UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wprowadzenie do genetyki sądowej

© 2013 | Pracownia Genetyki Sądowej | Katedra i Zakład Medycyny Sądowej www.umed.pl

Materiały biologiczne

Inne:
- **włosy z cebulkami, paznokcie**
- **możliwa degradacja - tkanki utrwalone w formalinie/parafinie,**

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Materiały biologiczne: prawidłowe zabezpieczanie śladów

Warunki
- Materiały suche: temp. pokojowa, dostęp powietrza
- Ciecze, tkanki miękkie: -20°C do -80°C (kości)

Metody
- Krew na antykoagulant (-20°C) lub bibuła/płótno/FTA (+20°C)
- Wymazy (-20°C lub + 20°C po wysuszeniu)
- Wysuszenie / zapakowanie w papierową kopertę; temperatura pokojowa – niedopałki, znaczki, odzież (pobranie fragmentów lub w całości), włosy z cebulkami, paznokcie wraz z materiałem znajdującym się pod nimi

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Materiały biologiczne: prawidłowe zabezpieczanie śladów

Powierzchnie wchłaniające:
- wycięcie fragmentu *(dywan)*
- zabezpieczenie w całości *(odzież)*

Powierzchnie niewchłaniające:
- zabezpieczenie na jałową wymazówkę *(dźwignia zmiany biegów)*
- zabezpieczenie fragmentu przedmiotu wraz z zaplamieniem *(kawałek stłuczonej szyby)*
- zabezpieczenie w całości, jeśli gabaryty niezbyt duże

Materiały biologiczne - testy jakościowe

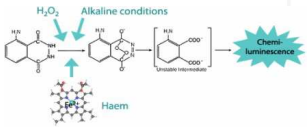
A. Ślina
– test niespecyficzny – test płytkowy (α-amylaza)
– test specyficzny – test immunochromatograficzny (α-amylaza)
– test odciskowy

B. Krew
– testy niespecyficzne (luminol, H_2O_2)
– test specyficzny – immunochromatograficzny (hemoglobina ludzka)

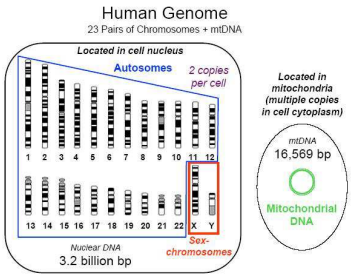
C. Sperma
– test niespecyficzny – UV / test bardziej specyficzny – Bluemaxx (też ślina i mocz)
– test specyficzny - immunochromatograficzny (obecność PSA)

Materiały biologiczne - testy jakościowe

B. Krew
– test niespecyficzny - luminol

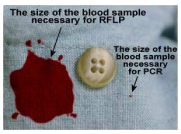


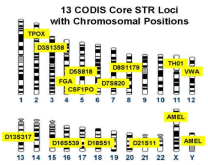
DNA: jądrowy i mitochondrialny



Zróżnicowanie sekwencji tandemowych

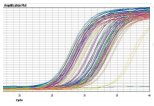
- Sekwencje minisatelitarne – VNTR
  - Jednostka powtórzeniowa: od 9 do 100 bp / cała sekwencja kilka tysięcy bp
  - Bardzo wysoki stopień polimorfizmu
  - Polimorfizm wykrywany technikami: VNTR-RFLP lub VNTR-PCR
- Sekwencje mikrosatelitarne – STR (krótkie powtórzenia tandemowe)
  - Motyw repetytywny: 2 – 6 bp
  - Duży polimorfizm;
  - gł. metoda analizy - PCR



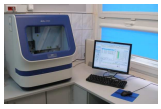


Praca w laboratorium genetycznym – etapy:

1. Izolacja
2. Pomiar stężenia DNA



3. Amplifikacja DNA metodą PCR
4. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR
   - analiza ręczna – barwienie żeli
   - analiza automatyczna – detekcja optyczna z wykorzystaniem promieni lasera produktów znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi (analizator genetyczny)



5. Genotypowanie

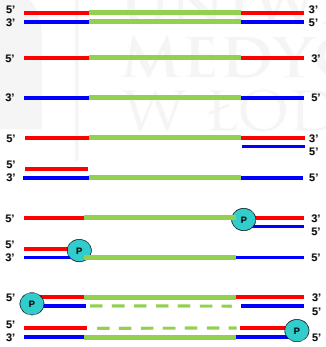
PCR – zasada reakcji

94ºC
Denaturacja nici
– pękanie wiązań wodorowych

59ºC
Przyłączanie primerów do nici
5' TCATAAGT 3'
3' AGTATTCATTCATT 5'

72ºC
Wydłużanie przez Polimerazę nici komplementarnej do nici matrycy

Podwojenie ilości amplifikowanego fragmentu DNA w każdym cyklu: 1, 2, 4, 8,16, …

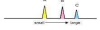


Multiplex PCR

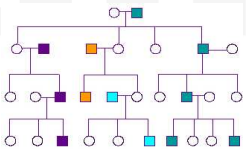
- **Jednoczesna amplifikacja wielu loci w jednej reakcji PCR**
- **Odpowiedni zestaw primerów w mieszaninie reakcyjnej – uniknięcie parowania się między sobą**
- **Primery wyznakowane różnymi barwnikami fluorescencyjnymi - odseparowanie od siebie loci o podobnym zakresie masy (bp)**
- **Oszczędność czasu i materiałów (degradacja DNA)**
- **Potrzeba niewielkiej ilości DNA (2,5ul)**
- **Duża siła dyskryminacji zestawu np.15 loci**

Jednoczesna amplifikacja kilku loci na DNA matrycowym

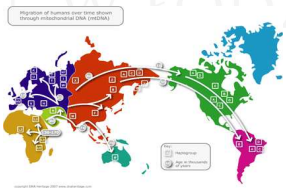
Rozdział produktów PCR w zależności od wielkości



Markery Y-STR

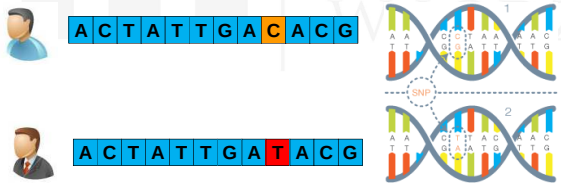


- dziedziczenie w linii męskiej



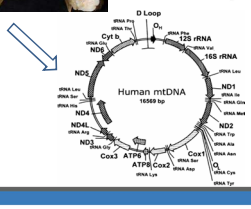
- ustalenie pochodzenia geograficznego (brak materiału referencyjnego)

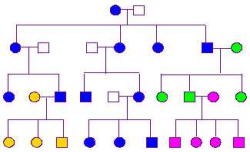
SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms



mtDNA

- przydatność przy analizie zdegradowanego jądrowego DNA





- dziedziczenie w linii odmatczynej

Zasady wyłączania ojcostwa

U dziecka pojawia się nowa cecha, nieobecna u pozwanego o ojcostwo mężczyzny ani u matki

i lub

Dziecko nie dziedziczy żadnej cechy po pozwanym o ojcostwo mężczyźnie

Wartość dowodowa analizy

Szansa ojcostwa - PI

Ocenia, ile razy bardziej prawdopodobne jest
ojcostwo badanego pozwanego
w porównaniu do
ojcostwa losowo wybranego mężczyzny
dla konkretnego wyniku ekspertyzy

▼

Prawdopodobieństwo ojcostwa

Wartość dowodowa analizy

Łączna szansa ojcostwa – PI c

▼

Zasada iloczynu – „PRODUCT RULE"

PI c = PI 1 lokus x PI 2 lokus x PI 3 lokus x .....

Opiniowanie w analizie ojcostwa

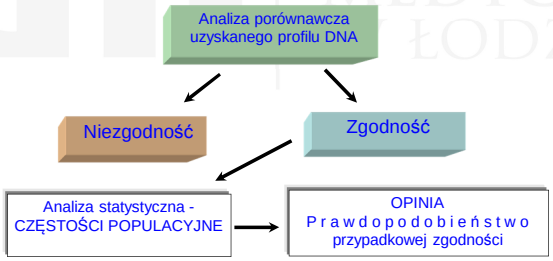
EKSPERTYZA DNA

WYŁĄCZENIE
MINIMUM
4 NIEZGODNOŚCI

POTWIERDZENIE
Z PRAWDOPODOBIEŃSTWEM
>99,9999% (PI>1 000 000)

$$\frac{PI}{PI+1} = P$$

Wartość dowodowa analizy



Wartość dowodowa analizy

prawo Hardy'ego i Weinberga

STRUKTURA GENETYCZNA POPULACJI
- ✓ odpowiednio liczna
- ✓ kojarzenie losowe
- ✓ brak doboru naturalnego
- ✓ brak selekcji, mutacji i migracji

STAN DYNAMICZNEJ RÓWNOWAGI
Częstość występowania różnych genotypów w populacji jest stała i zależna jedynie od częstości występowania alleli w populacji

Wartość dowodowa analizy

Jeżeli allel „a" w lokus A ma częstość a
a allel „b" w lokus B ma częstość b

- HWE w populacji

CZĘSTOŚCI GENOTYPÓW

$AA = a^2$

$BB = b^2$

$AB = 2ab$

Wartość dowodowa analizy

ILOCZYN CZĘSTOŚCI GENOTYPÓW = CZĘSTOŚĆ PROFILU

$$\frac{1}{\text{CZĘSTOŚĆ PROFILU}} = 1 \text{ PROFIL NA .... OSÓB}$$

PRAWDOPODOBIEŃSTWO PRZYPADKOWEJ ZGODNOŚCI

PE - SIŁA WYŁACZENIA

tzw. przydatność do badań ojcostwa

Jest to odsetek niesłusznie pozwanych o ojcostwo mężczyzn, którzy zostaną wykluczeni w toku analizy

PD - SIŁA DYSKRYMINACJI

tzw. szansa zróżnicowania osób

Jest to prawdopodobieństwo, że dwie losowo wybrane osoby z populacji nie będą miały takiego samego zestawu cech