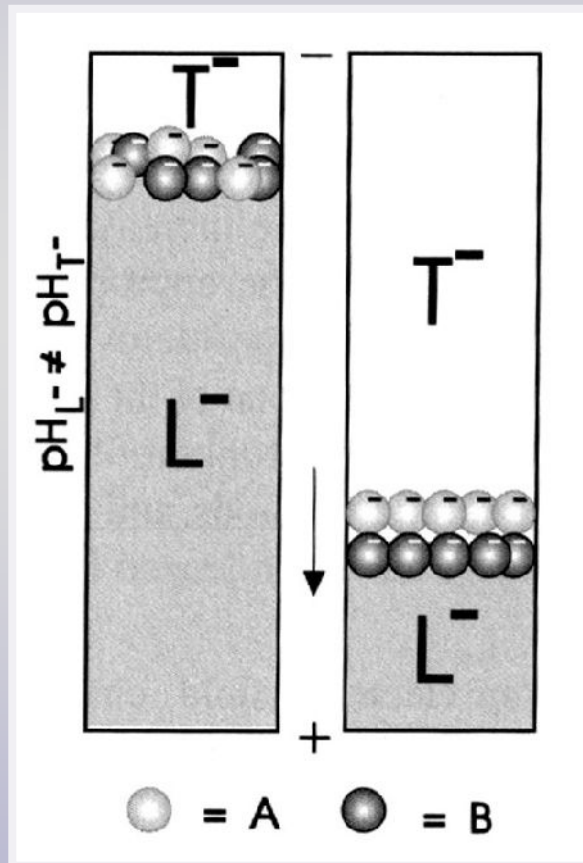
- töltéssel rendelkező anyagok (ionok) mozgása elektromos mezőben
 - elválasztás (szeparáció)
- az igazságügyi genetikai polimorfizmus vizsgálatok alapműszere a 70-es évektől
 - zóna elektroforézis (ZEF)
 - izotachoforézis (ITP)
 - izoelektromos fókuszálás (IEF)
- a gyakorlati alkalmazások nem feltétlenül kizárólagos módon használják az egyik, vagy másik alapműszert

ZEF alapjai



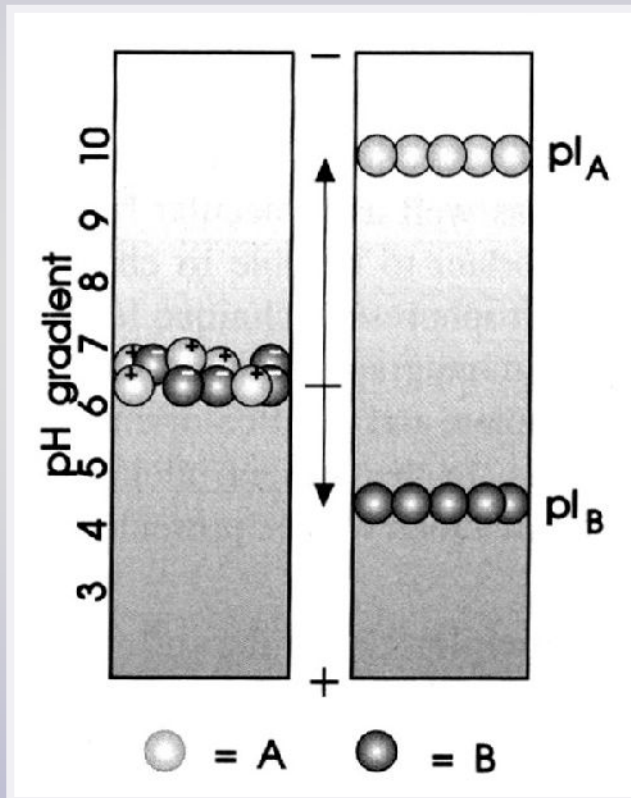
- homogén puffer-rendszer, konstans pH
- az ionok elkülönült zónákban, eltérő sebességgel vándorolnak
- kationok és anionok egy időben elválaszthatók

ITP alapjai



- inhomogén puffer-rendszer, általában a pH nem konstans
- az ionok elkülönült zónákban, azonos sebességgel vándorolnak a vezető ionok (L^-) mögött, és a követő (T^-) ionok előtt
- a zónák között nincs rés
- anionok és kationok nem vizsgálhatók szimultán
- mintakoncentráló (stacking) hatás (gél és kapilláris EF-nél kihasználható)

IEF alapjai



- pH gradiens
- kizárólag amfoterikus molekulák (pl. proteinek, enzimek, peptidek) elválasztására alkalmas
- vándorlás az izoelektromos pontnak (pI) megfelelő pH-jú gélterületig (fókuszálás)
 - izoelektromos pont - a közeg azon pH-ja, ahol a molekula nettó töltése zéró

GEF - agaróz gél

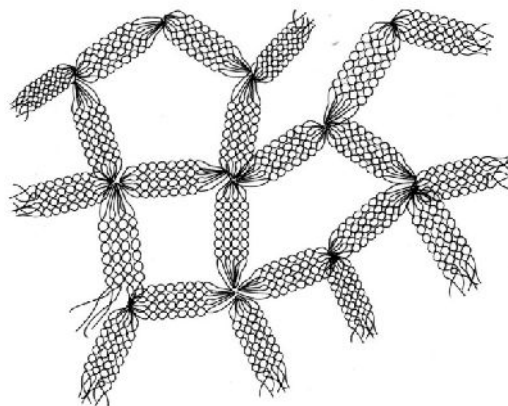
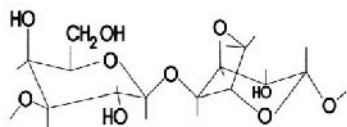


Fig. 6: Chemical structure of agarose and structure of the polymers during gel formation.

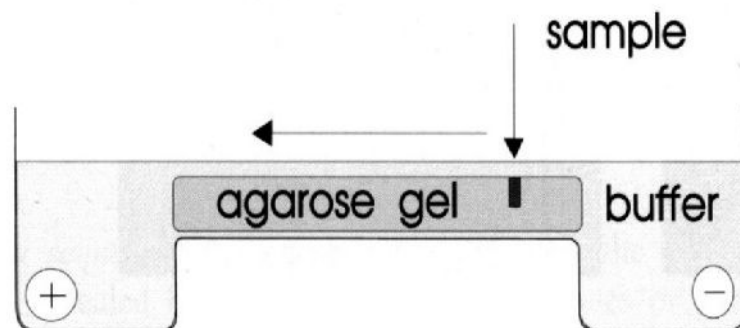


Fig. 12: The "submarine" technique for the separation of nucleic acids.

- poliszacharid kettős hélixek vastagabb filamentumokat képeznek

- gél cc.: vegyes % (w/v)
- pórusátmérő: 50–800 nm (3–0,075%; 150 nm - 1%)
- olvadáspont: 35–95 °C

- elektroendozmózis (EEO)

- a támasztófelület és a stabilizáló média (pl. gél) töltéssel bíró csoportokkal rendelkezhet
- ionizált állapotban (pufferben) ezek a csoportok az anód (+) felé vándorolnak, ha immobilisak, a kationokkal (pl. H_3O^+) kettős réteget képeznek, amely réteget az elektromos tér erő a katód (-) felé vonzza, amely a katód felé történő vízáramlásban nyilvánul meg

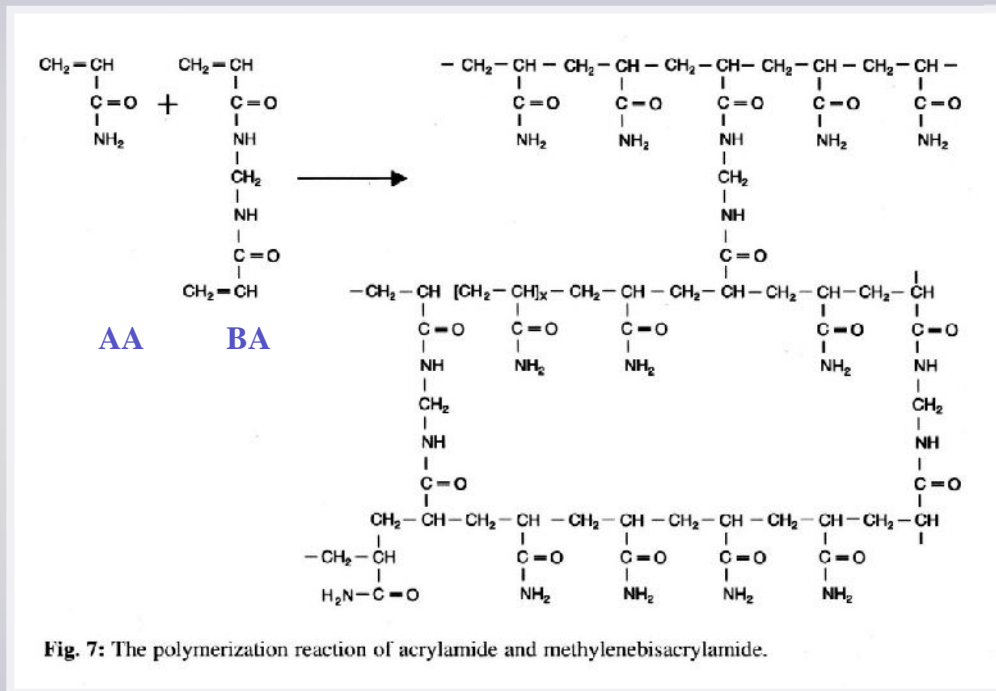
GEF - poliakrilamid gél (PAG)

■ poliakrilamid

■ akrilamid (AA) és valamilyen keresztkötő reagens [általában N,N'-metilén-biszakrilamid (BA)] kopolimerizációjával létrejövő gél

■ polimerizáció indítása - kémiailag (ammónium perszulfát - katalizátor, TEMED - iniciátor) vagy UV fényel (+ riboflavin - katalizátor)

- az oxigén, mint szabadgyök-csapda, gátolja a polimerizációt
- hőmérséklet hatása a polimerizáció gyorsaságára



Diszkontinuus (disc) PAGE

- megakadályozza a makromolekulák aggregációját, precipitációját a minta gélbe való belépésekor
- elősegíti a jól körülhatárolt zónák (sávok) képződését
- nincs folytonosság (azaz diszkontinuitás van)
 - a gélstruktúrában
 - a puffer-rendszer pH-jában
 - a puffer-rendszer ionerősségében
 - a gélben és az elektródpufferben lévő ionok természetében

Denaturáló közeg

- kétszálú DNS-láncok szétválasztása és egyszálú formában tartása
- a DNS-molekulák szekvenciafüggő természetes konformációja (másodlagos struktúra) megszűnik → az elektroforetikus mobilitás csak a mérettől függ
- az egyszálú DNS-lánc flexibilisebb mint a kétszálú, így az hatékonyabban lép kölcsönhatásba a géllal (molekulaszűrő médium) → a közel azonos méretű DNS-fragmentek jobban elválaszthatók

Horizontális, diszkontinuos (hd-) PAGE

- PCR ellenőrzés, mini- v. mikroszatelliták tipizálása
 - natív vagy denaturáló
 - puffer-rendszerek (Tris-borát/Tris-formiát, Tris-tricin/Tris-acetát, Tris-borát/Tris-foszfát)
 - gélvastagság (~ 0,5 mm)

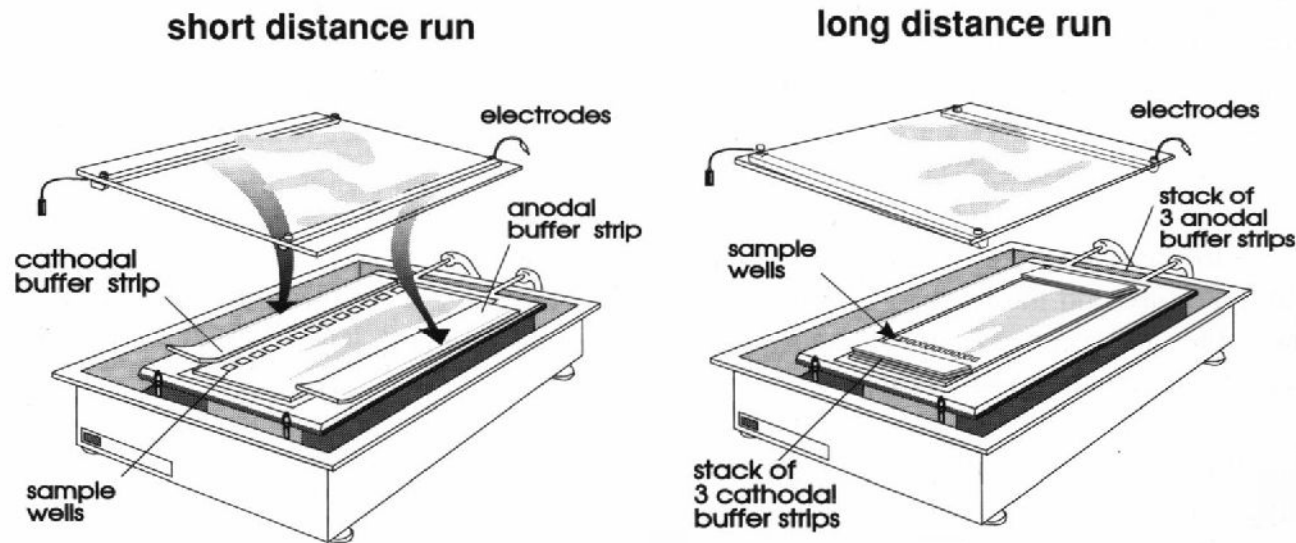


Fig. 7: Appliance for short and long distance runs of DNA fragments.

Blottolás

- makromolekulák immobilizáló membránra történő átvitele
 - kiszélesíti az elektroforetikus elválasztott frakciók detektálási lehetőségeit, mivel a membránra adszorbeált molekulák szabadon hozzáférhetők más molekulák számára, miközben a target pozíciója változatlan marad

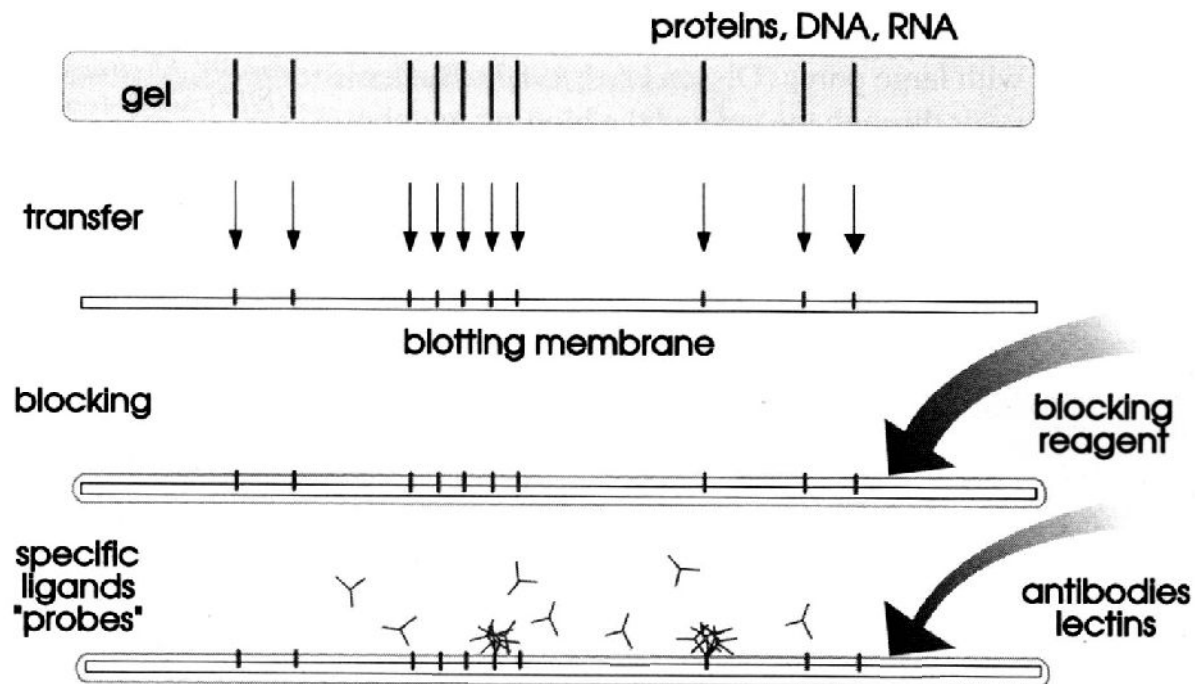


Fig. 37: The most important steps during blotting from electrophoresis gels.

Blottolás - transzfer típusok

- diffúzió: nagy pórusú gélek - fehérjék, nukleinsavak
- kapilláris: nagy pórusú gélek - nukleinsavak, fehérjék
- nyomás: horizontális EF (pl. PAGIEF) - (izo)fehérjék
- vákuum: agaróz EF - nukleinsavak
- elektroforetikus: PAGE - fehérjék, (nukleinsavak)
 - tank
 - félszáraz

Kapilláris blottolás

- DNS/RNS átvitele és hibridizáción alapuló kimutatása - Southern (1975)/Northern (1977) blot
 - transzfer ideje: egy éjszaka

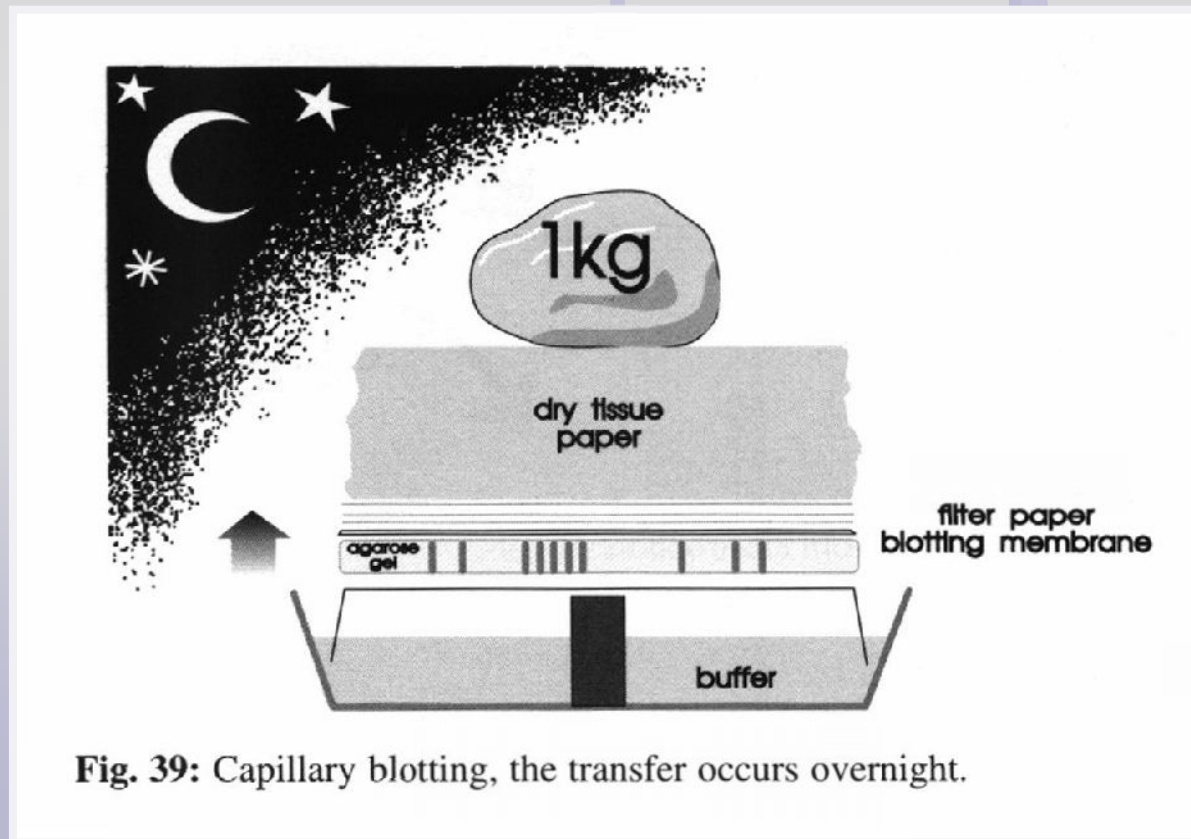
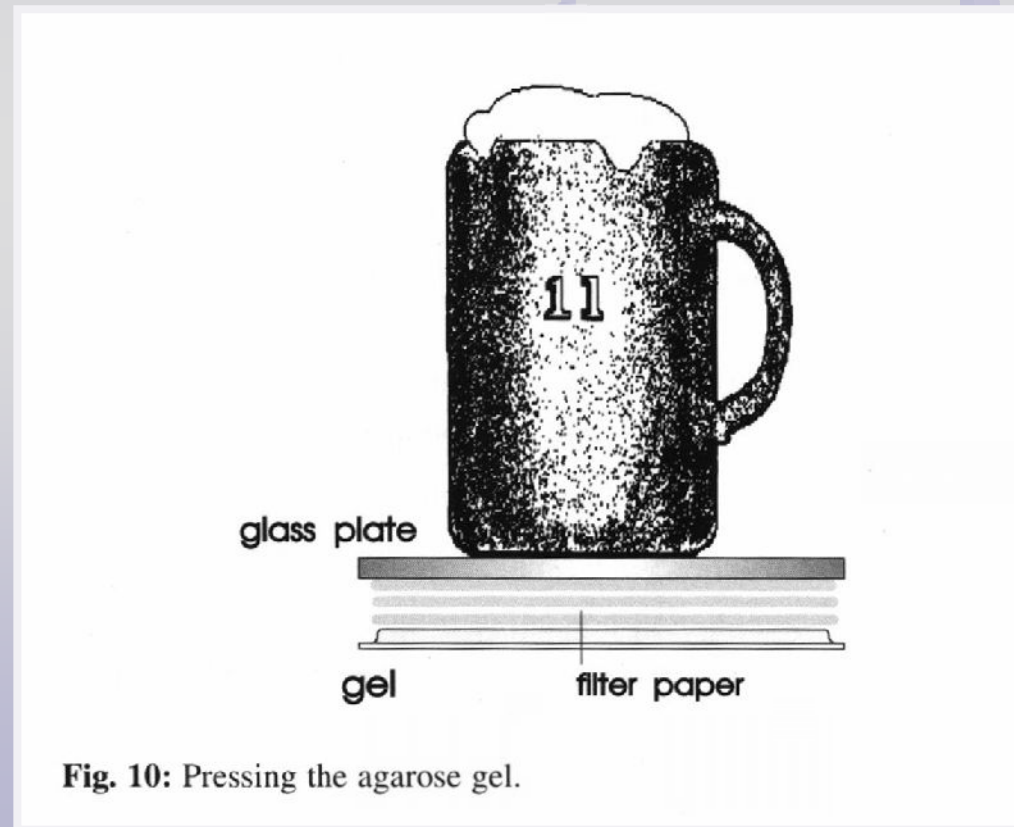


Fig. 39: Capillary blotting, the transfer occurs overnight.

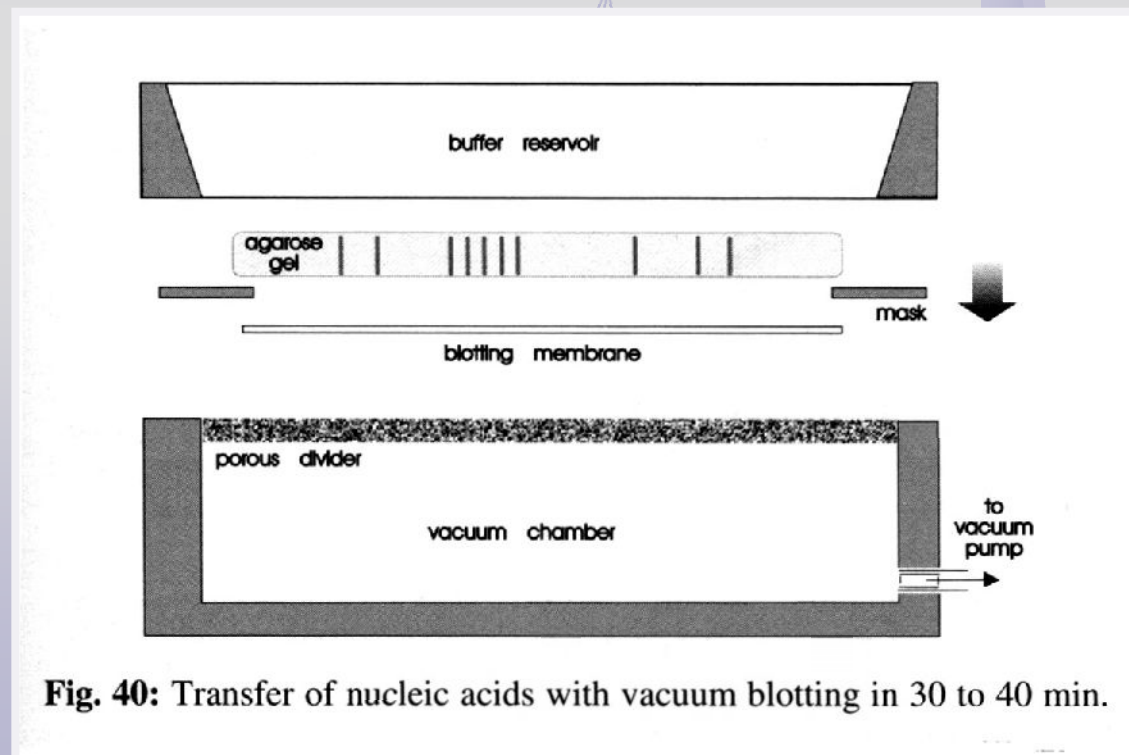
Nyomás blottolás

- fehérjék átvitele agaróz vagy PA GEF után, immunkötésen alapuló kimutatás - immun- (Western) blot
 - transzfer ideje: pár másodperc - 1 óra



Vákuum blottolás

- kapilláris blottolás felváltója - gyorsabb, hatékonyabb, élesebb sávok, jobb felbontás, egyidejű kémiai kezelés lehetősége
 - transzfer ideje: 30-40 perc



Félszáraz elektroforetikus blottolás

- blottolás két grafit elektródlap között
 - diszkontinuus puffer-rendszer - izotachoforézis
 - transzfer ideje: 1 óra

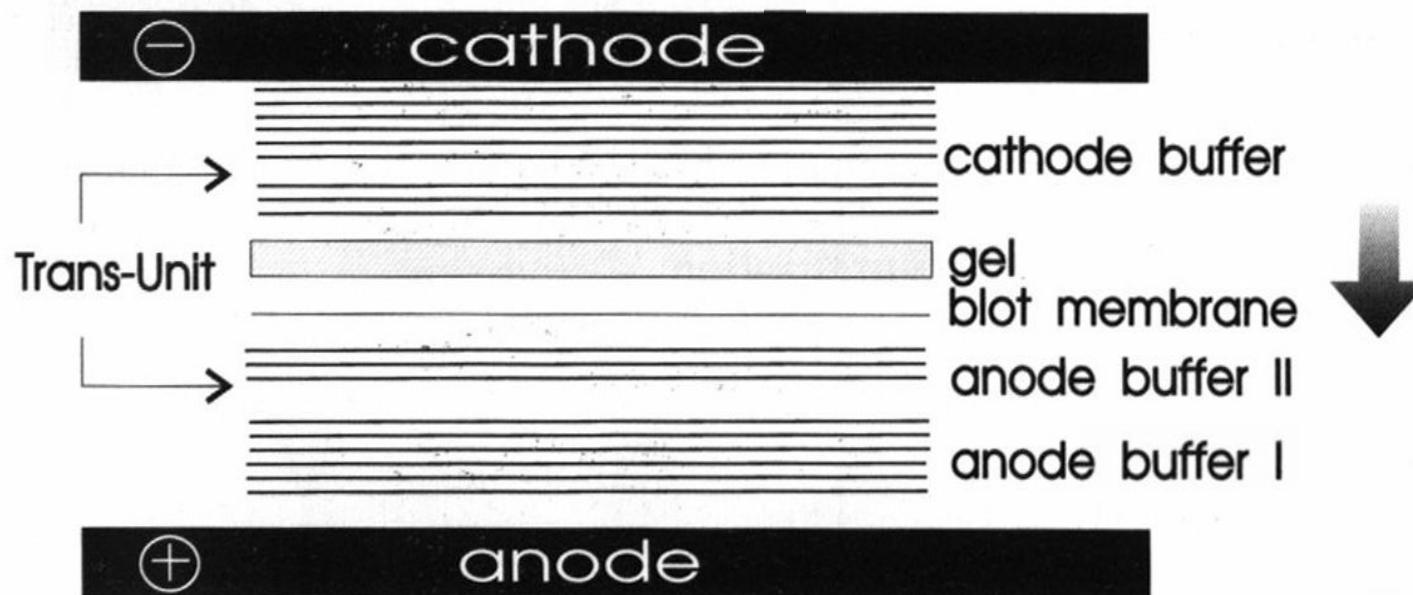
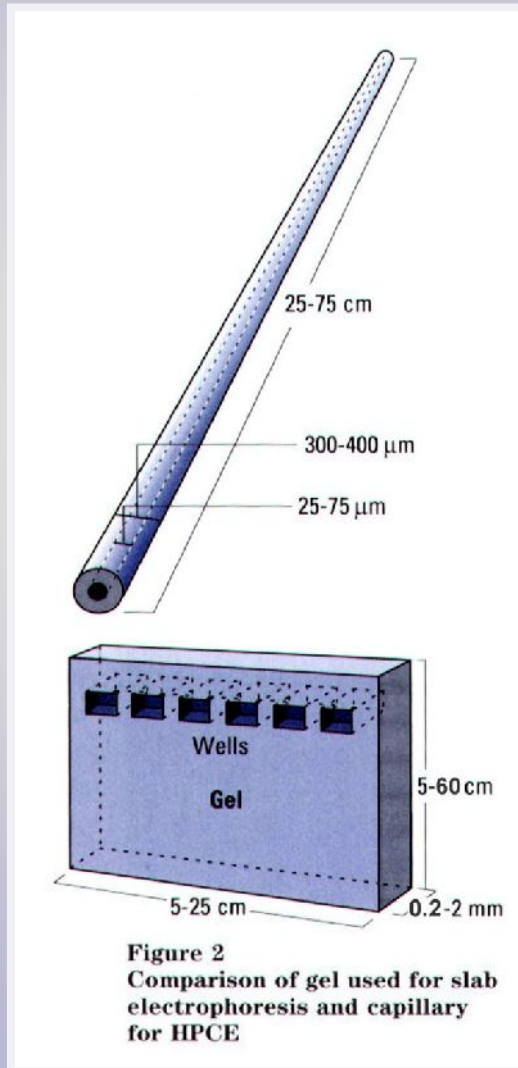


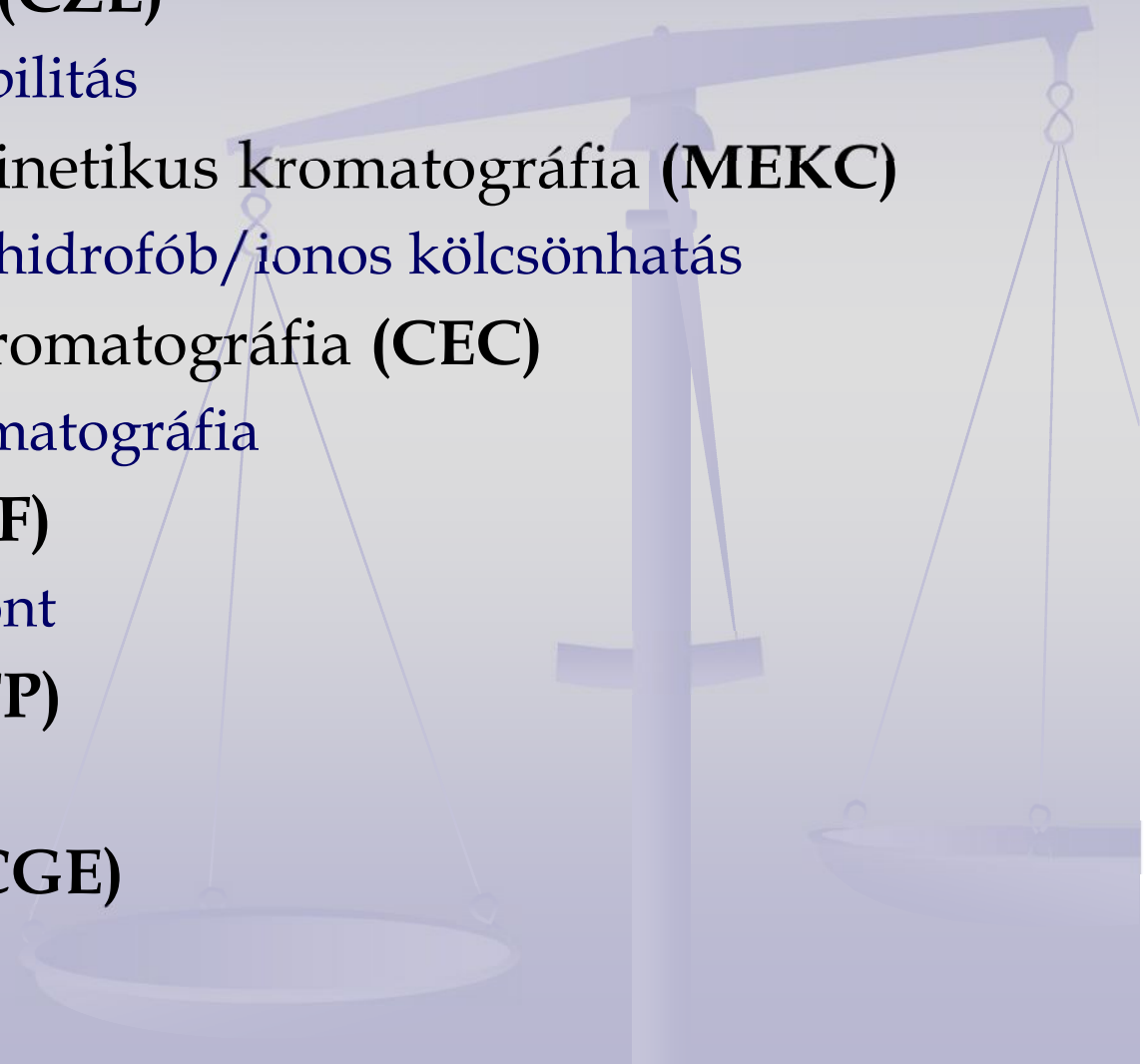
Fig. 41: Diagram of a horizontal graphite blotter for semi dry blotting. Up to six trans units can be blotted at one time (Kyhse-Andersen, 1984).

Kapilláris elektroforézis (CE)

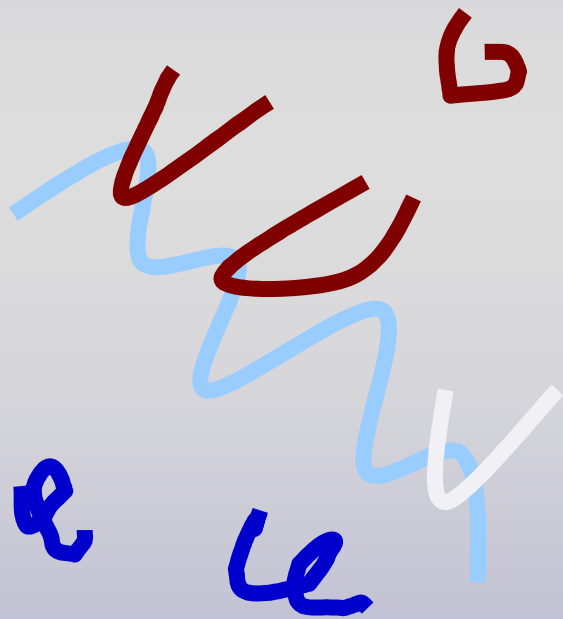


- elektroforetikus közeg kis térfogata (μl) \rightarrow *kisebb Joule-hő*
- Joule-hő hatékonyabb elvezetése \rightarrow *elektromos térerő (E) és a feszültség (V) növelhető*
- az EEO [CE esetében elektroosmotikus áramlás (EOF)] a kapilláris elektroforézis meghatározó komponense

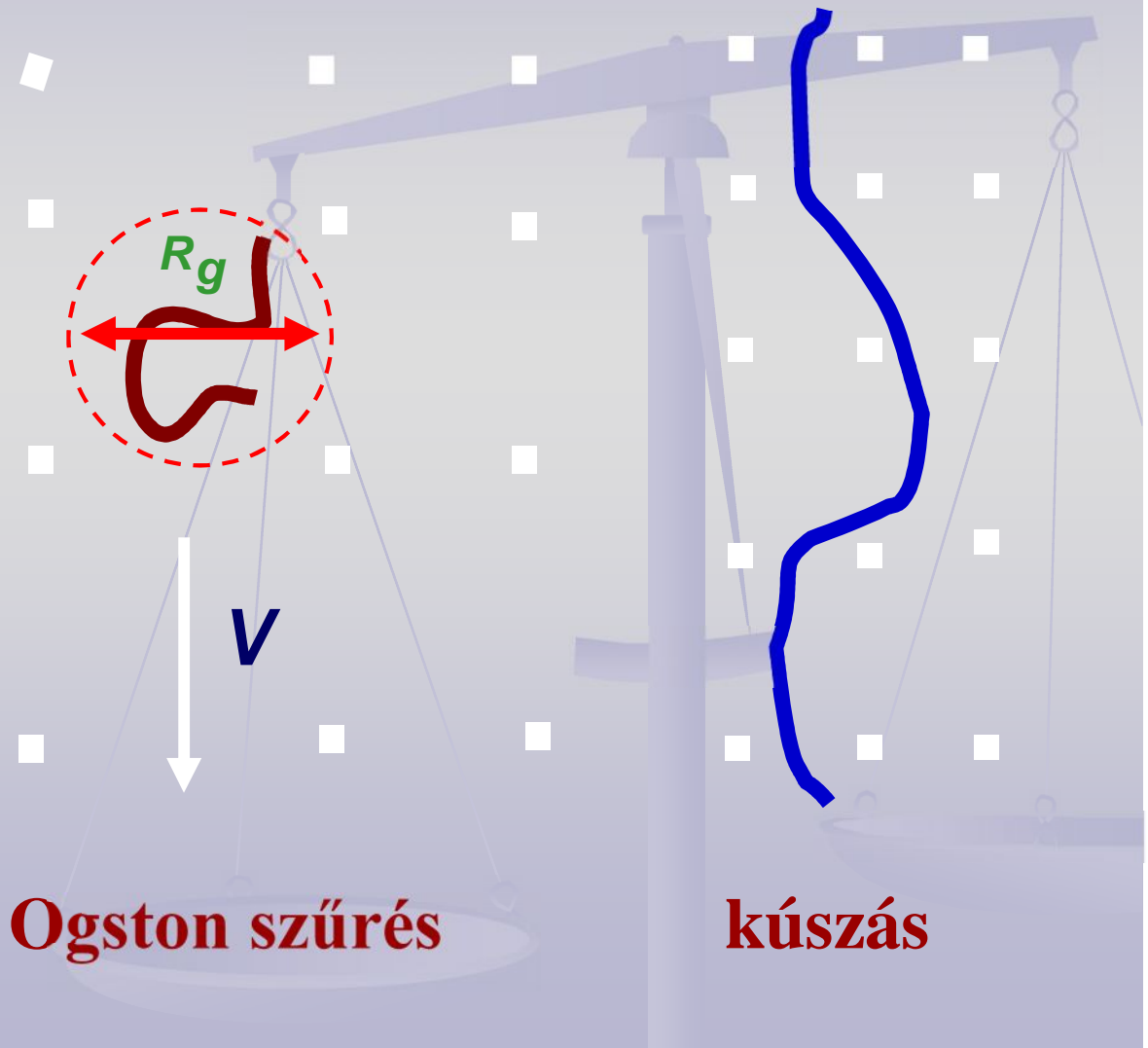
CE - elválasztási technikák

- kapilláris zóna EF (CZE)
 - szabad oldat mobilitás
 - micelláris elektrokinetikus kromatográfia (MEKC)
 - micellákkal való hidrofób/ionos kölcsönhatás
 - kapilláris elektrokromatográfia (CEC)
 - mobil fázisú kromatográfia
 - kapilláris IEF (CIEF)
 - izoelektromos pont
 - kapilláris ITP (CITP)
 - mozgó határok
 - kapilláris gél EF (CGE)
 - méret és töltés
- 

CGE - az elválasztás modelljei



összekuszálódás
(entanglement)

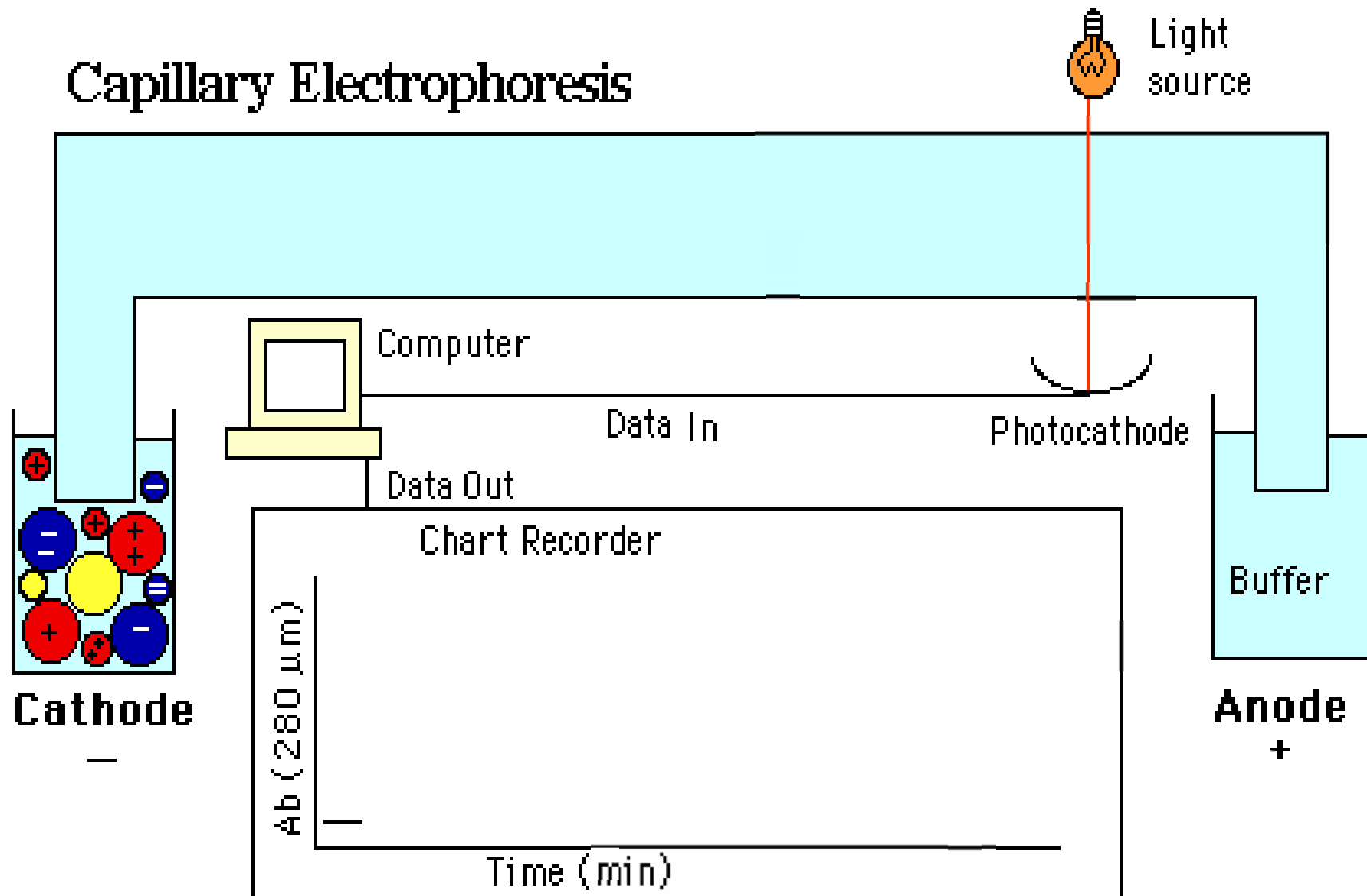


Ogston szűrés

kúszás

... elválasztása kapilláris elektroforézissel ...

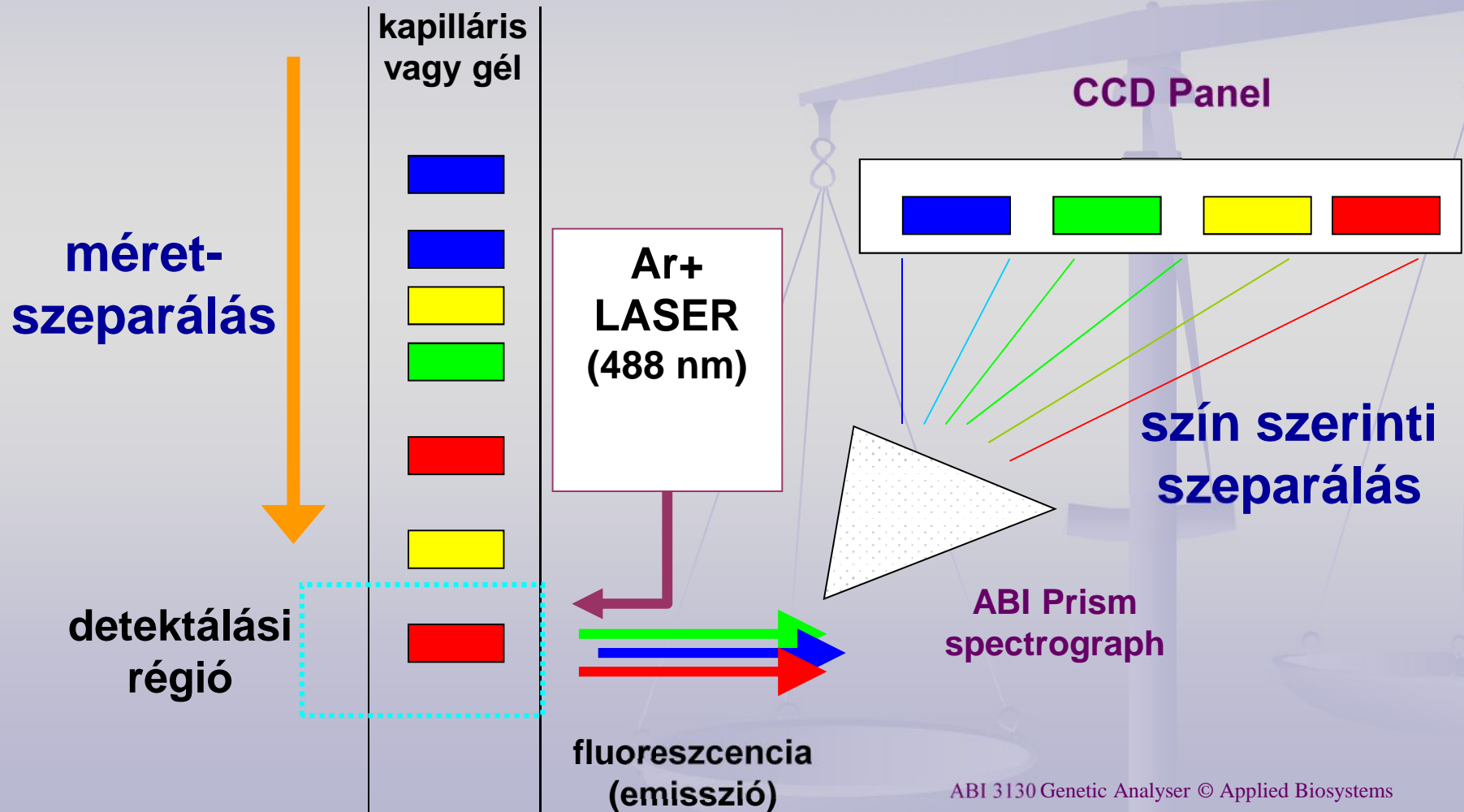
Capillary Electrophoresis



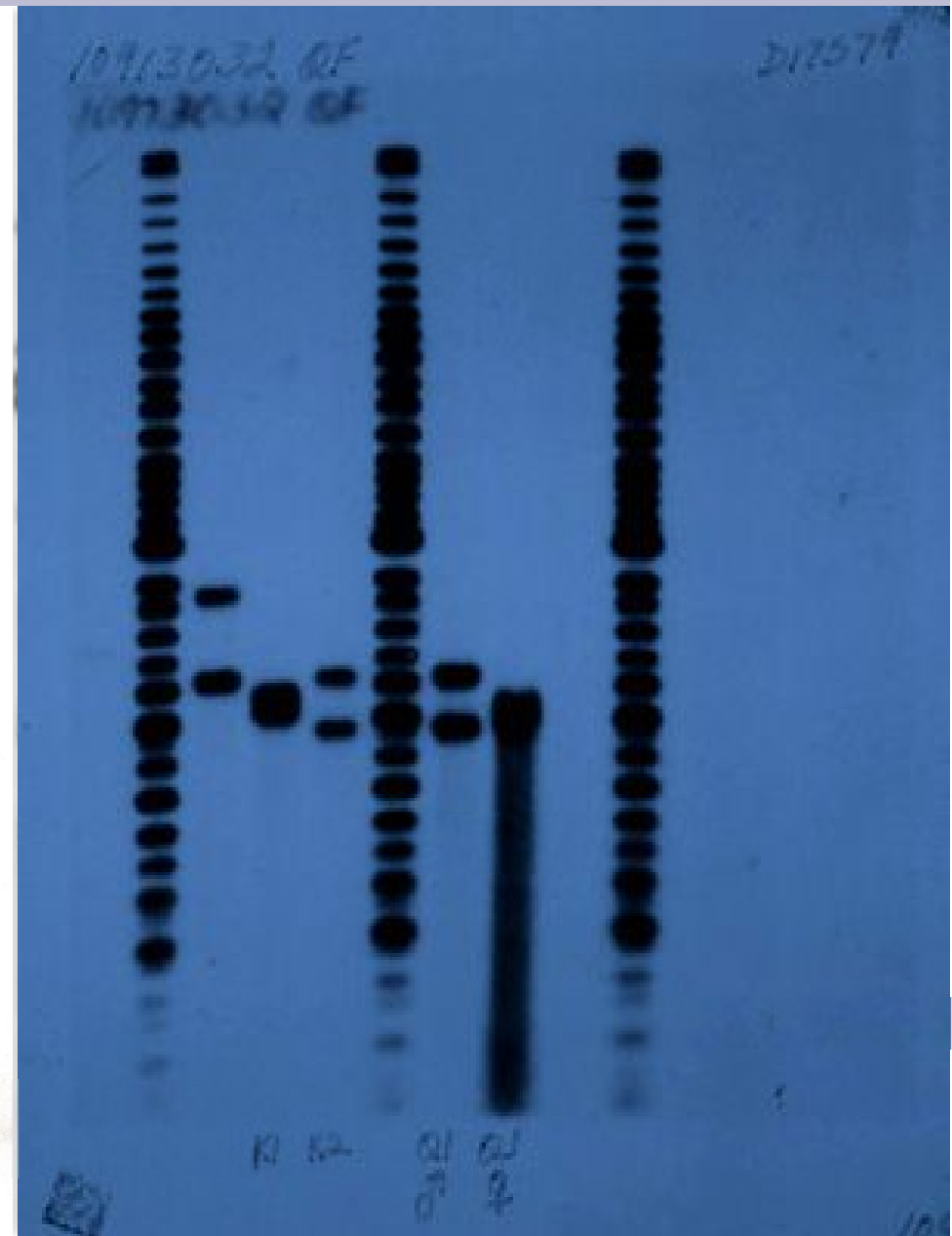
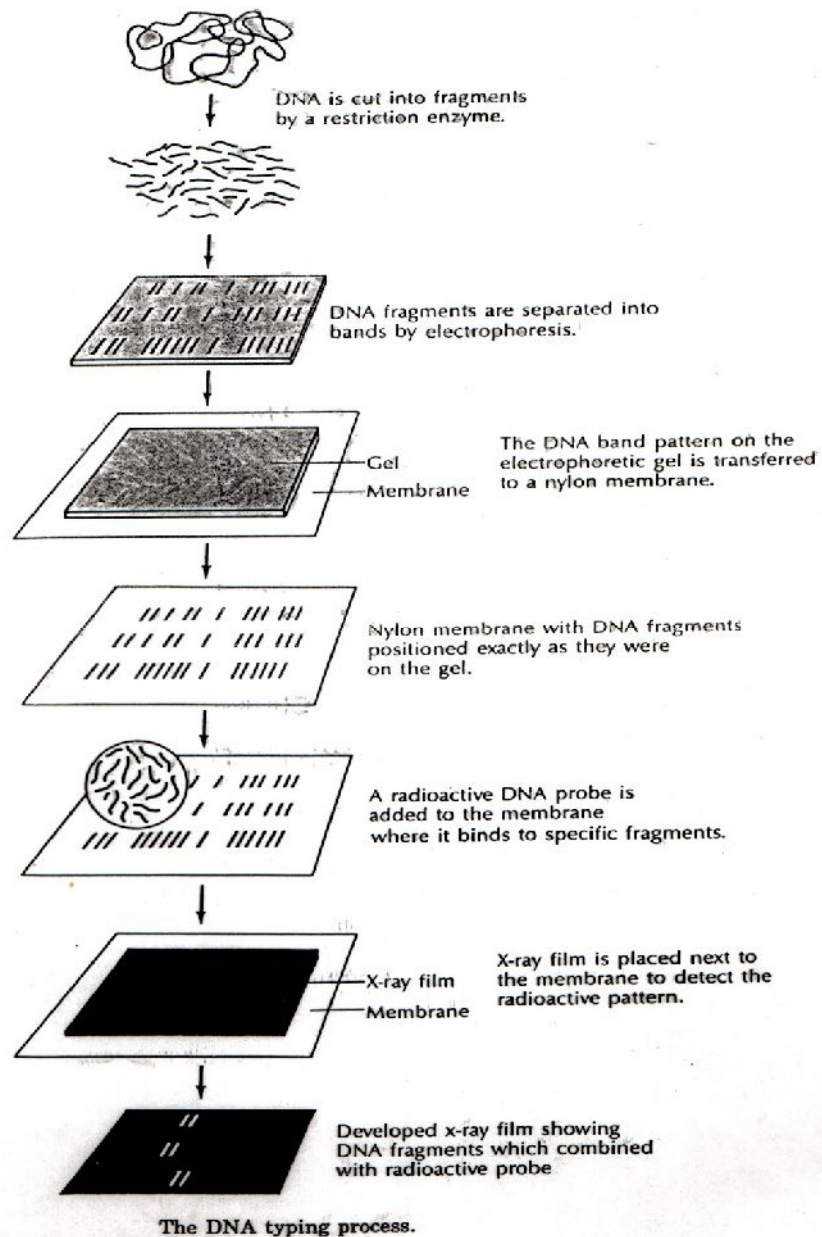
...és fluoreszcens detektálása

jelölt DNA fragmens
(PCR termék)

minta detektálás

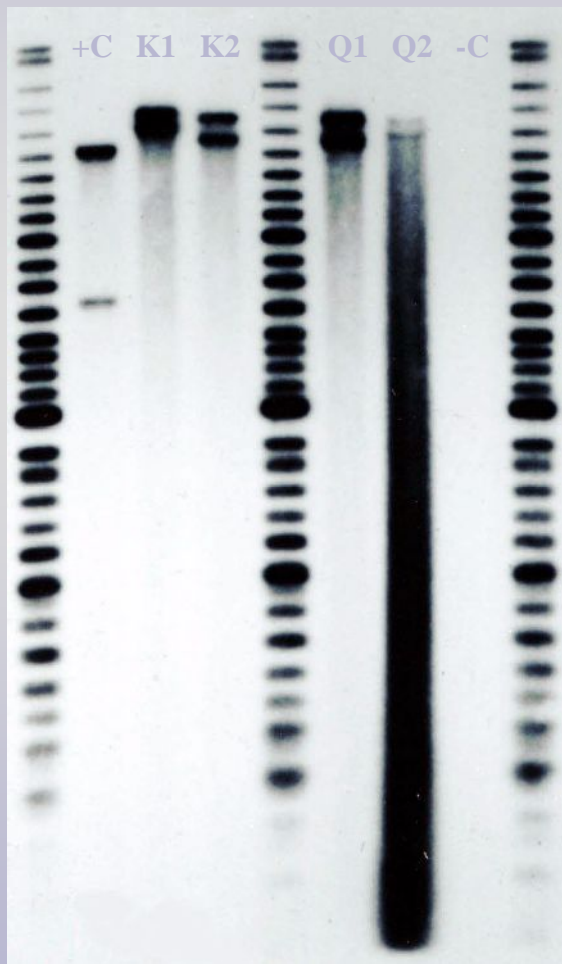


Több genomhely vizsgálata (RFLP)

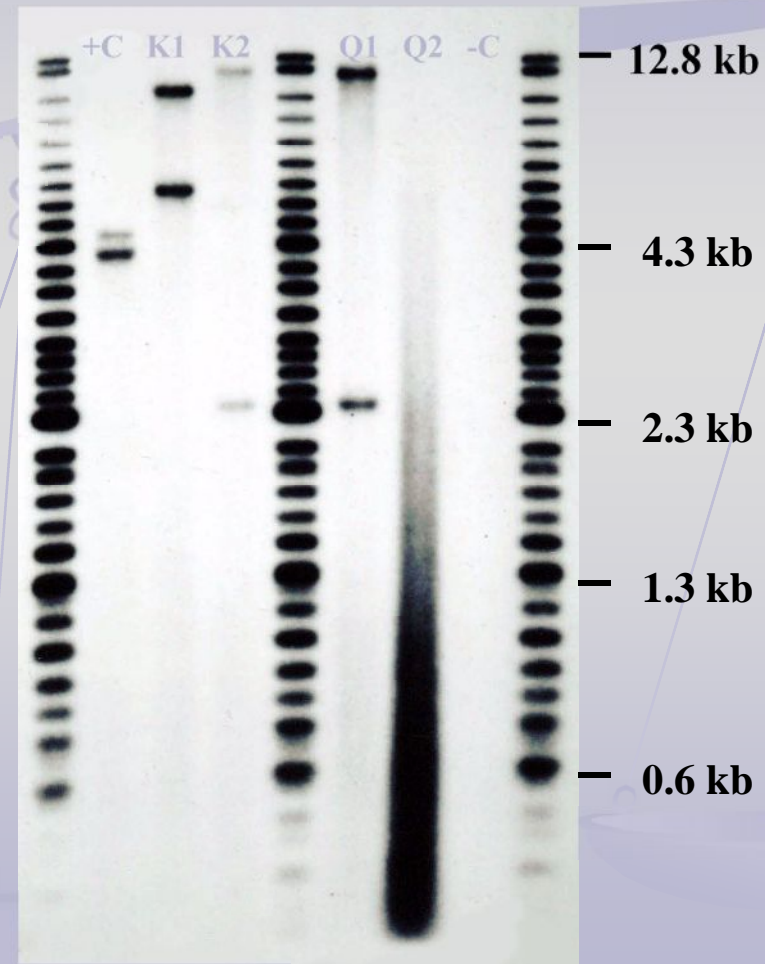


Bűnügyi minták RFLP vizsgálata VNTR próbákkal egy lókuszon

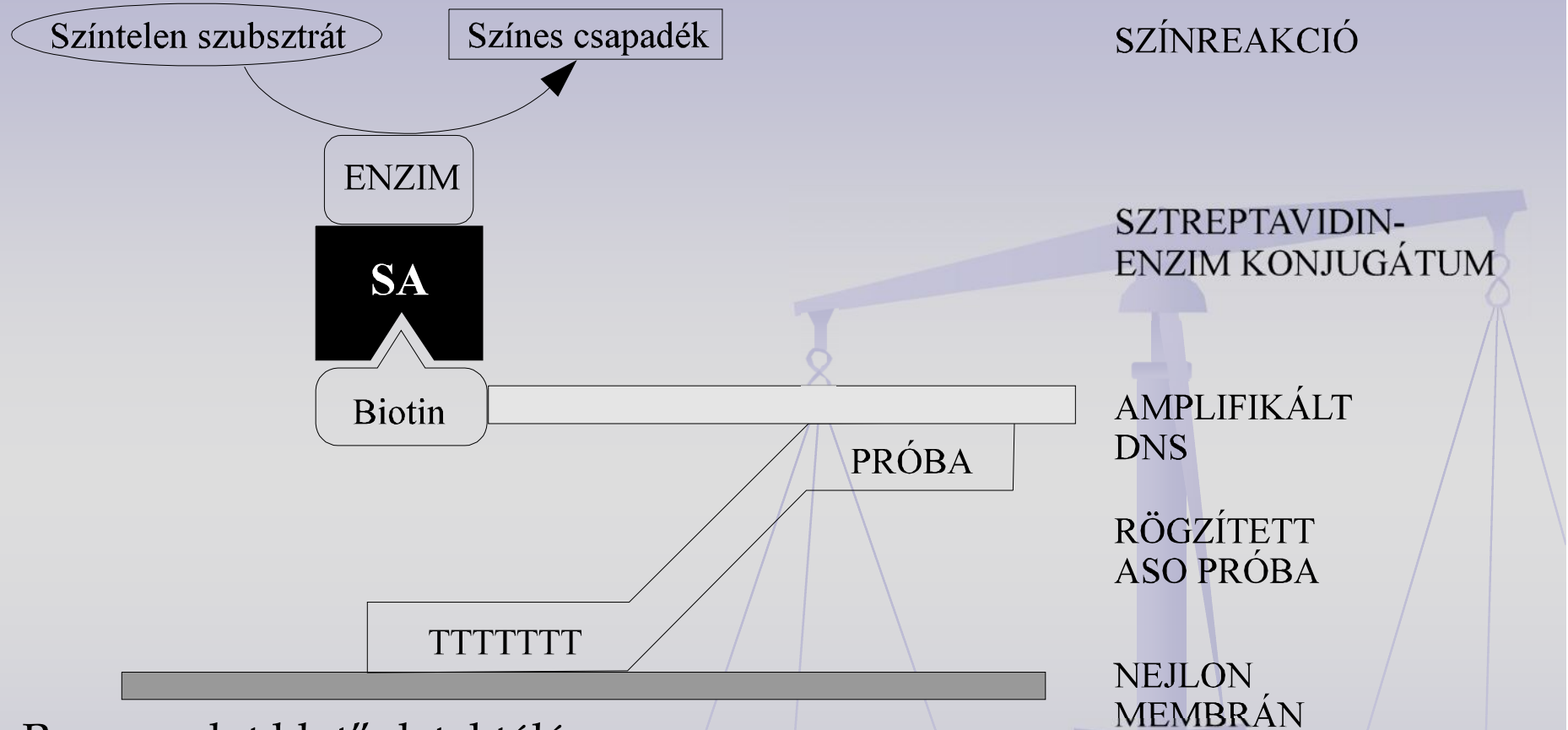
D4S139



D1S7



Szekvencia polimorfizmus (HLADQ α) vizsgálata



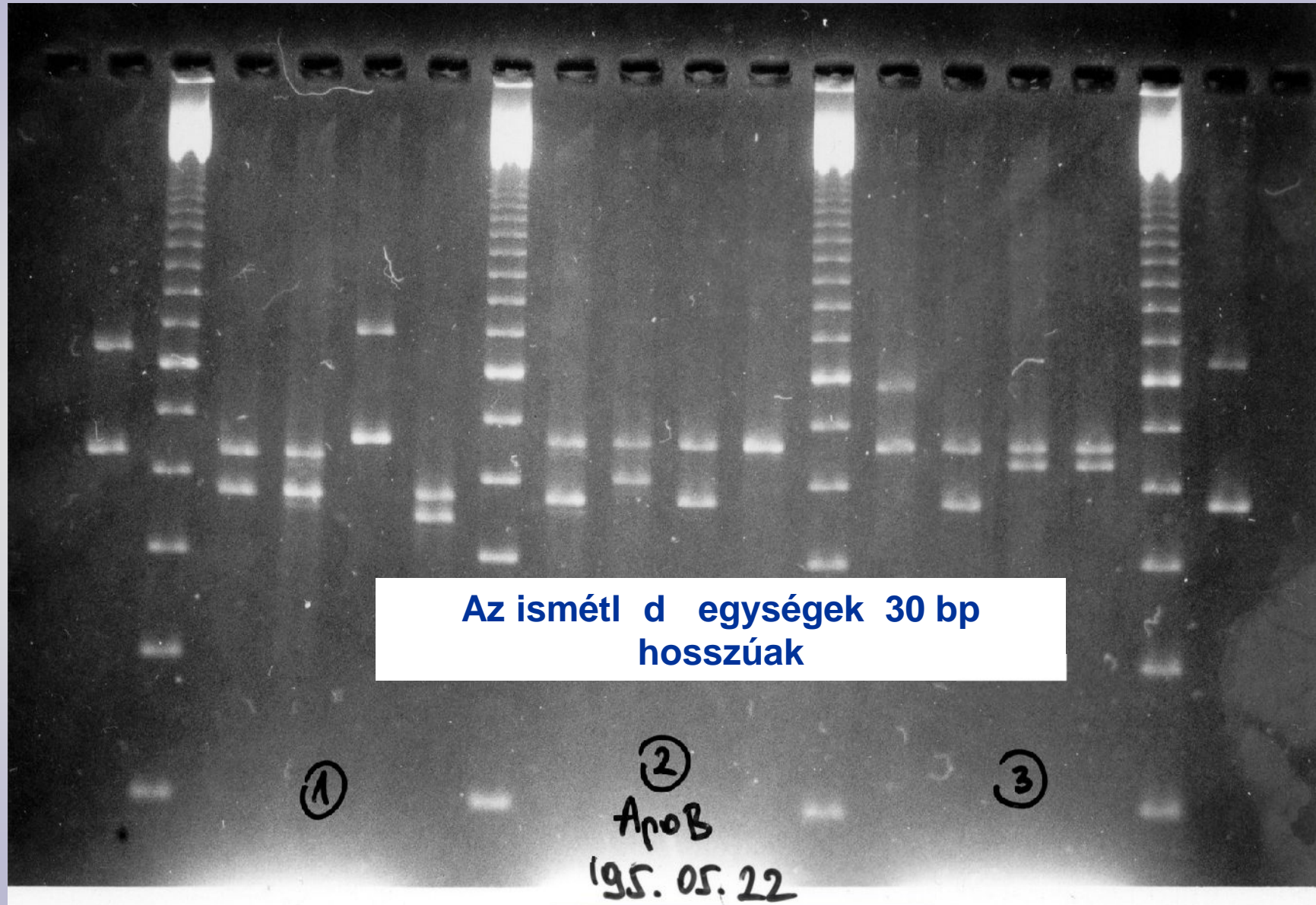
■ Reverz „dot blot” detektálás

- A PCR termék egy részét egy olyan tesztcsíkhöz hibridizáljuk, amelynek különböző területeire az egyes allélokra jellemző, egyszálú DNS „próbákat” (allél specifikus oligonukleotidokat - ASO) korábban rögzítették. A megsokszorozott DNS hibridizáló szála a primereknek köszönhetően biotin-jelölt, amelyhez egy sztreptavidin enzimkonjugátum specifikusan képes kapcsolódni. A megfelelő szubsztrát jelenlétében enzimatiszus színreakció segítségével vizualizálhatók a tesztcsíkon azok a helyek, ahová a mintából származó DNS kötődött.

Szekvencia polimorf lókuszt genotipizálása (Allele Specific Oligonucleotide) hibridizáció

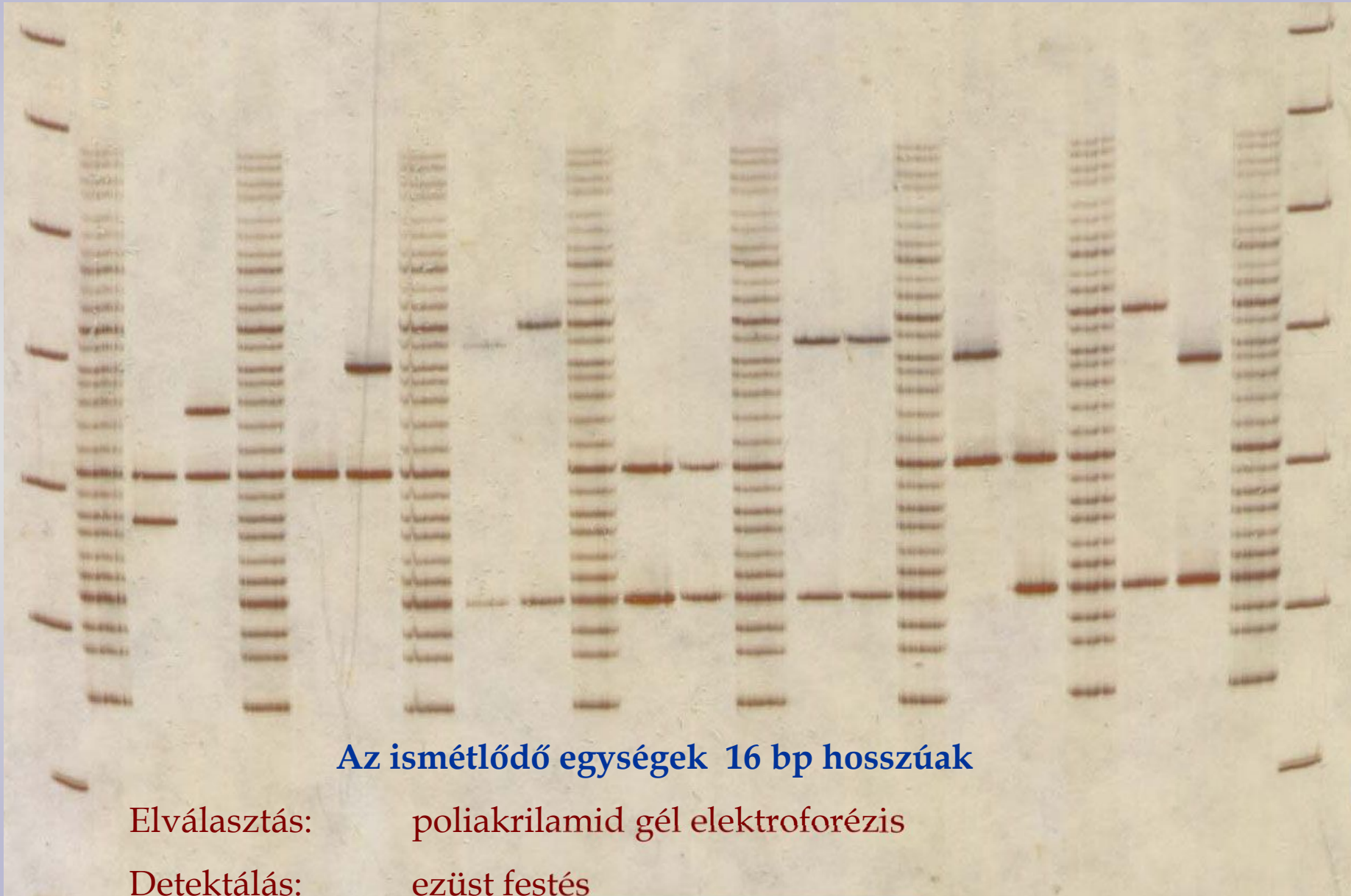
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	V
4.1 / 4.2 v. 4.3												
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	S ₁
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	S ₂
4.1 / 4.1												
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	bial
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	hair
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	+
1	2	3	4	C	1.1	1.2 1.3 4	1.3	All but 1.3	4.1	4.2 4.3	DQA1	-

VNTR lokusz (ApoB3') vizsgálata

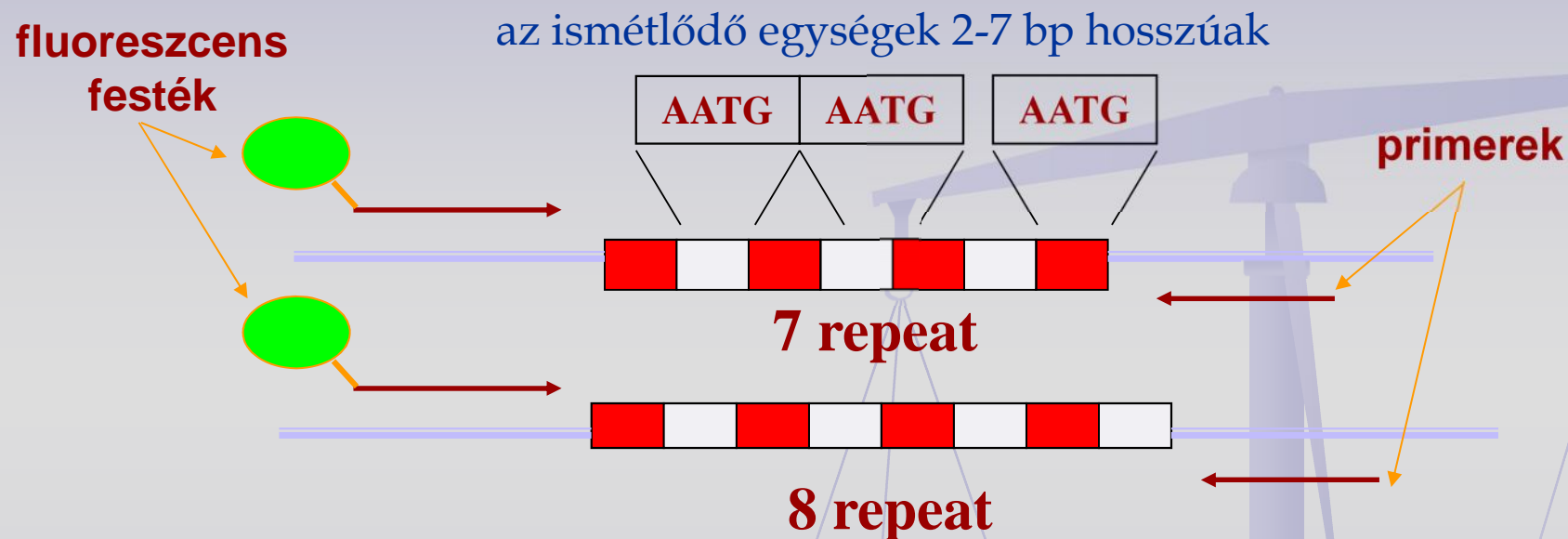


elválasztás: agaróz gél elektroforézis, detektálás: interkalálódó festék (EtBr)

VNTR lokusz (D1S80) vizsgálata



Az STR (Short Tandem Repeat) lokuszok...



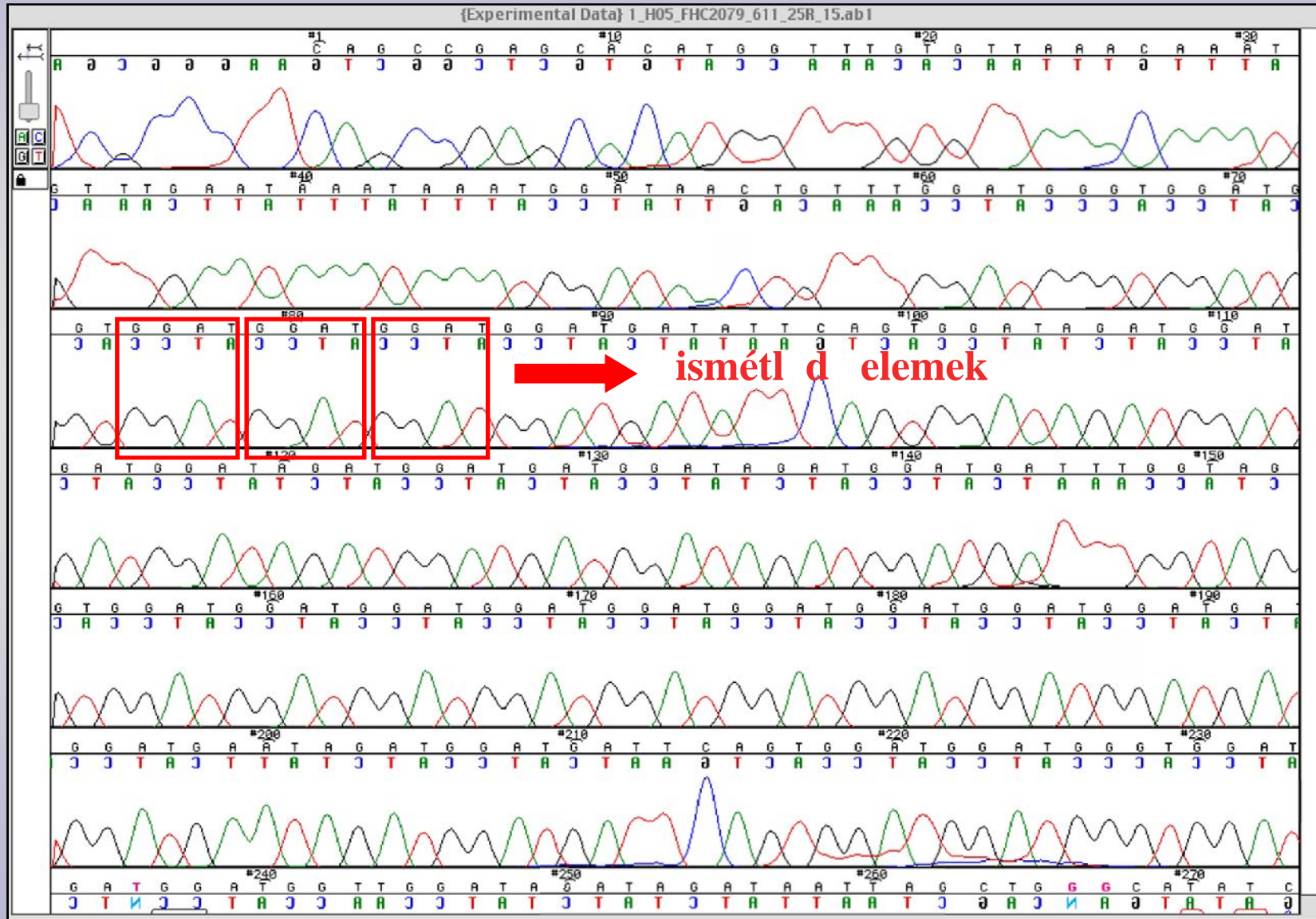
A flanking régió (ahol a PCR primerek kötnek) konstans, a repeat régió variábilis a mintákban

Homozigota = mindkét allél egyforma hosszú

Heterozigota = különböző allélhossz

A primerek pozíciója meghatározza a PCR termék méretét

Short Tandem Repeats (STRs)

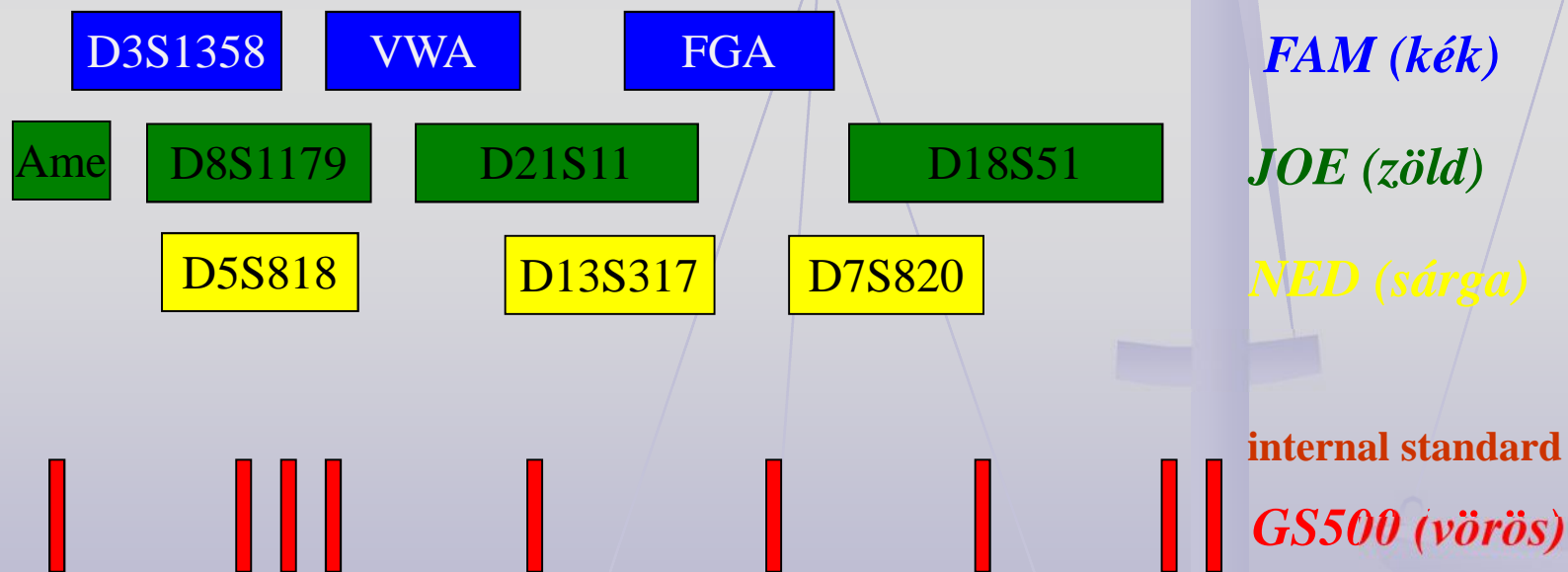


...sokszorozása multiplex kitben...

Szín szerinti elkülönülés

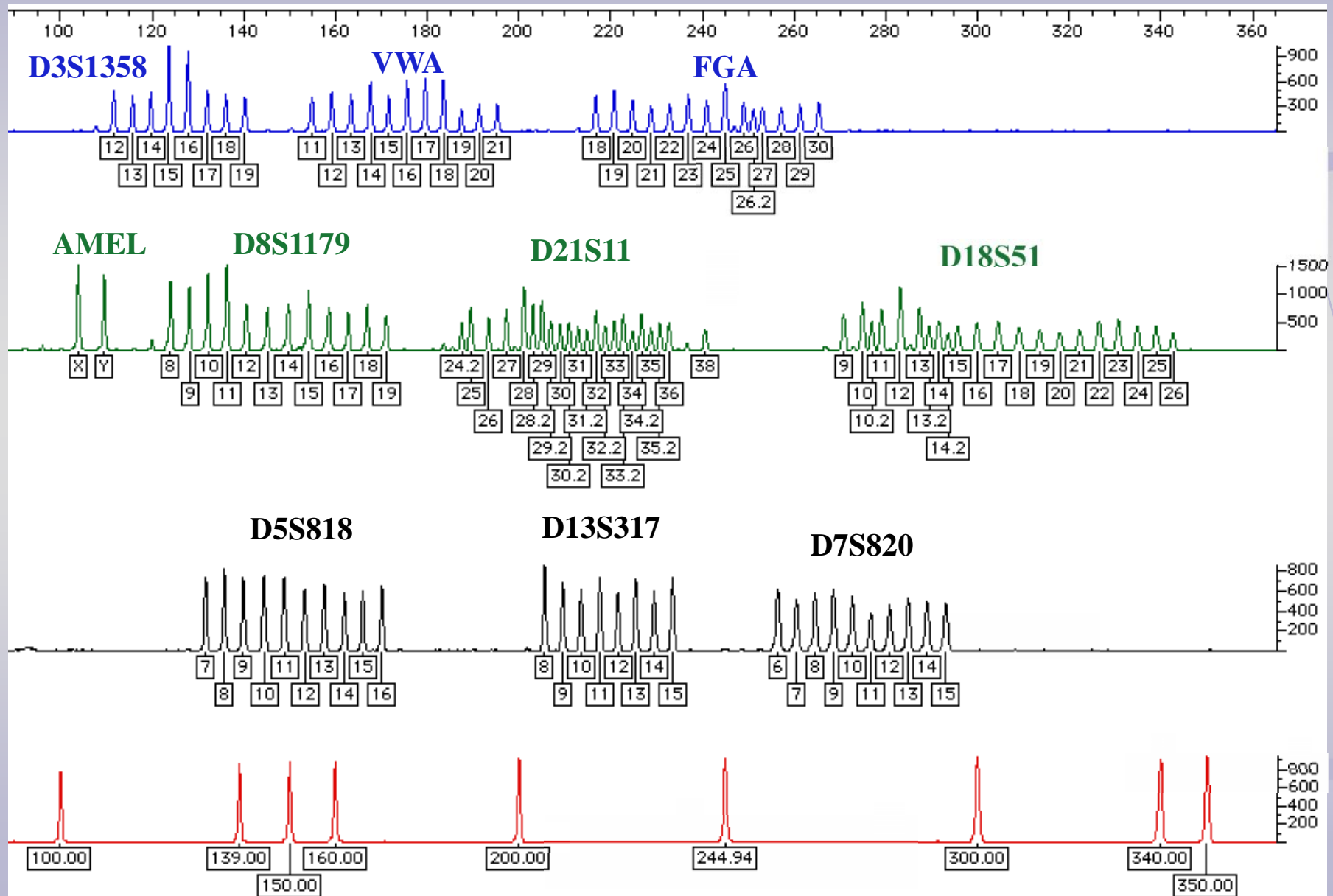


Az ismétlődő egységek 4 bp hosszúak



10 STR amplifikálása egyetlen PCR reakcióban

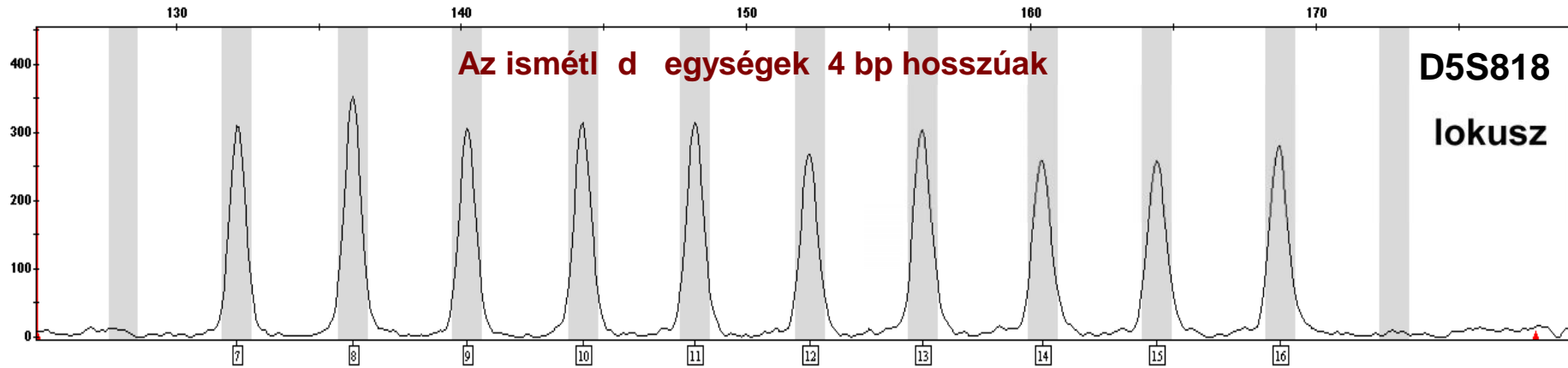
...allélétrája (Profiler Plus kit, Applied Biosystem) ...



STR allél-koktél, az allélok tipizálása

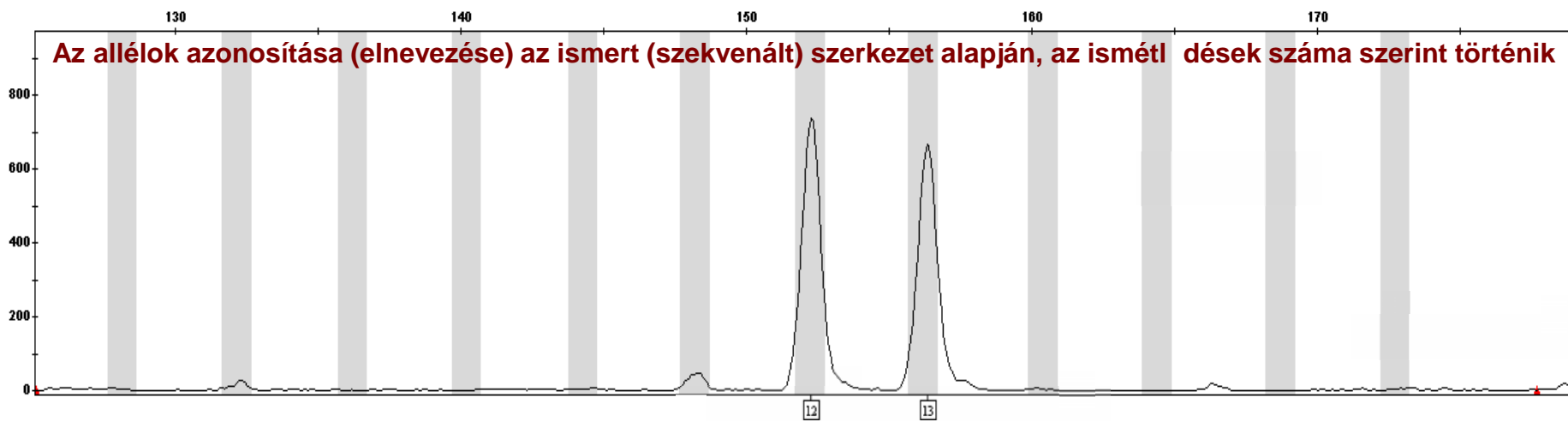
File	Sample Name	Panel	SQ0	SQ
adder__P+.fsa	Ladder__P+	Profiler_Plus_v1		■

D5S818

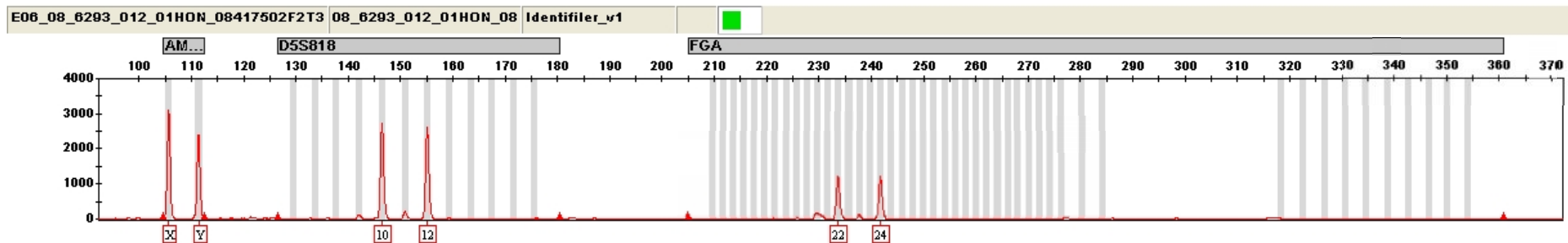
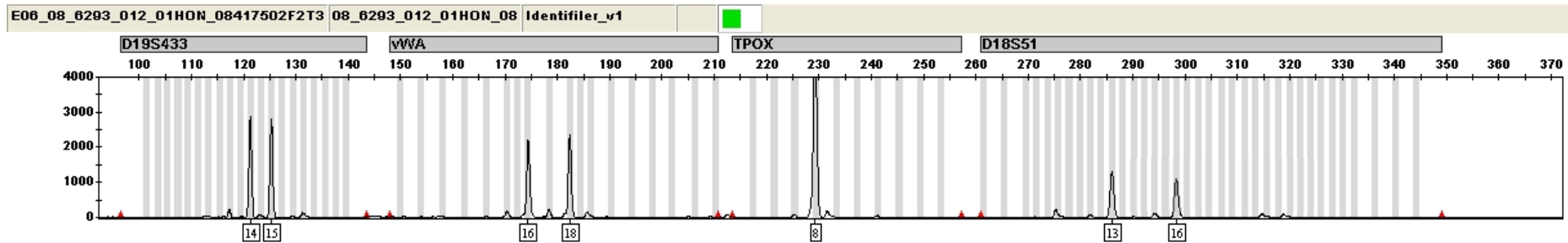
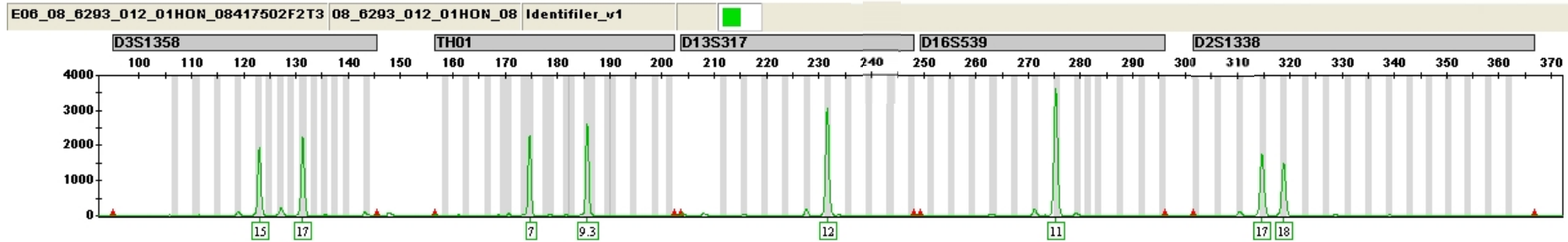
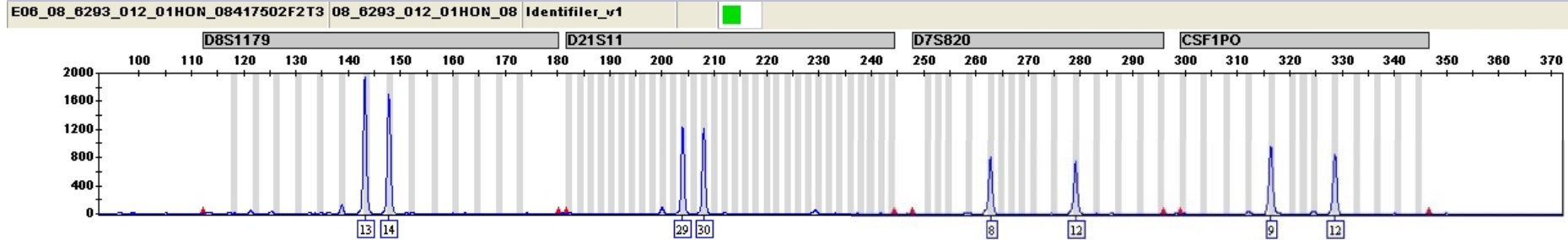


File	Sample Name	Panel	SQ0	SQ
_3086_008_01SKR_07303601FNT1	07_3086_008_01SKR_07	Profiler_Plus_v1		■

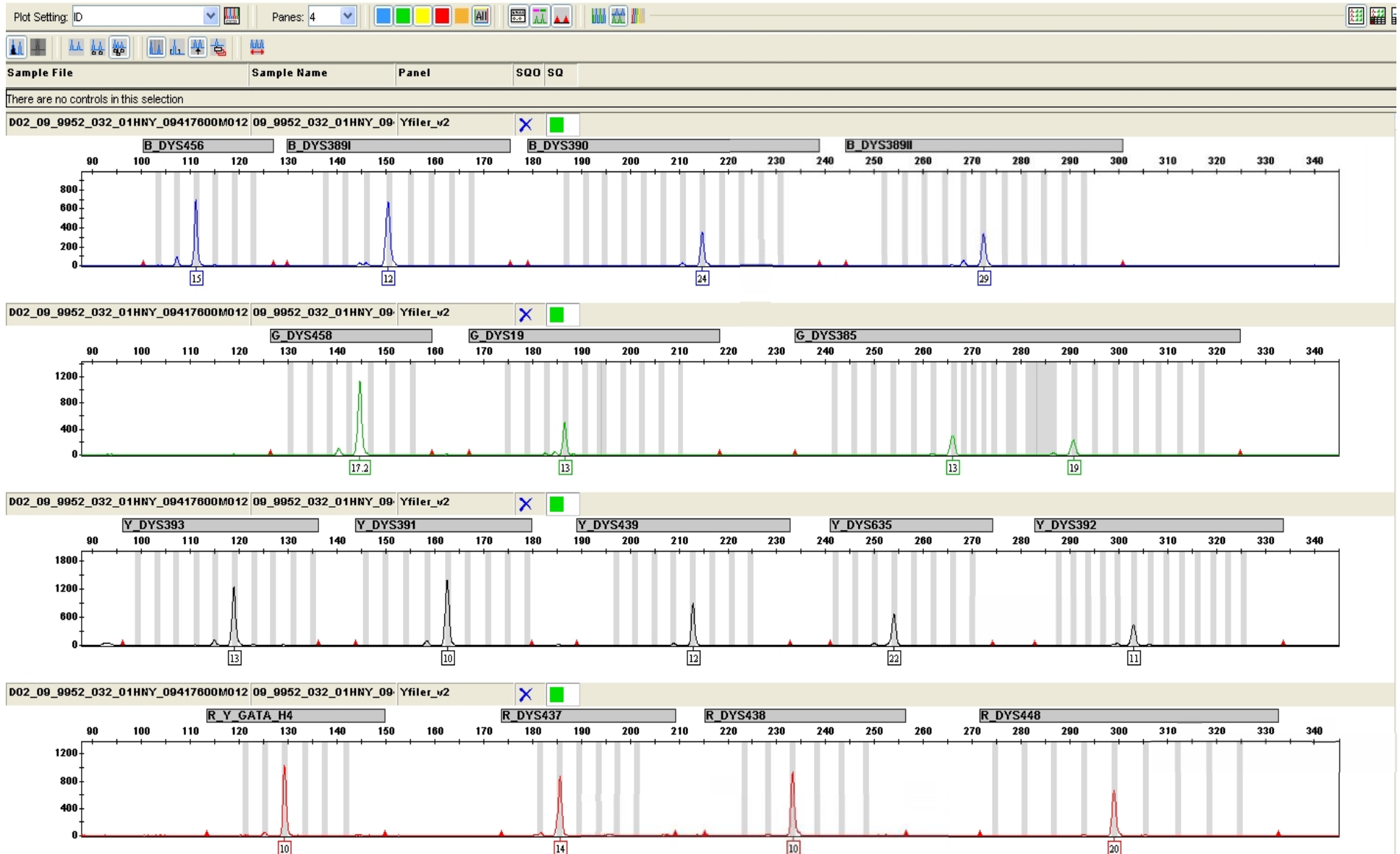
D5S818



15 autoszómás STR lokusz genotipizálása



17 Y-kromoszómás STR lokusz genotipizálása



Degradált minták vizsgálata rövid amplikonokkal

(A)

eredeti PCR primer
→

mini-STR primer
-----→

STR repeat régió

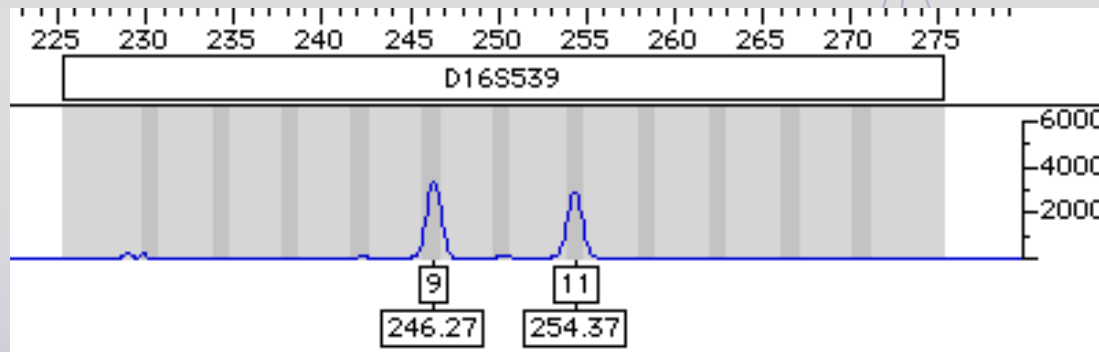
A rövidebb PCR termékek amplifikálási sikeressége nagyobb, így az alacsony kópiaszámú vagy fragmentált (pl. PET) templát esetén az **amplikon rövidítése** célszerű

←-----
mini-STR primer

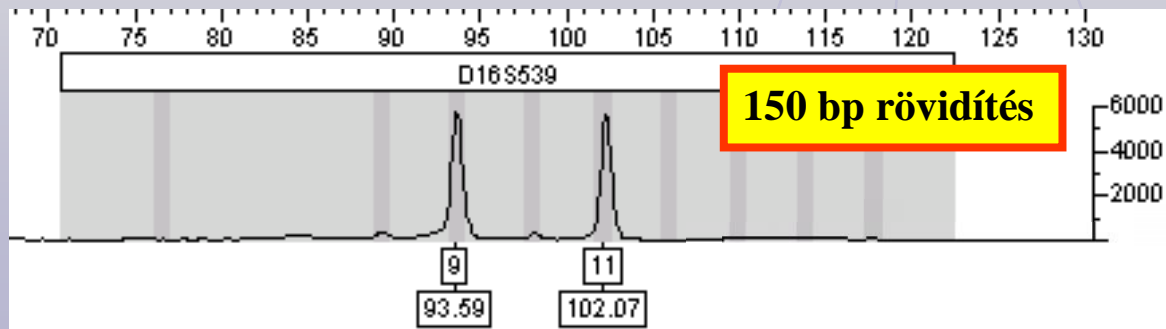
←-----
eredeti PCR primer

(B)

D16S539 lokusz

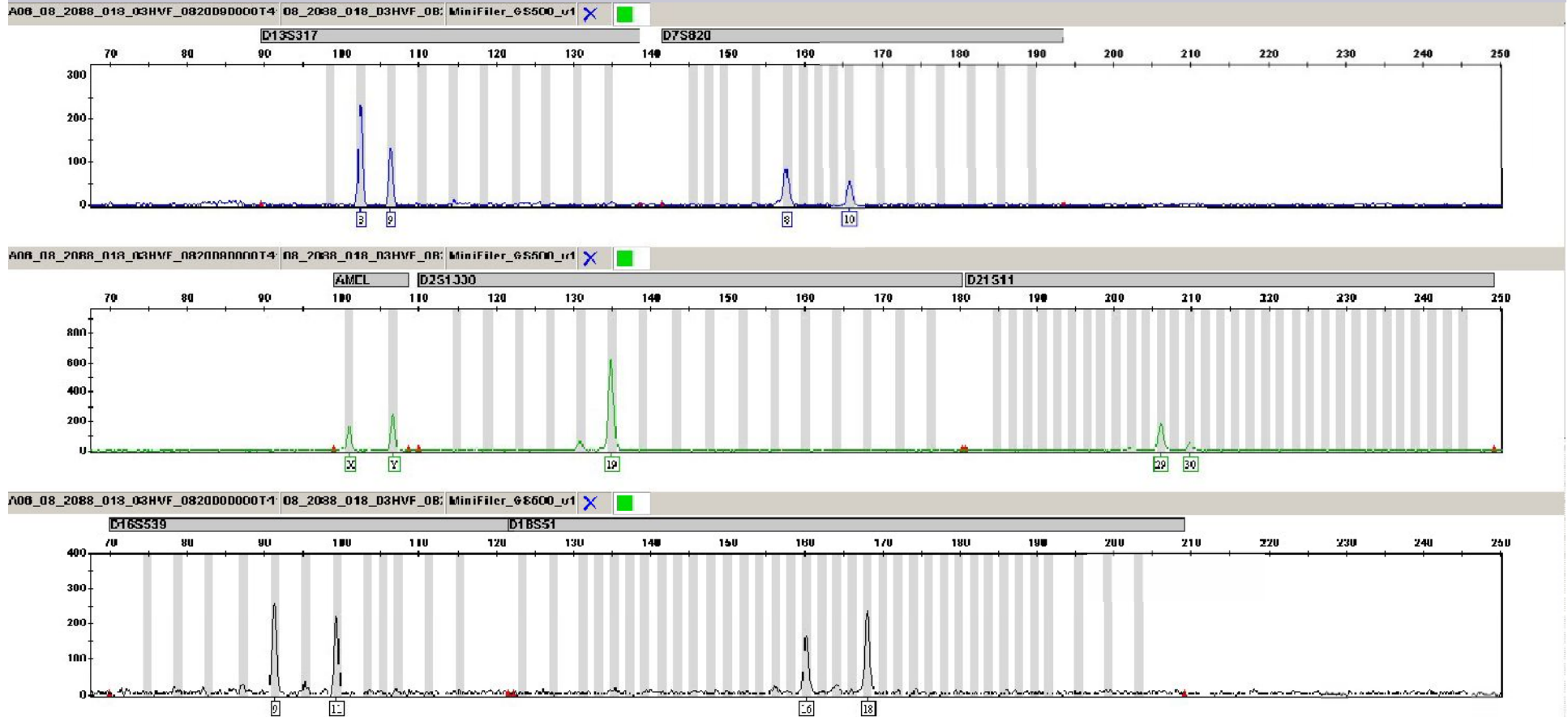


eredeti STR vizsgálat
(COfiler™ kit)



Mini-STR vizsgálórendszer
(Butler *et al.* 2003)

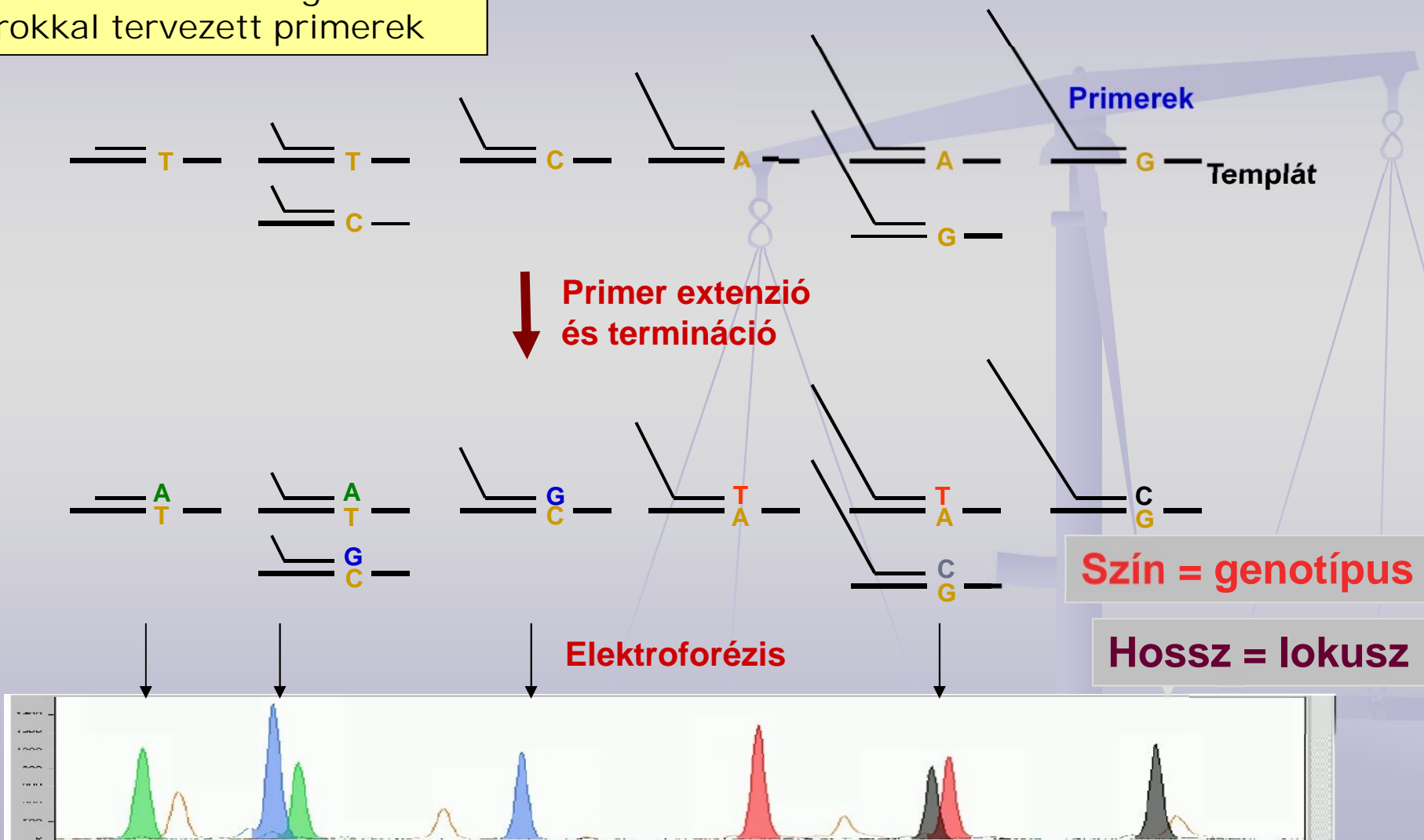
Rövid amplikon multiplex (MiniFiler™ kit, Applied Biosystems)



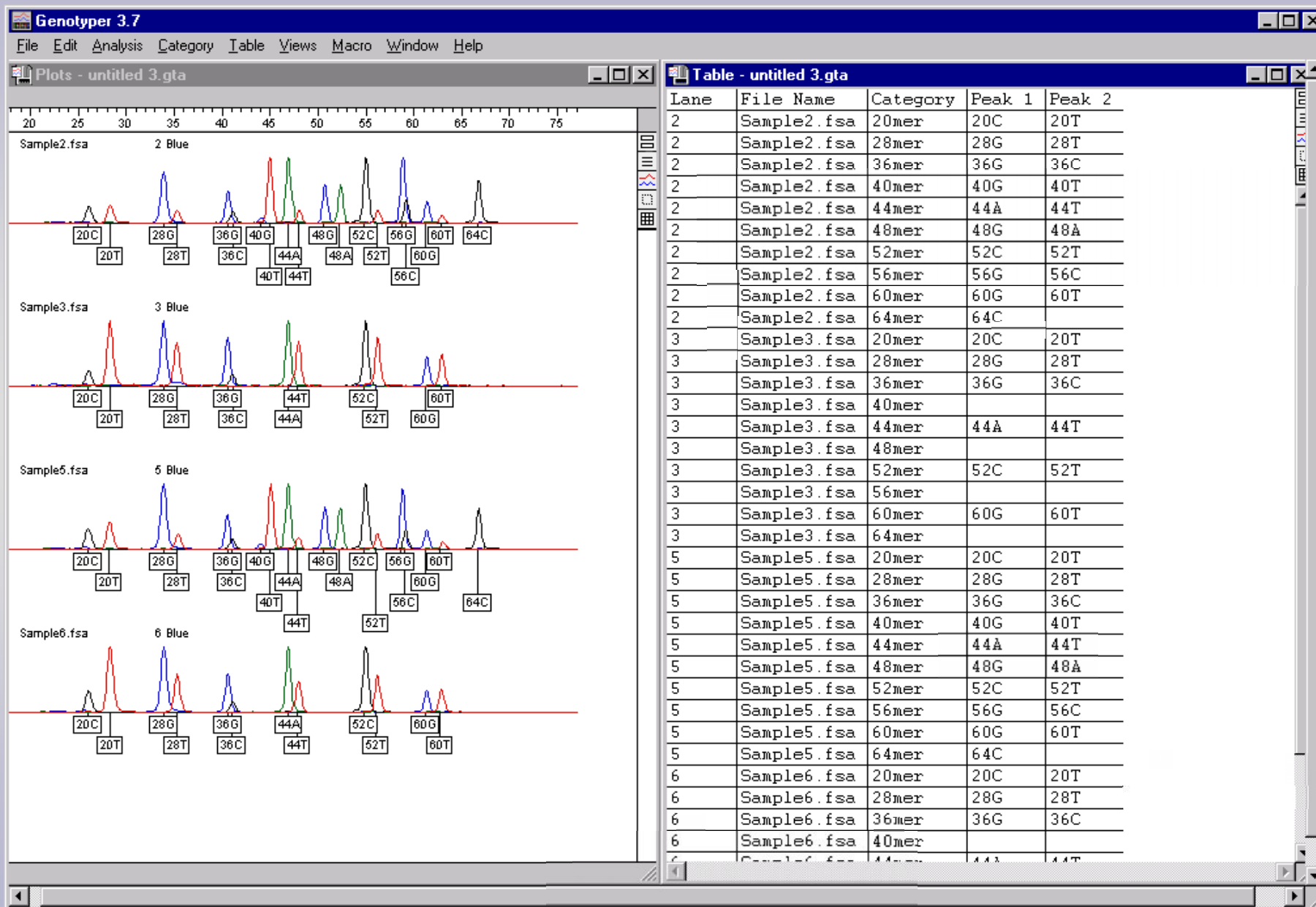
SNP vizsgálat - egy bázis extenzió

(SNaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystem)

Különböz hosszúságú farokkal tervezett primerek

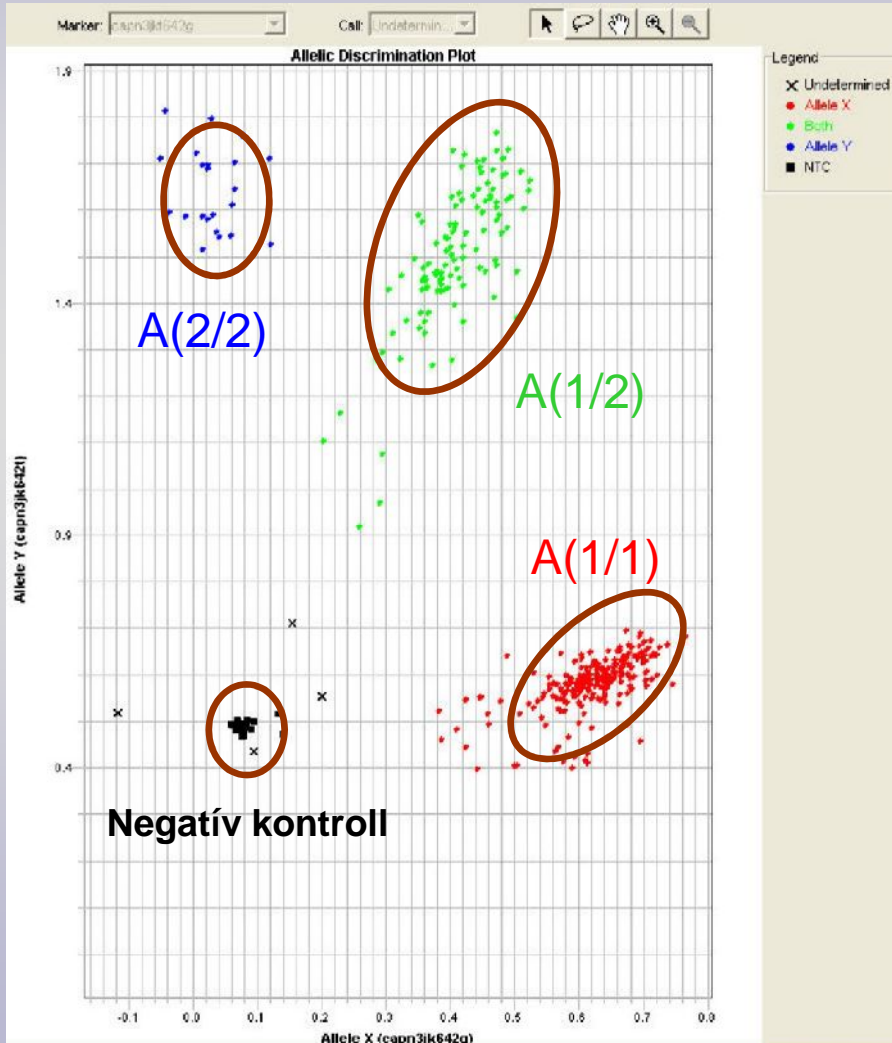


SNP vizsgálat - automatikus analízis



SNP vizsgálat - genotipizálás

(TaqMan®-próba, Applied Biosystems)



- VIC® fluoreszcein emisszió által indikált
 - homozigóta Allél (1)
 - FAM™ fluoreszcein emisszió által indikált
 - homozigóta Allél (2)
 - mindkét fluoreszcein emisszió által indikált
 - heterozigóta Allél (1/2)
- genotípusok

A D-loop szekvencia - az anyai leszármazási vonal azonosításának igazságügyi eszköze

- a vizsgált minták mtDNS szekvenciáját a referenciaként használt CRS-hoz illesztjük (pl. 16071-16140)

	16090	16100	16110	16120	16130	16140
rCRS	ACCGCTATGT	ATTCGGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAAT
Q	ACCGCTATGT	ATTCGGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAAT
R	ACCGCTATGT	ATTCGGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAAT

16093

16129

a referencia szekvenciától való eltérések pozíciója és nukleotidja megadja az adott minta mtDNS haplotípusát

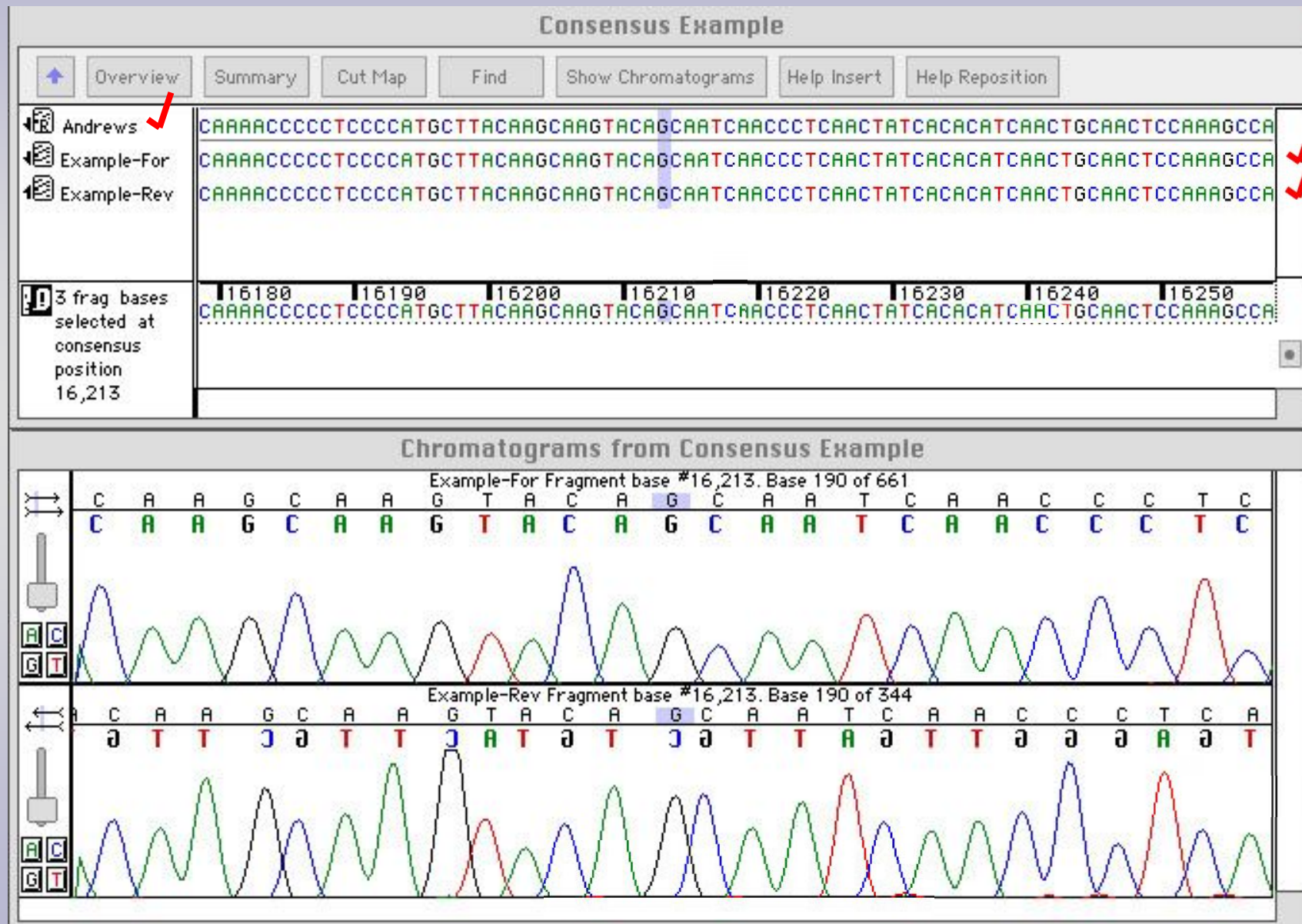
**Bizonyíték
(Q)**

16093C
16129A

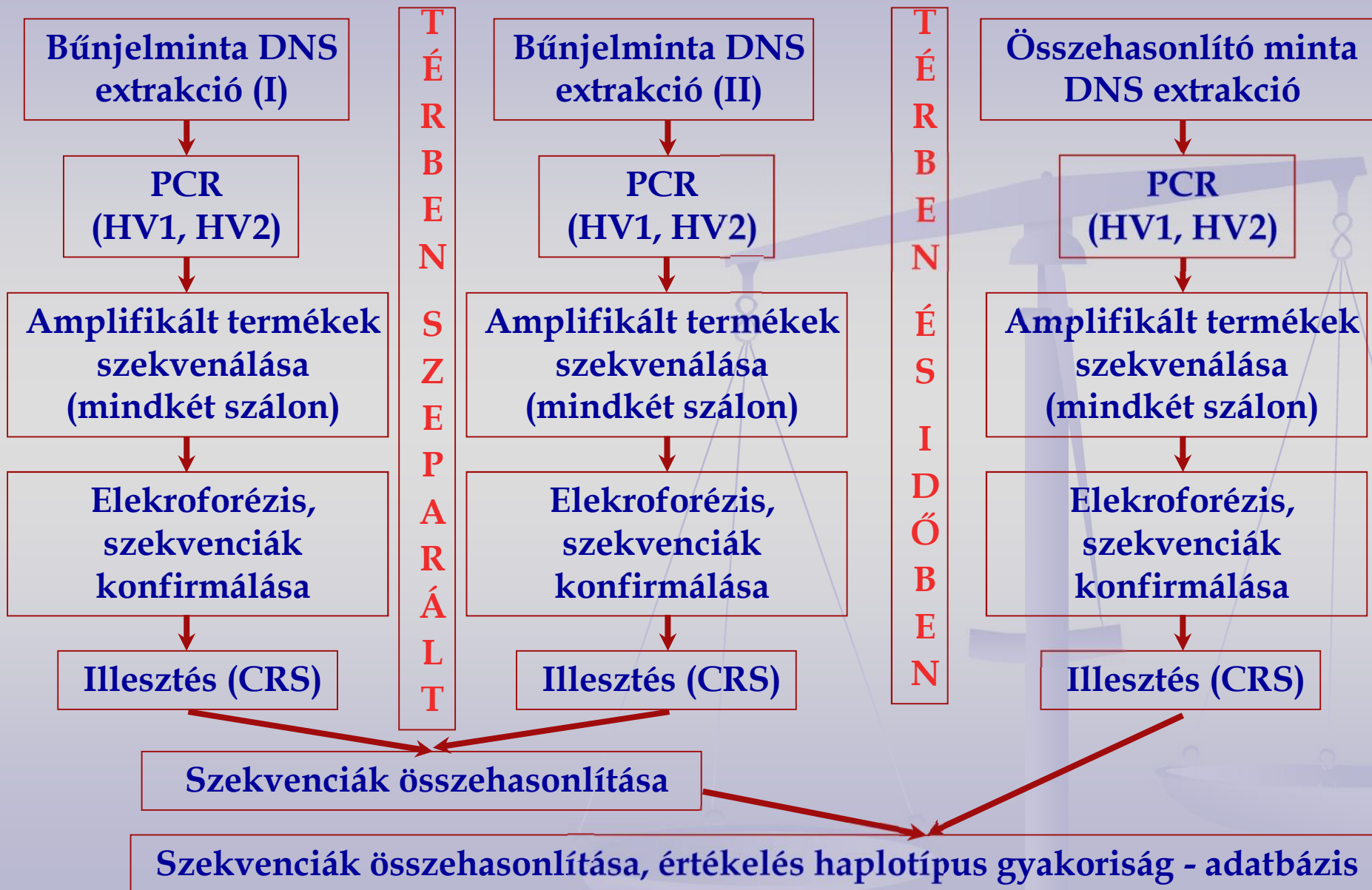
**Összehasonlító
(R)**

16093C
16129A

Konszenzus szekvencia - nincs eltérés



A mtDNS vizsgálat menete



A haplotípusok (a referencia szekvenciától való összesített eltérések) kiértékelése

CRS referencia szekvencia



A citokróm(b) szekvencia a fajazonosítás igazságügyi eszköze

4 sp cytb

Canine/cytb/... #1 aaca tctcttcttgatgaaacttoggatcccttac taggag ta tgettgatctacagat tctaacagggttattctttagctatgcaacta
Capreolus cy... #1 aaca tctcttcttgatgaaacttogggtctctctcttaggcactgcttaacttgcaaa tctaacagggctgtctcttagcaatcactta
Cervus elaph... #1 aatatttca tcc tga tga aatttoggctcaattac taggag tctgtctaa tctctcaaaa tctctaacagggctattctcttagcga tcaacta
Human/cytb/c... #1 aaca tctcttcttgatgaaacttoggctcaactctctggcgctgcttga tctctcaaaa tcaaacaggga ctattctcttagcga tgaacta
#1 aaca tctcttcttgatgaaacttoggctctmytctcttaggmgtctgctctra tctctcaaaa tctctaacagggctattctcttagcga tgaacta
Canine/cytb... #90 taca tgggacacagccacagcttttctca tca g tca cccca c a t e t g c c g g a c g t t a a c t a e g g e t g a a t t a t e e g e t a t a t g c a e g c a a
Capreolus c... #90 caca tca g a c a c a a a c a c a g e t t t e t e a t c a g t t a c a c a c a t t t g t g a g a c g t a a a t t a e g g a t g a g t t a t t e g e t a t e t a c a t g e a a
Cervus elap... #90 taca tctga taca a t a a c a g e a t t e t e c t e t g t e a c c e a t a t e t g t e g a g a t g t e a a t t a t g g e t g a a t t a t t e g a t a t a t a c a e g c a a
Human/cytb/... #90 c t e a c c a g a c g c c t e a a c e g e c t t t t e a t c a a t e g c e c c a c a t e a c t e g a g a c g t a a a t t a t g g e t g a a t c a t e e g e t a e c t t e a e g c a a
#90 yaca tca g a c a c a a a c a c a g e t t t y t e a t c a g t e a c c c a c a t e t g t e g a g a c g t a a a t t a y g g e t g a a t t a t y e g e t a t m t a c a e g c a a
Canine/cyt... #179 a t g g e g e t t e c a t a t t e t t t a t e t g e e t a t t e e t a c a t g t a g g a e g a g g e e t a t a t t a e g g a t e e t a t g : t a t t e a t : a g a a c a t g a a
Capreolus ... #179 a e g g a g e a t c c a t a t t e t t t a t t t g e e t a t t e a t c c a e g t a g g e e g a g g t e t a t a e t a e g g a t e c t a t a : t a t t e e t : a g a a c a t g a a
Cervus ela... #179 a e g g g g c a t c a a t a t t t t t e a t e t g t e t a t t e a t a c a t g t a g g g e g a g g e e t g t a c t a e g g a t e a t a t a e t t t t e : t : a g a g a c a t g a a
Human/cytb... #179 a t g g e g e e t e a a t a t t e t t t a t e t g e e t e t t e e t a c a e a t e g g g e g a g g e e t a t a t t a e g g a t e a t t t e : t e t a e : t e a g a a a c e t g a a
#179 a y g g e g e a t e m a t a t t e t t t a t e t g e e t a t t e m t a c a y g t a g g g e g a g g e e t a t a y t a e g g a t e m t a t a : t a t t e : t : a g a a c a t g a a
14747 → 15886 pozíció (1140 bázispár)

PCR: 358 bp hosszú szakasz, fajok közti átlagos eltérés kb. 15-20%

Page #1

Canine/cyt... #268 aca t t g g : a a t g t a c t a t t a t t e g e a a c c a t a g e c c a c a g e a t t e a t g g g e t a t g t a c t a c c a t g a g g a c a a a t a t c a t t e t g a
Capreolus ... #268 aca t t g g : a g t a g t e c t a e t a t t t a e e g t t a t a g e a a e a g e c t t e a t a g g e t a e g t e e t g e e e t g a g g a c a a a t a t c a t t e t g a
Cervus ela... #268 aca t g g g : a g t a g t t e t t e t a t t t a c a g t t a t a g e c c a c a g e a t t e g t a g g a t a t g t e e t a c c a t g a g g a c a a a t a t c a t t e t g a
Human/cytb... #268 aca t e g g e a t t a : t e e t e e t g e t t g e a a c t a t a g e a a e a g e c t t e a t a g g e t a t g t e e t c e e g t g a g g a c a a a t a t c a t t e t g a
#268 aca t y g g : a g t a g t e c t a e t a t t t r e a r y t a t a g e m a c a g e m t t e a t a g g e t a t g t e e t a c c a t g a g g a c a a a t a t c a t t e t g a

A kutya, az z, a szarvas és az ember Cyt(b) szekvenciájának illesztése

Degradált minták mtDNS vizsgálata rövid amplikonokkal

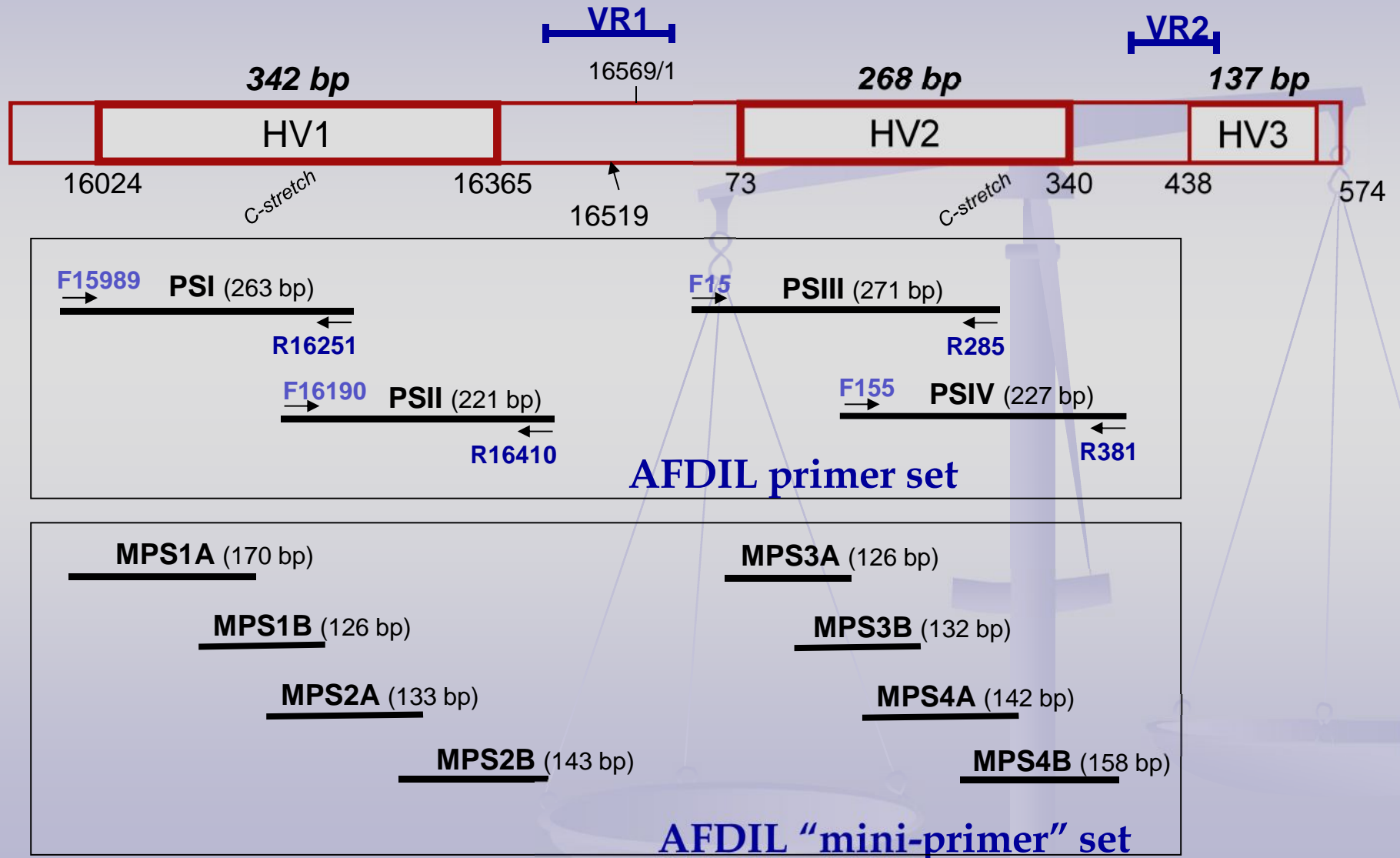


Figure 10.3, J.M. Butler (2005) Forensic DNA Typing, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

Sok ? ... vagy kevés ?!

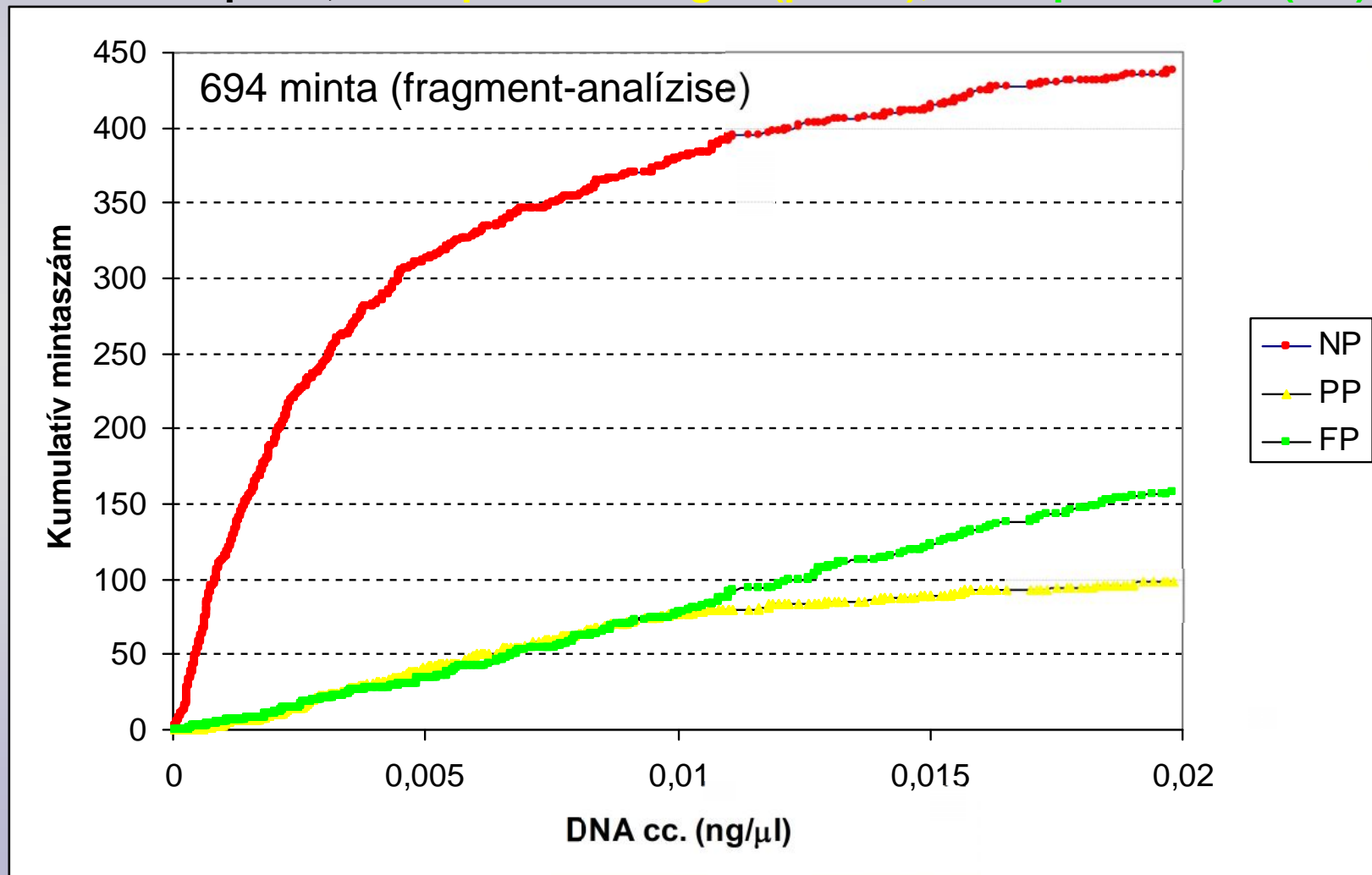


Menyi az elég ?

- a teljes DNS minta mennyiségének felszaporítása szükséges lehet
 - korlátozott (kevés) mennyiségű minta gyakori előfordulása esetén
 - a klinikai diagnosztika, rákkutatás
 - a preimplantációs genetika
 - a embriológia
 - a infektológia
 - a patológia
 - az igazságügyi genetika területein
 - a kis mennyiségű minták vizsgálati korlátainak
 - a különböző vizsgálatok eltérő templát igényének
 - a nagy számú vizsgálat végzés igényének
 - extrém mintáknak köszönhetően
 - megvalósítható teljes genom amplifikációs (WGA) eljárásokkal
 - kiegyensúlyozott, torzulásmentes, az eredetitől „megkülönböztethetetlen”, originális szekvencia reprezentáns

Alacsony kópiaszámú eseti minták templát mennyisége és genetikai profiljának meghatározása ($0 < \text{DNS cc.} < 0,02$)

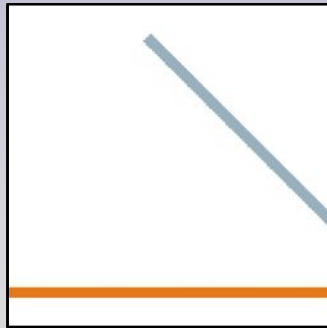
NP: nincs profil, **PP:** a profil részleges (partial), **FP:** a profil teljes (full)



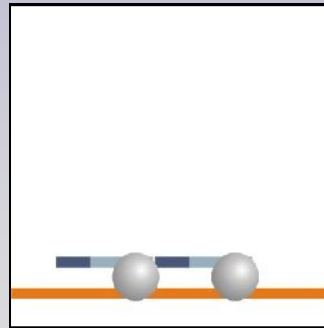
Teljes genom amplifikáció (WGA)

- **PEP (Primer Extension PCR)**
 - Taq polimeráz, 15 bp random primer, kevésbé szigorú annealing, < 3 kb
- **DOP-PCR (semi-Degenerate Oligonucleotide Primers)**
 - Taq polimeráz, degenerált primer, alacsony annealing hőmérsékletet követően nagyszámú ciklus magas annealing hőmérsékleten, < 3 kb
- **LMP (Ligation-Mediated PCR)**
 - linkerrel mediált fragmentált gDNS, univerzális primer, < 2 kb
- **TLAD (T7-based Linear Amplification of DNA)**
 - 3' polyT vég Alu I restrikcióval és terminális transzferázzal, 3'-poly-A végű primer 5' T7 promoterral, Taq polimeráz, majd in vitro transzkripciót követő reverz transzkripció
- **MDA (Multiple Displacement Amplification)**
 - nem PCR alapú, random, exonukleáz-rezisztens hexamer annealing, Phi29 polimeráz, izotherm láncpótló szintézis, > 10 kb

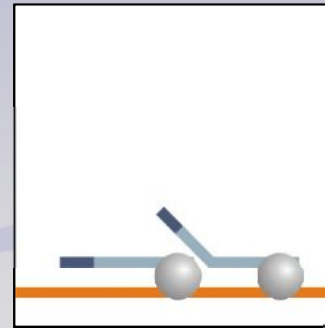
MDA (Multiple Displacement Amplification) REPLI-g-kit (QIAGEN)



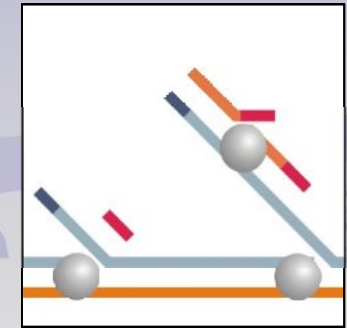
Alkalikus denaturáció



Hexamer random primerek



Φ 29 Polimeráz szál szintézis



- Kíméletes denaturáció - intakt DNS-templát

- Egyenletes primer kötődés - lefedi a teljes genomot

- Nagy pontosságú Phi29 Polimeráz

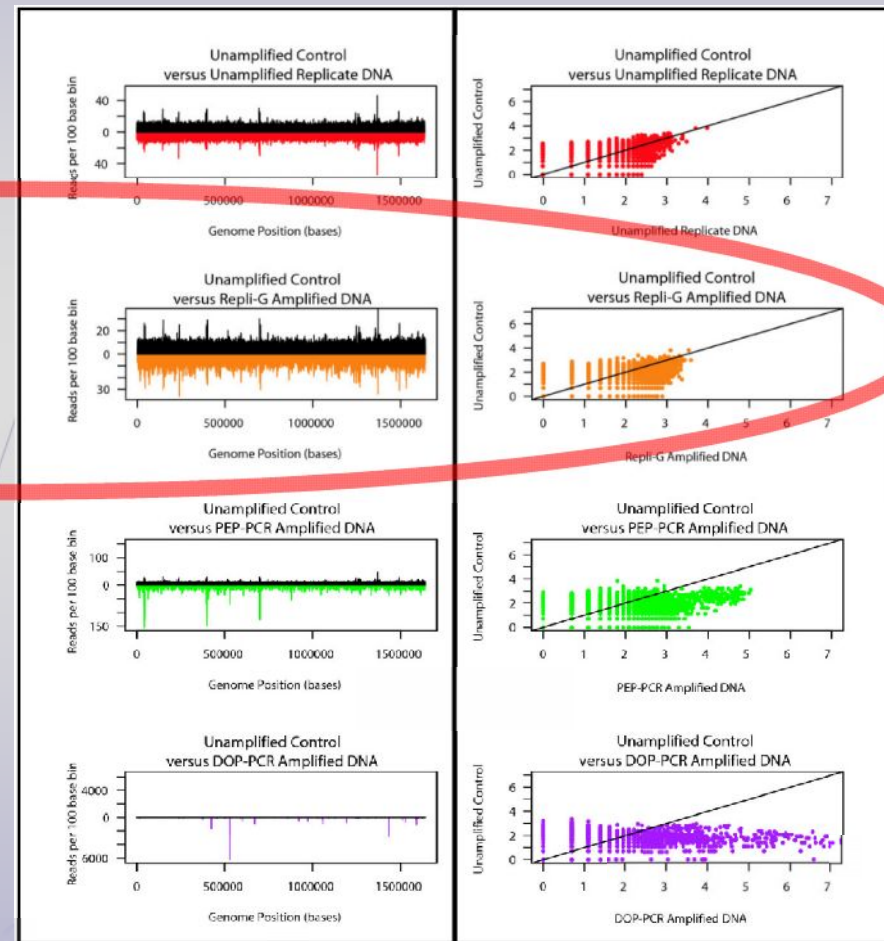
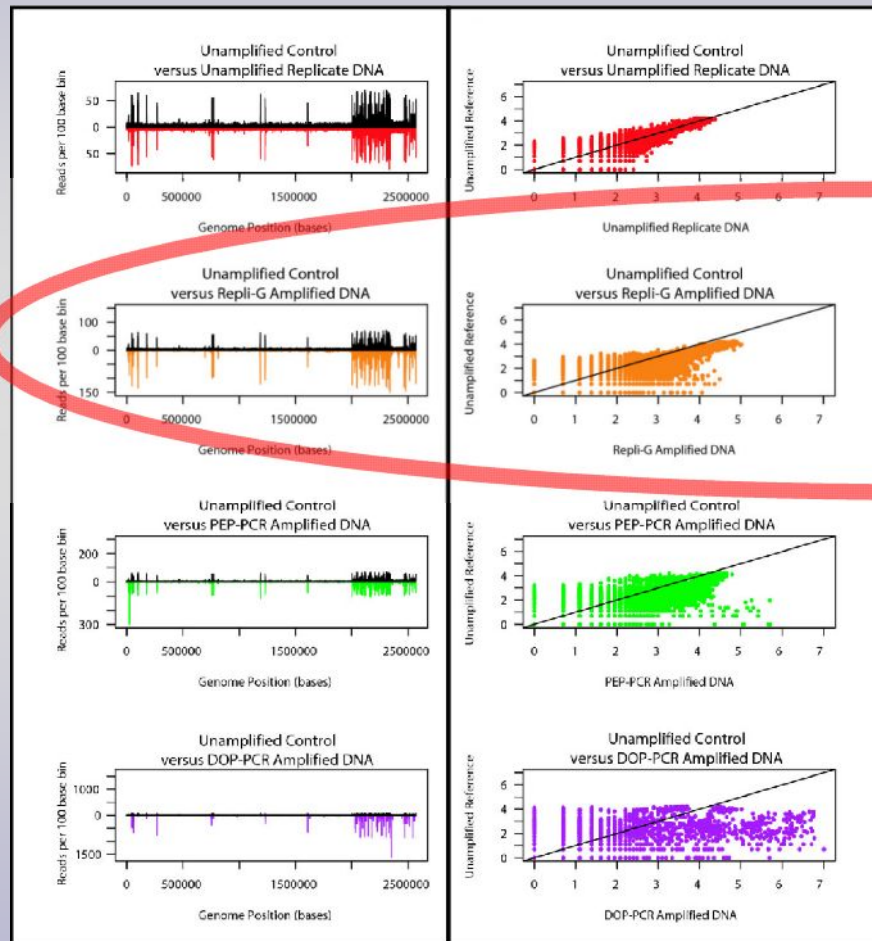
- nem disszociál a templátról,
- 10-100 kb termékek,
- korrekciós aktivitás - hibázás 10^{-7}

- Önnormalizáló reakció - pontos és egyenletes szintézis

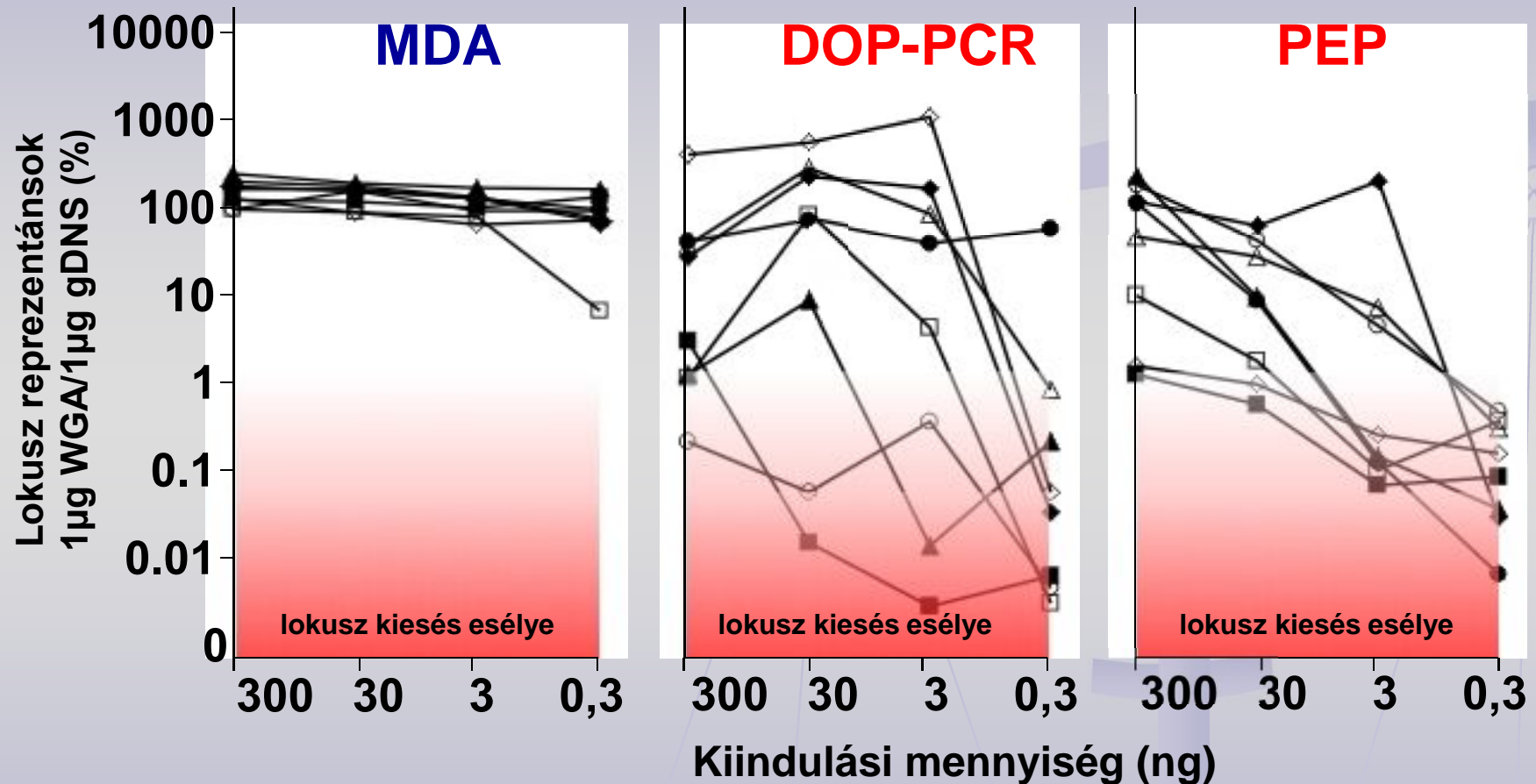
Szekvenciális átfedés és torzulás tesztelése 100 bp-os felbontásban

Halobacterium sp. (GC:66%)

Campylobacter jejuni (GC:31%)



Kiegyensúlyozottság és torzulás kvantitatív vizsgálata 8 lokuszon



Lokusz drop-out → Adatvesztés → Téves következtetés

A WGA (REPLI-g kit, QIAGEN) eredményes használata

- DNS hozam

- REPLI-g reakció > 2000x, 10–50µg végtermék
- DOP, PEP reakció ~ 100x, 2–4 µg végtermék

- genomiális átfedés

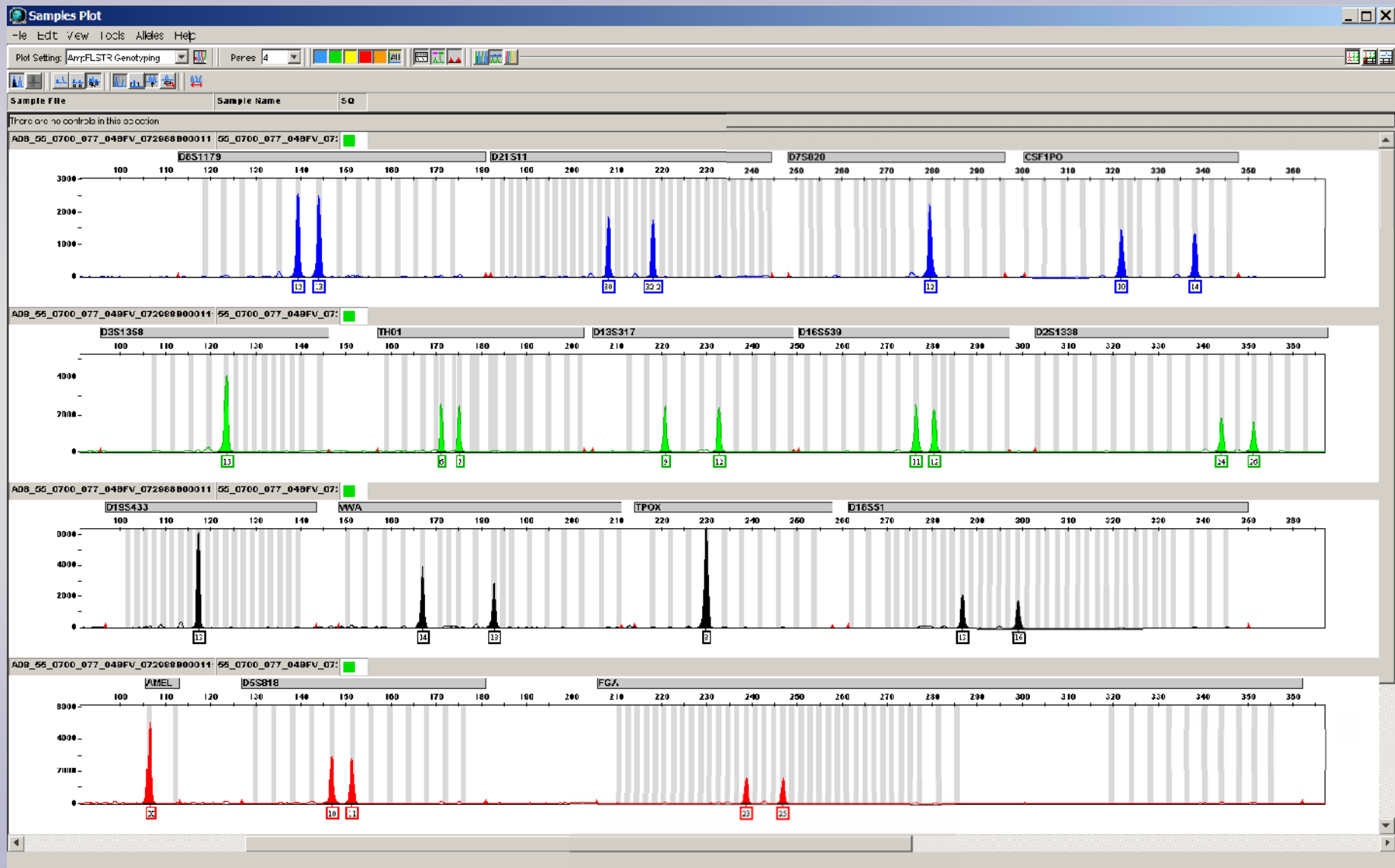
- REPLI-g > 99% > PEP > > > DOP

- kiegyensúlyozottság, torzulás (bias)

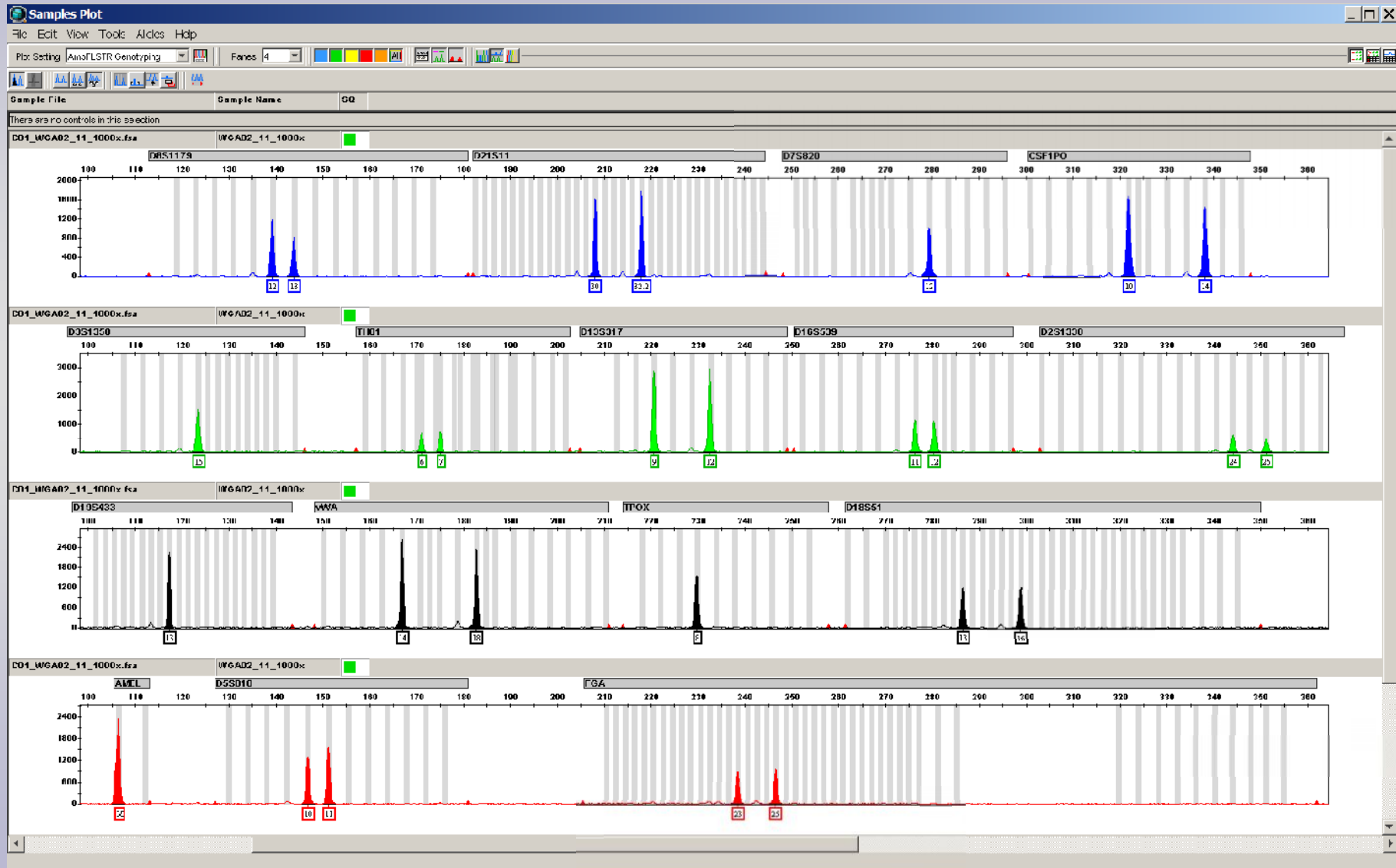
- REPLI-g > PEP > > > DOP

- függ a méretbeli különbségtől
- kópiaszámtól
- repetitív régiók mennyiségétől
- a homopolymer jellegtől vagy GC tartalomtól

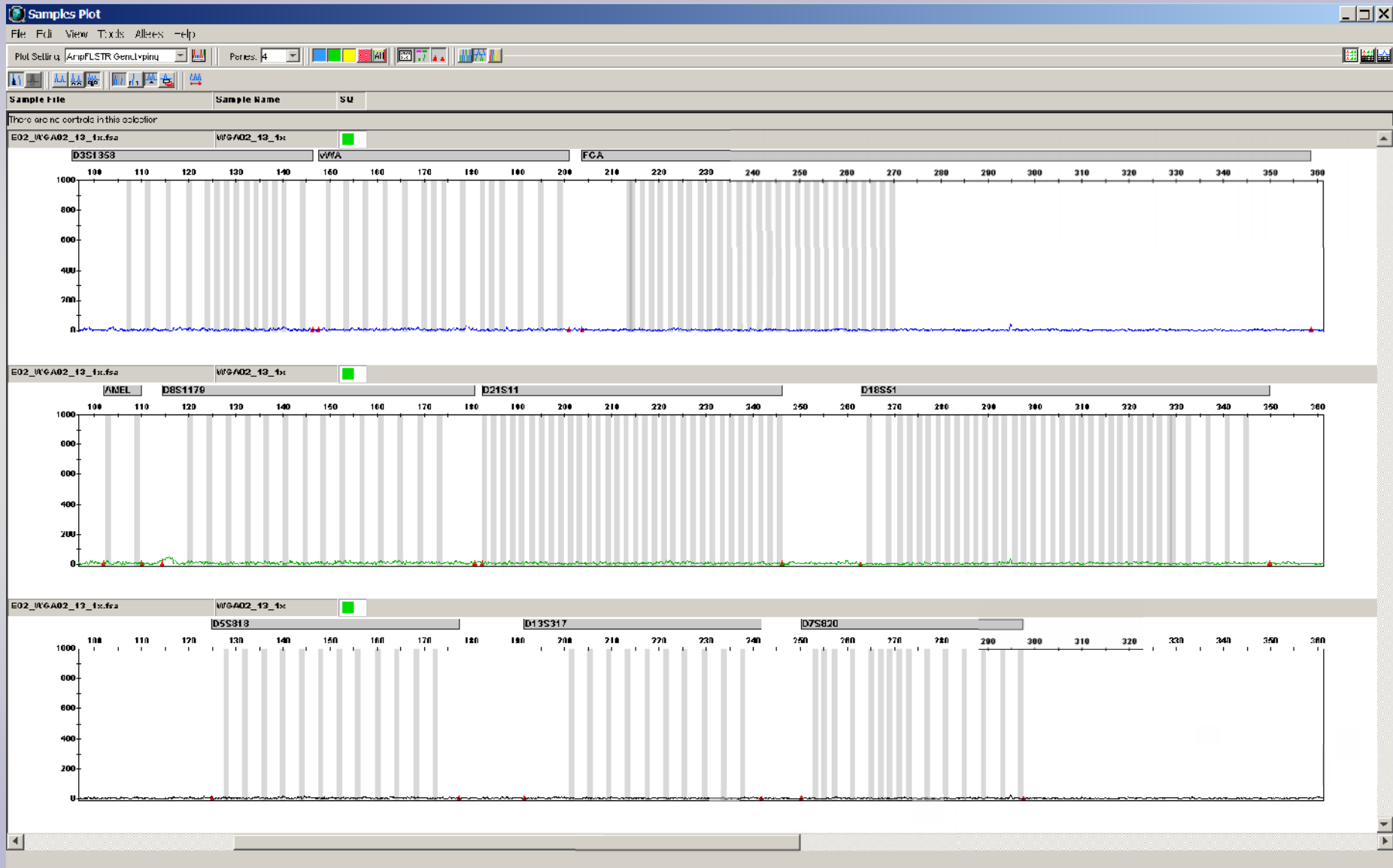
55-0700-077-04-B-FV minta (Identifiler) genetikai profilja - a WGA (REPLI-g) előtt (9 ng/μl)



55-0700-077-04-B-FV minta (Identifiler) genetikai profilja - a WGA (REPLI-g) után (23 ng/μl-1000xhígítás)



WGA negatív kontroll genetikai profil (REPLI-g, kit QIAGEN, Identifiler kit, Applied Biosystems)





















A szekér halad...

- **technikai eszköztár**
 - automatizálás
 - hordozhatóság
 - nanotechnológia
- **genetikai eszköztár**
 - **fenotípus (megjelenés, hajlam)**
 - **pigmentáció (SNP) markerek**
 - TYR, TYRP1, OCA2, SLC45A2, SLC24A5, MC1R, ASIP, KITLG, SLC24A4, IRF4, TPCN2
 - **testalkat**
 - myogenezis, skeletogenezis
 - **agresszivitás**
 - Cesare Lombroso (1835-1909)
 - „született bűnöző” - öröklött kriminalitás
 - GCR, SERT, MAO

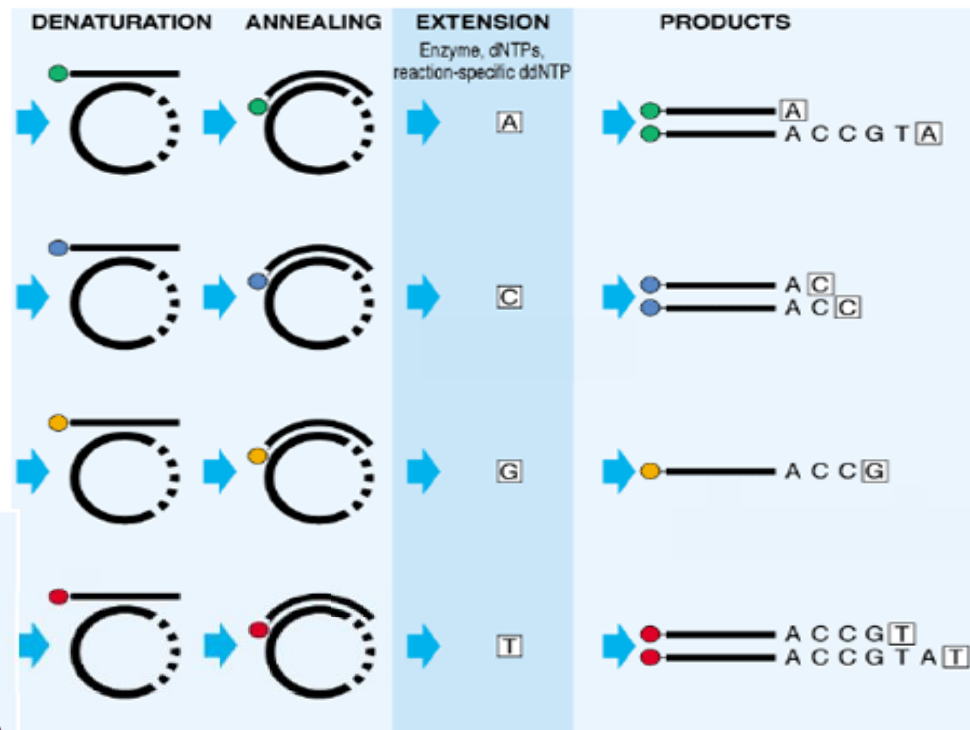
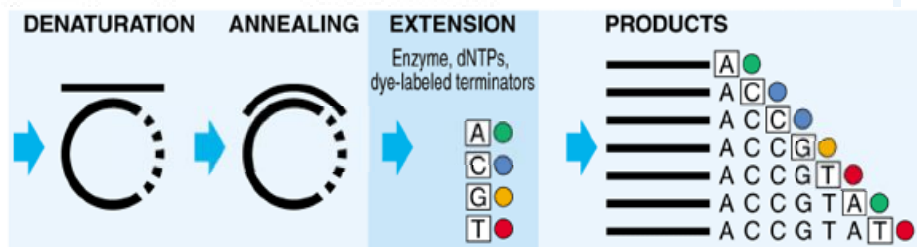


Szekvencia vizsgálat # 1 - ciklus szekvenálás

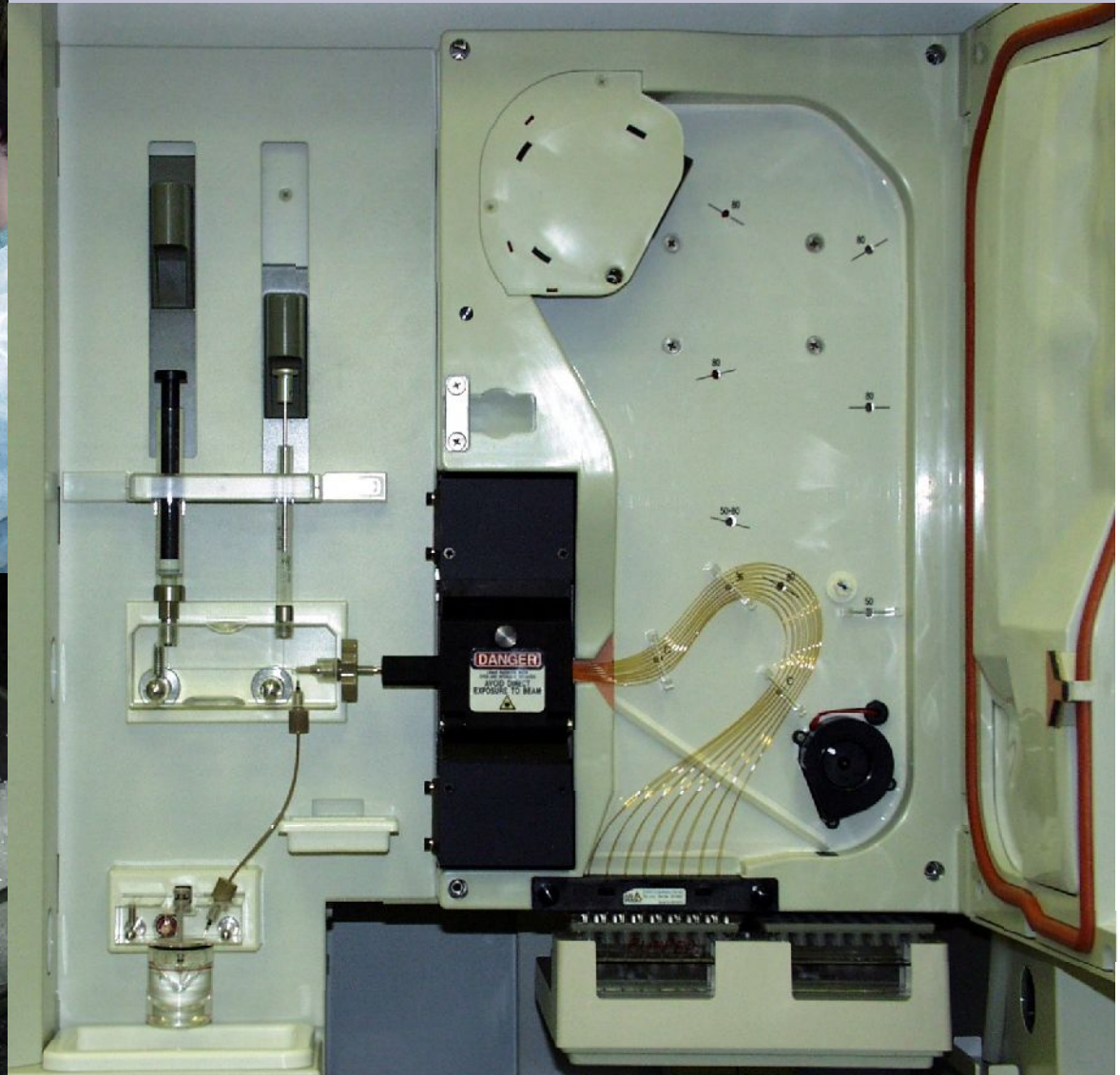
Gel:

	G	GCGAATGCGTCCACAACGCTACAGGTG
	T	GCGAATGCGTCCACAACGCTACAGGT
	G	GCGAATGCGTCCACAACGCTACAGG
	G	GCGAATGCGTCCACAACGCTACAG
	A	GCGAATGCGTCCACAACGCTACA
	C	GCGAATGCGTCCACAACGCTAC
	A	GCGAATGCGTCCACAACGCTA
	T	GCGAATGCGTCCACAACGCT
	C	GCGAATGCGTCCACAACGC
	G	GCGAATGCGTCCACAACG
	C	GCGAATGCGTCCACAAC
	A	GCGAATGCGTCCACAA
	A	GCGAATGCGTCCACA
	C	GCGAATGCGTCCAC
	A	GCGAATGCGTCCA
	C	GCGAATGCGTCC
	C	GCGAATGCGTC
	T	GCGAATGCGT

- dNTP és ddNTP
- eltérő fragmenshossz
- jelölt primerek
- vagy
- jelölt nukleotidok



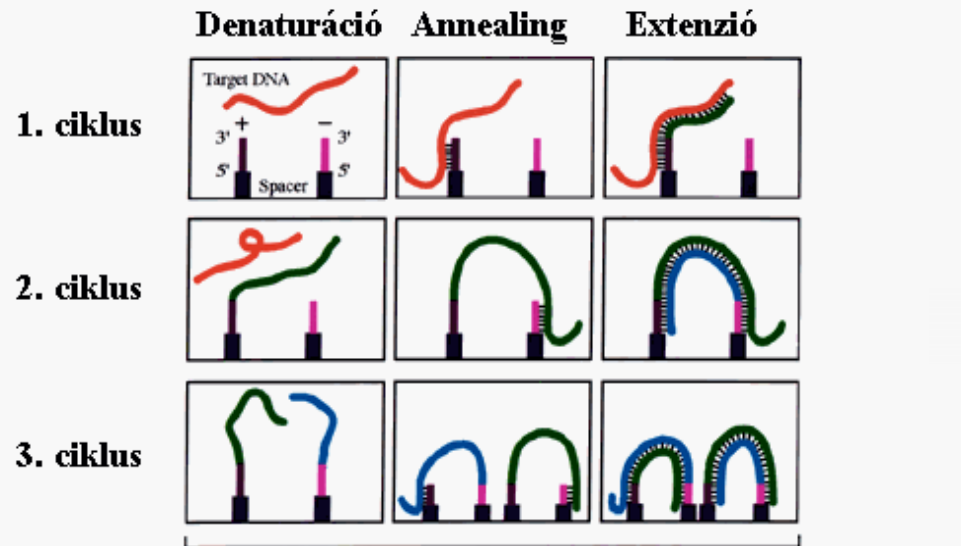
Technikai eszköztár # 1



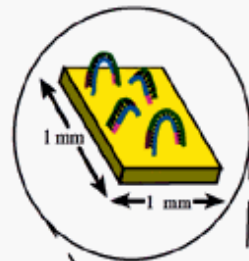
Technikai eszköztár # 2



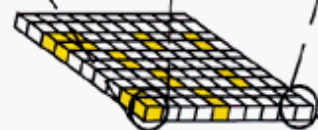
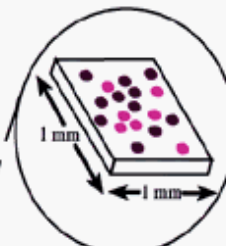
Technikai eszköztár # 3



Pozitív pixel
(fúzionált dNTP-k
detektálása)



Negatív pixel

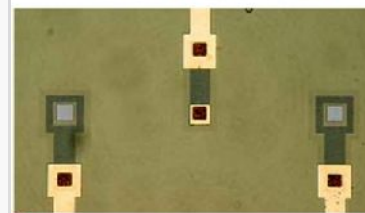


■ szilárd fázisú PCR - „Bridge” amplifikáció

- kovalensen kötött primerek
- detektálás és kvantálás elektroforézis nélkül

■ nanotechnológia

Silicon field-effect sensors for DNA detection



Silicon heaters for DNA amplification

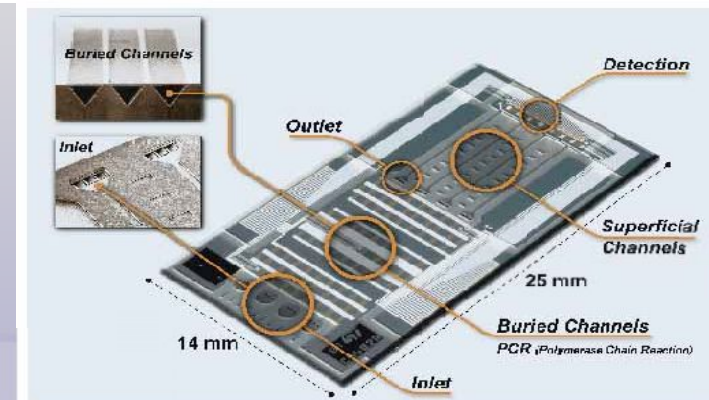
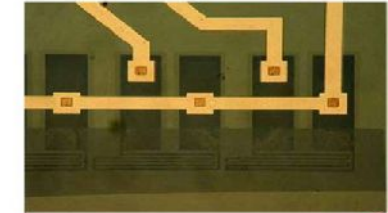
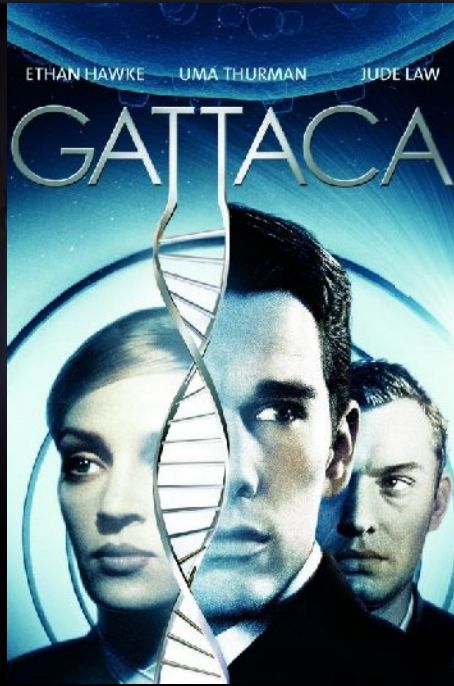


Fig 1 ST's Lab-on-a-Chip

Technikai eszköztár # 4 - Next Generation Sequencing

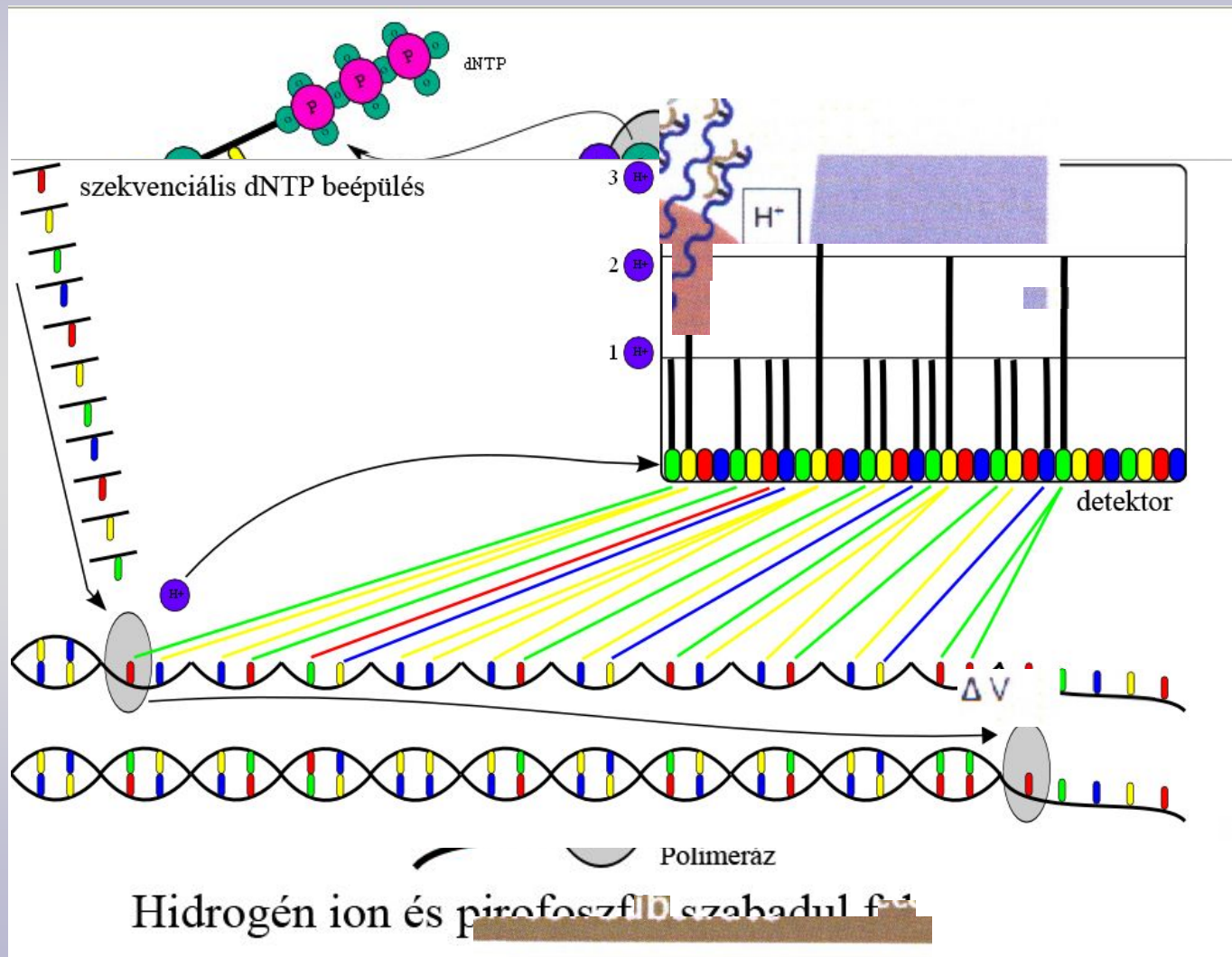
G A



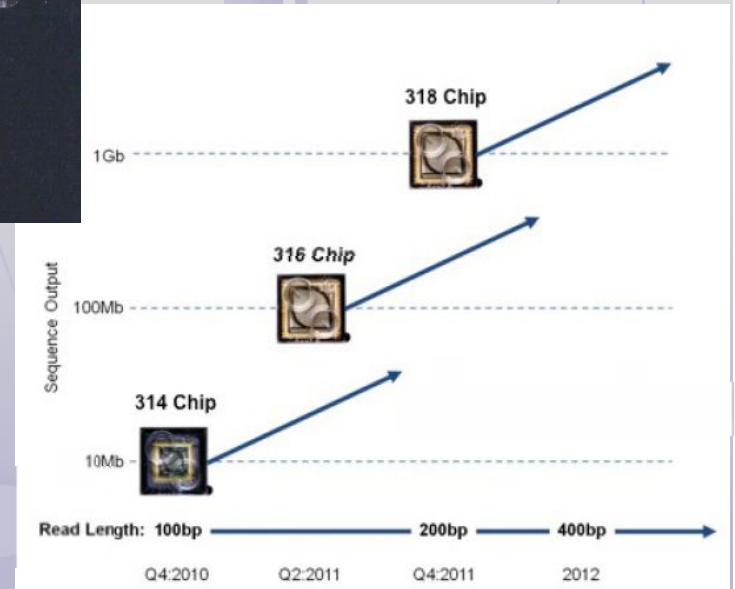
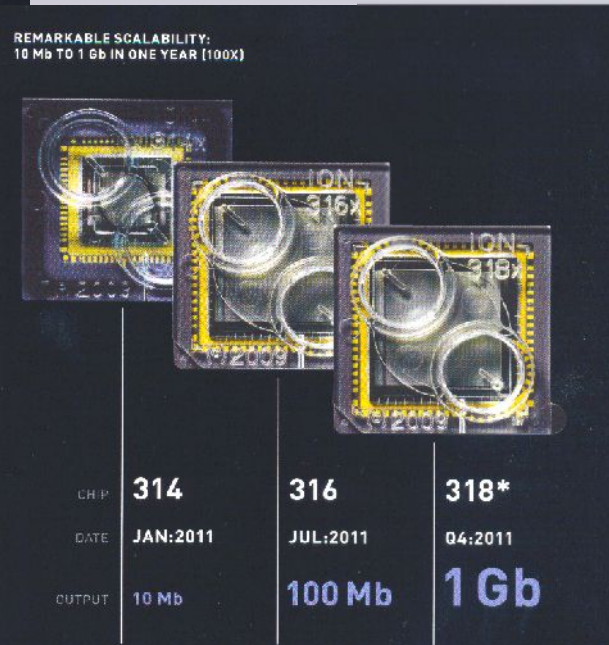
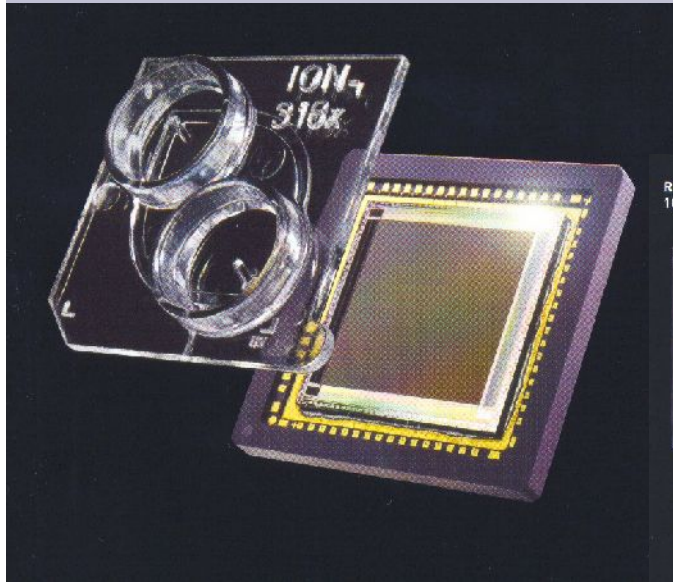
A C A

There is no gene for the
human spirit

Technikai eszköztár # 5 - félvezető szekvenálás



Technikai eszköztár # 6 - Ion Torrent Ion Personal Genome Machine Sequencer



Irodalom

- Forensic DNA typing. Biology technology, and genetics of STR markers. Second edition. (2005) Butler, JM. Elsevier Academic Press, ISBN 0-12-147952-8
- Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. (2011) Butler, JM. Elsevier Academic Press, ISBN 978-0-12-374513-2
- Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. (2014) Butler, JM. Elsevier Academic Press, ISBN: 978-0-12-405213-0

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET

