

FORENZIČNE GENETSKE PREISKAVE



Prof.dr. Katja Drobnič

FVV

BF

**Nacionalni forenzični
laboratorij**

Policija

MNZ

PREDSTAVITEV POJMOV

- FORENZIČNA ZNANOST (*lat. forum*)

Uporaba znanosti za razreševanje dejanskih in pravnih vprašanj v civilnih, kazenskih in drugih zadevah (prekrški) itd.

- KRIMINALISTIKA (Hans Gross - 1889)

Znanost, ki uporablja spoznanja različnih družbenih, naravoslovnih in tehničnih znanosti in praktične izkušnje za odkrivanje, preiskovanje in dokazovanje kaznivih dejanj in njihovih storilcev!

- KRIMINALISTIČNA TEHNIKA

Zavarovanje materialnih dokazov in preiskovanje le-teh z uporabo različnih znanj, metod in tehnik v kazenskih zadevah!

- KRIMINOLOGIJA

Znanost, ki proučuje kriminaliteto kot družben pojav, raziskuje njene oblike in vzroke nastajanja, zakonitosti njenega gibanja!

UPORABA FORENZIČNIH GENETSKIH IDENTIFIKACIJSKIH TESTOV*

- KAZENSKE ZADEVE
 - Namen ugotavljanje identitete storilca
- CIVILNE ZADEVE
 - Namen ugotavljanje spornega očetovstva
- UGOTAVLJANJE IDENTITETE
 - pogrešanih
 - žrtev nesreč (naravnih, prometnih itd)
- ANTROPOLOŠKE in DRUGE ŠTUDIJE
- MEDICINSKE NAMENE
 - transplantacije

* Pravilen izraz individualizacijski testi.

OSNOVA TIPIZACIJE DNA

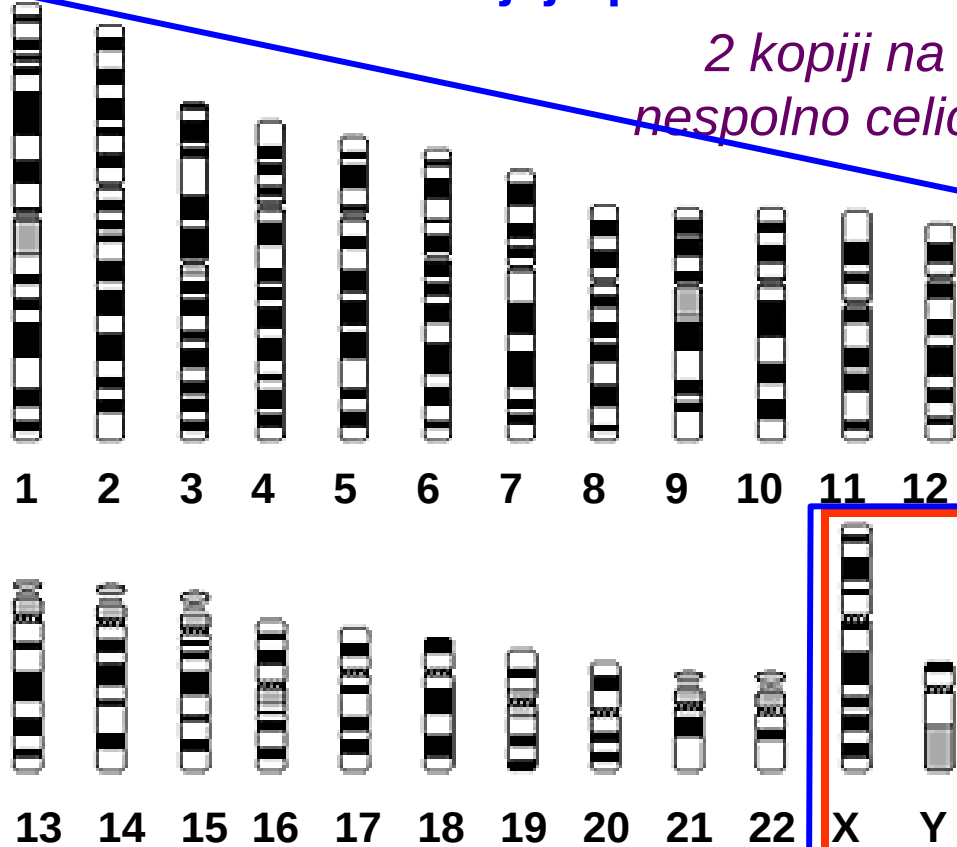
- Genom vsakega posameznika je enkraten (izjema enojajčni dvojčki) in je podedovan od staršev.
- Izbrani avtosomalni genetski označevalci so zelo polimorfni in variabilni ter omogočajo razločevanje med posamezniki.
- Ocenitev moči ujemanja pri avtosomalnih označevalcih temelji na statistični verjetnosti –verjetnost naključnega ujemanja.
- Standardni genetski označevalci ležijo na nekodirajočih delih genoma, ne povedno nič o vizualnih in fizioloških značilnostih posameznika. Manjše razlike med rasami.
- Metode tipiziranja DNA morajo biti učinkovite ter ponovljive in obnovljive.

Človeški genom

23 parov kromosomov + mtDNA

Autosomi – dedujejo po materi in očetu

*2 kopiji na
nespolno celico*



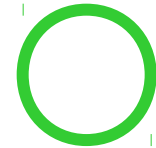
Jedrna DNA
3.2 billion bp

**Spolna-
kromosoma**

FKKT 2011

**Nahaja v
mitohondrijih (1-
15 kopij)**

mtDNA
16,569 bp



**Mitohondrijska
DNA**

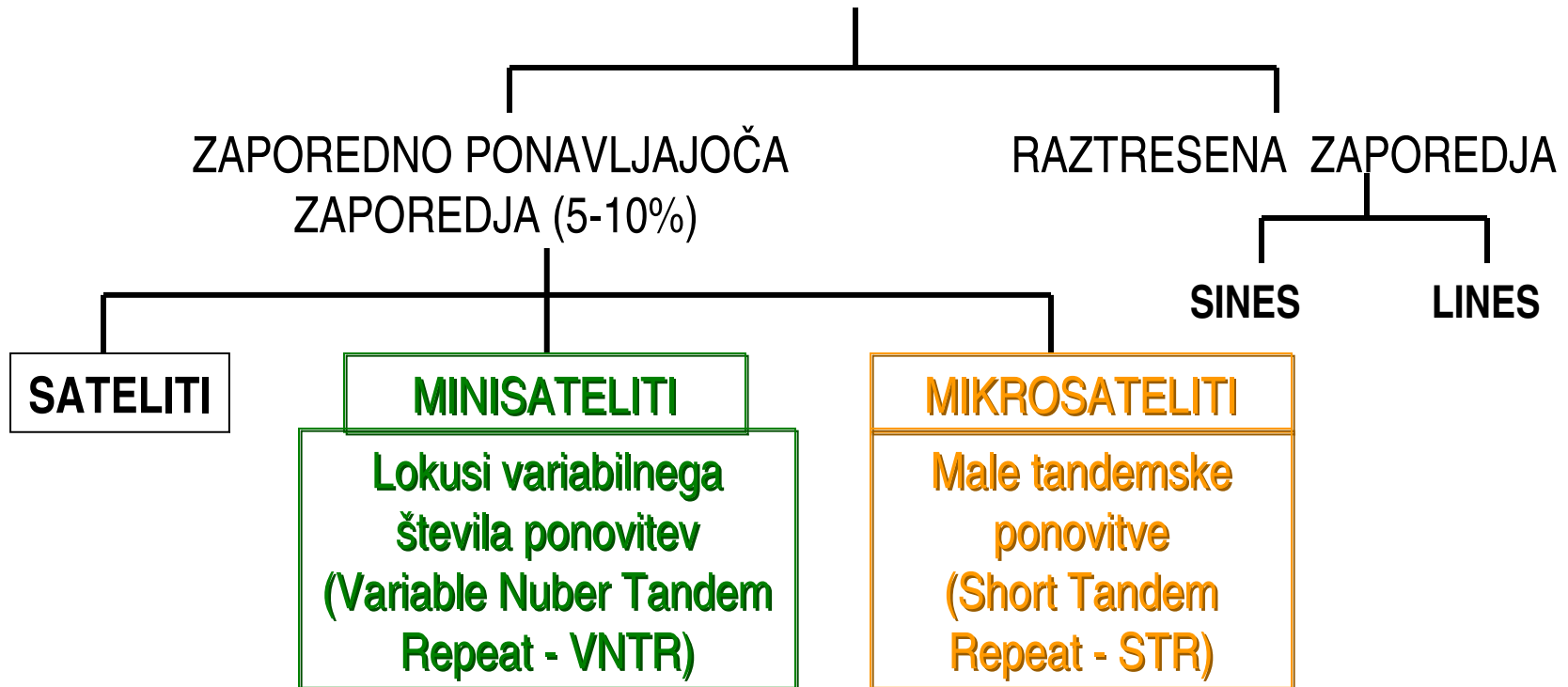
*Povprečno 500
kopij na celico*

STRUKTURA DNA

- Forenzičnih genetski označevalci za ugotavljanje identitete leže v “junk” DNK oziroma intronih
- Lokus mesto na kromosomu z določeno značilnostjo, ni nujno da gen npr. lokusi STR.
- “Genotip” je značilnost alelov na enem lokusu.
- Profil DNA je skupek genotipov na različnih lokusih.

STRUKTURA JEDRNE DNA

PONAVLJAJOČA SE DNK ZAPOREDJA
(20 - 30 % humanega genoma)
NEKODOGENI DELI DNA



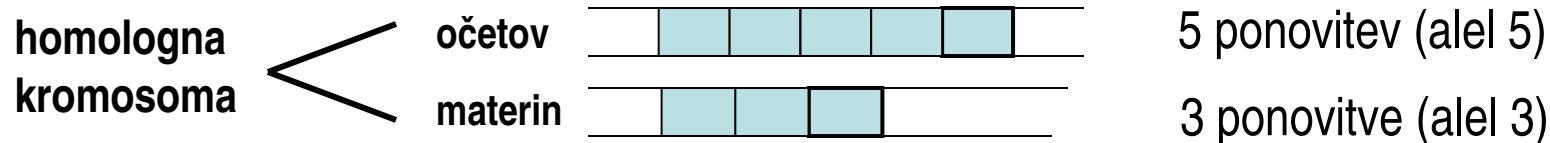
Značilnosti lokusov VNTR in STR

- Kratka nukleotidna zaporedja
- Tandemsko (zaporedno) ponavljajo
- Naključno razporejeni po genomu, STR - telomerna regija
- Biološka funkcija in nastanek nista povsem razjasnjena
- Polimorfni in hipervariabilni lokusi
- 70 % - 90% heterozigotnost
- 1980 Wyman in White odkrijeta obstoj polimorfnega lokusa RFLP v človeškem genomu s 16 kb sondo neznanega zaporedja
 - Sledijo: področje v bližini gena za insulin, skupine globinskih genov, gen za mioglobin, c-Ha-ras-onkogen
- Nomenklatura: D3S1358, DYS19, VWA

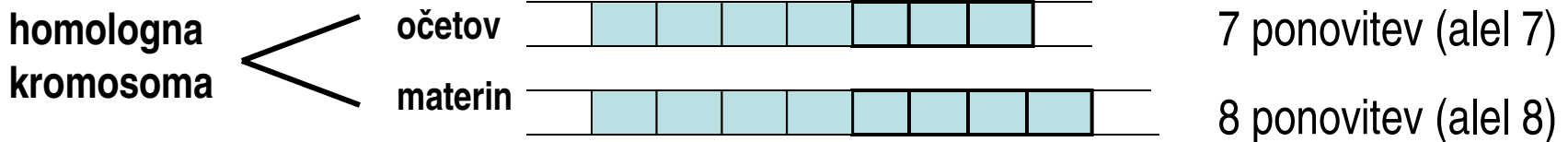
- Minisateliti – VNTR: pojavijo na vsakih 6 kb
 - osnovni motiv: 9 - 100 bp ponovi 10-100 krat
 - dolžina alelov: 200 - več 1000 bp
- Mikrosateliti- STR: pojavijo na vsakih 30 do 50 kb
 - osnovni motiv: 2 - 7 bp
 - dolžina alelov: do 400 bp

Shema lokusov VNTR/STR in genetika

OSEBA 1

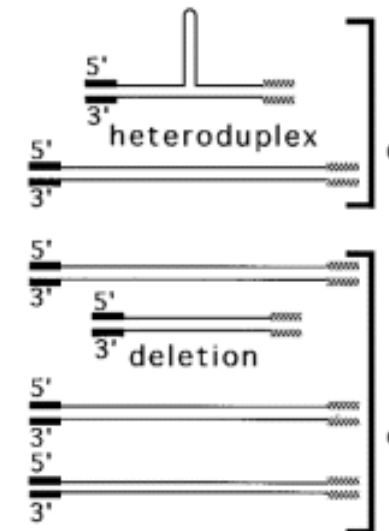
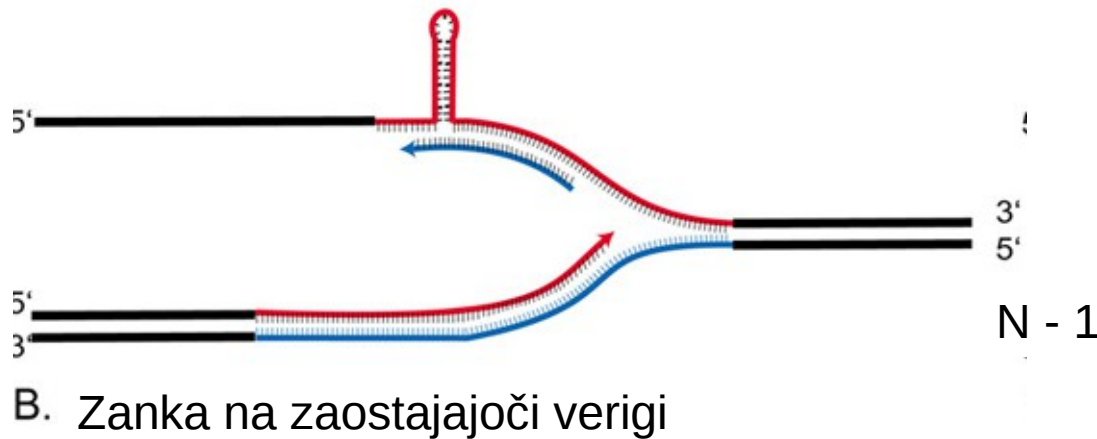
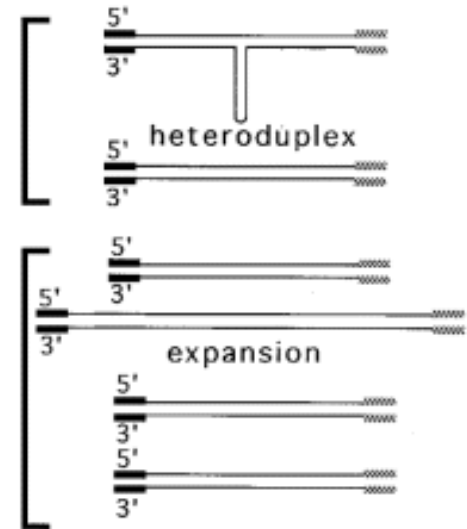
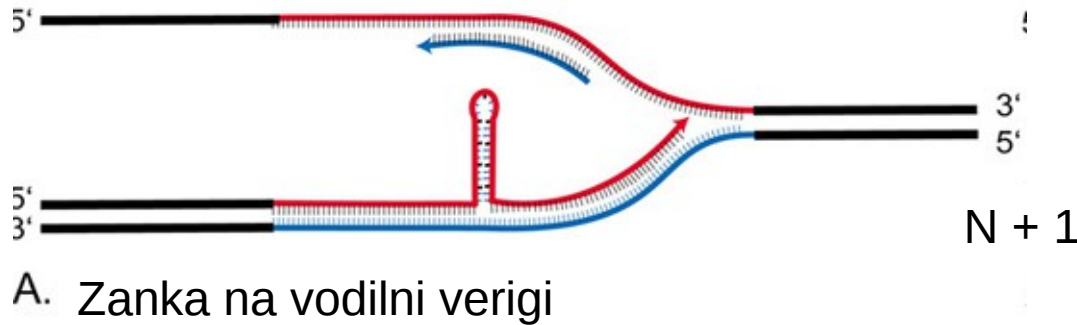


OSEBA 2



- Polimorfizem temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva
- Aleli dedujejo neodvisno, kodominantno in po Mendlovih zakonih
- Osnova variabilnosti: genska konverzija (gamete) in replikacijski zdrs (somatske celice)

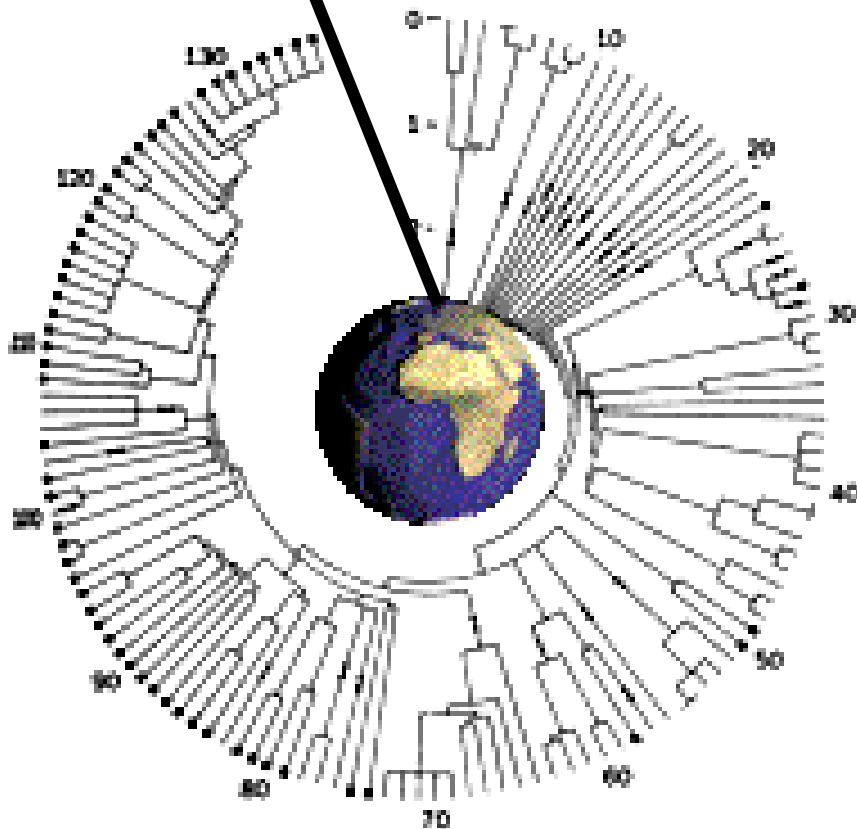
Mehanizem replikacijskega zdrsa



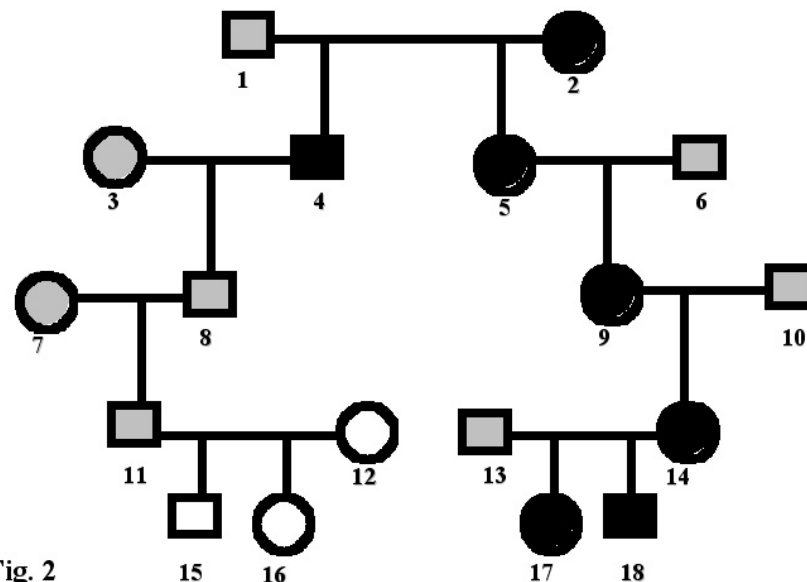
Nastajajo tudi med PCR – “stutter” produkti PCR



DEDOVANJE mtDNA



Mitochondrial Inheritance



UGOTAVLJANJE SORODNOSTI

IZVOR SODOBNEGA SKUPNEGA PREDNIKOV

GENETSKI POLIMORFIZEM

- DOLŽINSKI POLIMORFIZEM

☹️ 1 2 3 4
AATGAATGAATGAATG
TTACTTACTTACTTAC

☹️ 1 2 3
AATGAATGAATG
TTACTTACTTAC

- POLIMORFIZEM ZAPOREDJA

AGACTAGACATT
TCTGATCTGTAA

AGATTAGGCATT
TCTAATCCGTAA

RAZVOJ FORENZIČNIH PREISKAV DNA

- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov)
 - večlokusni sonda (MLP) VNTR – prstni odtis DNA
 - enolokusna sonda (SLP) VNTR – enolokusno profiliranje DNA
- AmpliFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism, polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov)
 - lokusi VNTR
 - lokusi STR
- AmpliType - Hibridizacija točkovnega odtisa
 - DQA1(HLA lokusi) in PM (DNA 5 različnih proteinov)
- Določanje zaporedja
 - HVI in HVII mtDNK
 - SNP (Single Nucleotide Polymorphism, polimorfizem posameznih nukleotidov)

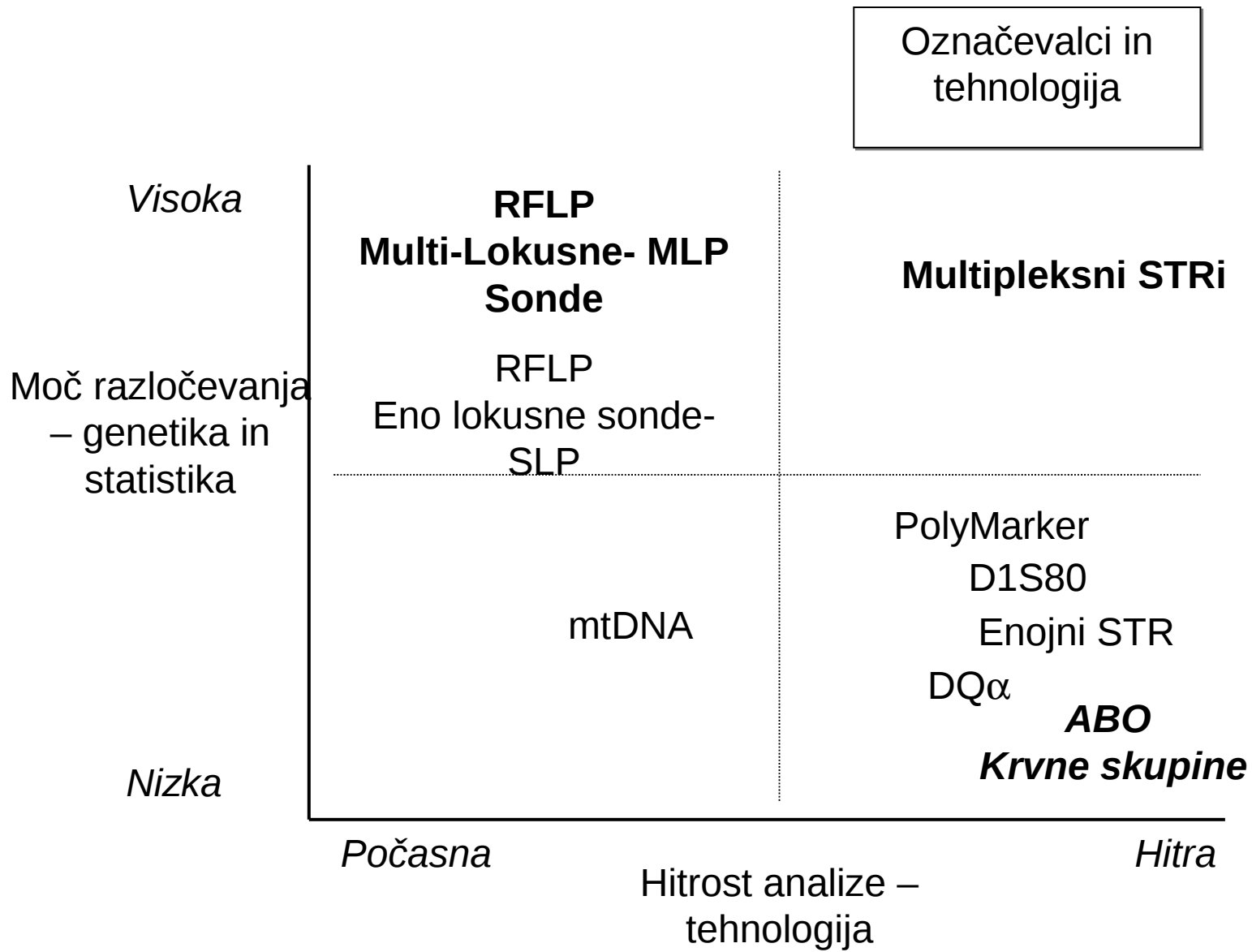
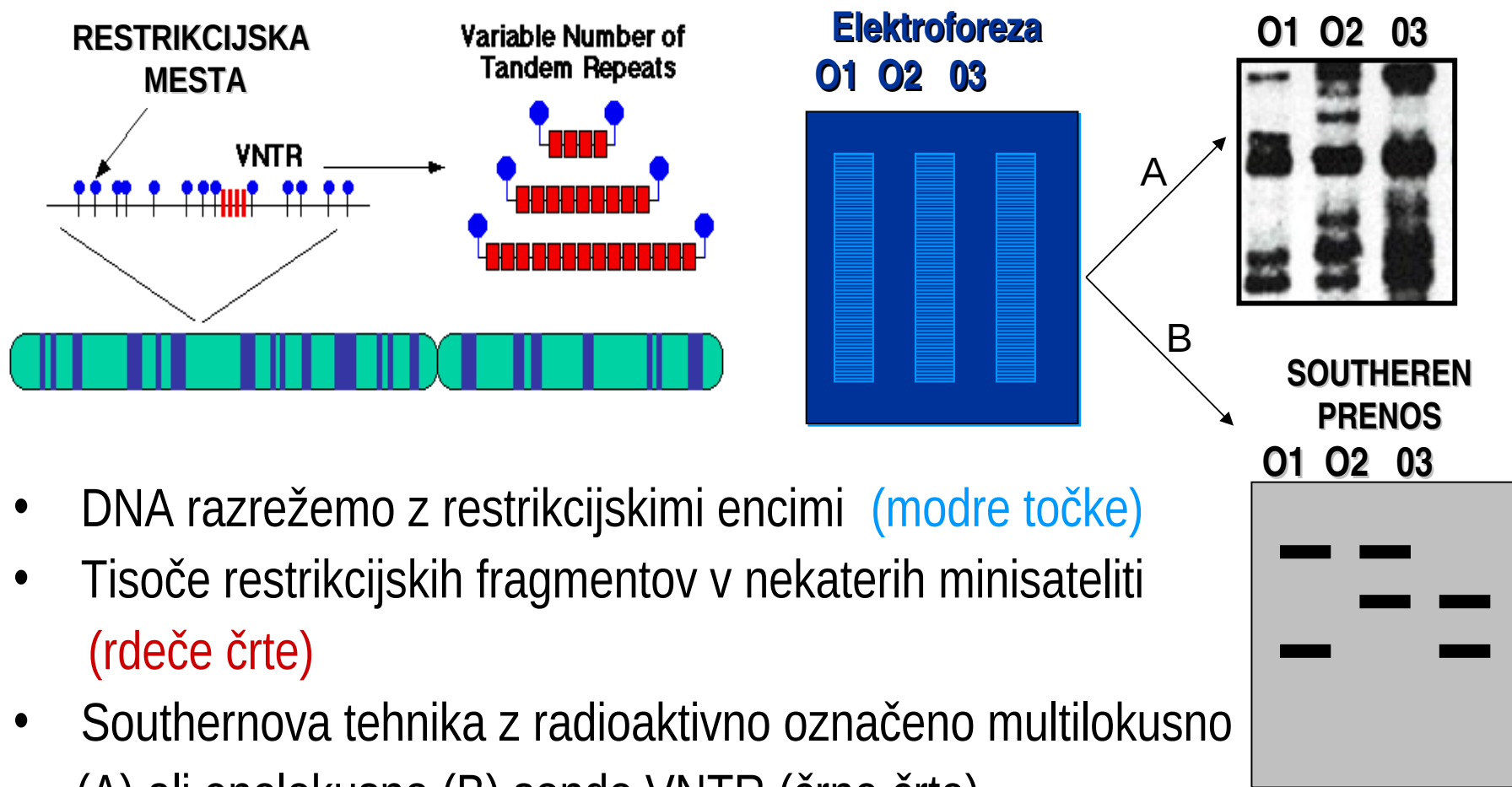


Figure 1.1, J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

METODA RFLP

(Polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov)



- DNA razrežemo z restriksijskimi encimi (modre točke)
- Tisoče restriksijskih fragmentov v nekaterih minisateliti (rdeče črte)
- Southernova tehnika z radioaktivno označeno multilokusno (A) ali enolokusno (B) sondo VNTR (črne črte)

Razlike med metodama MLP IN SLP

Tandem-repetitive polymorphism analysis by Southern blot hybridization

Single locus probe

Specific to the flanking
region of locus "A"

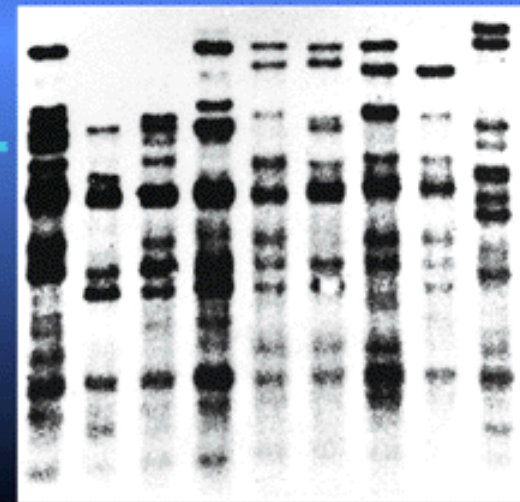
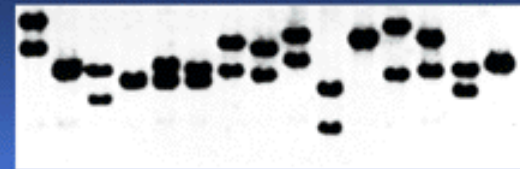
Locus "A"

Locus "B"

Repeat Unit

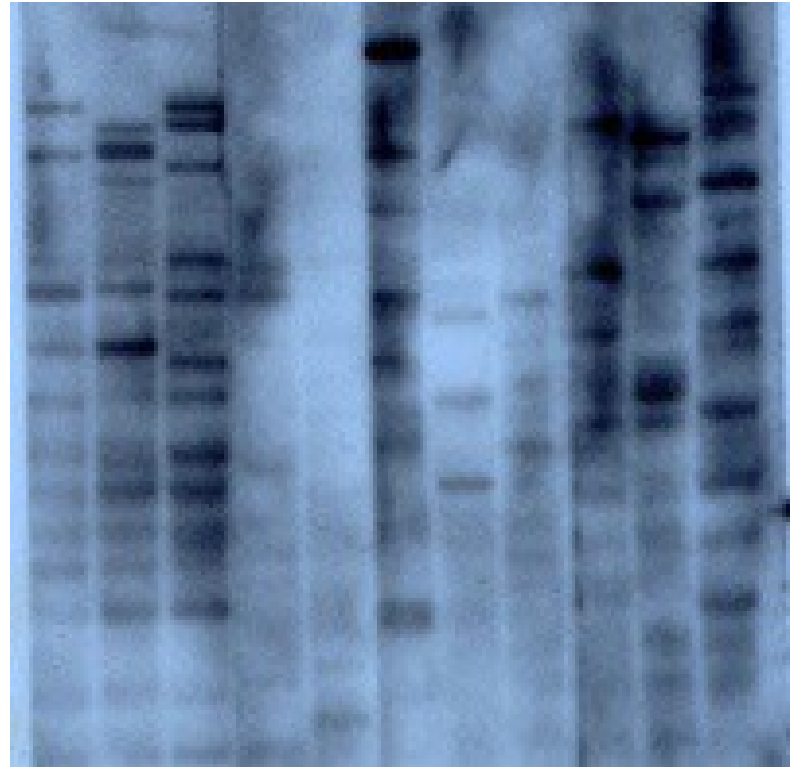
Multi-locus probe

Hybridizing to loci "A", "B", ...
(Specific to "core" sequence)



Metoda prstni odtis DNA (angl. fingerprint DNA)

- Metodo odkril Alec Jeffreys, Univerza v Leicesteru (VB)
- sonda MLP izvira iz osrednjega dela lokusa VNTR
- veže na več mest v genomu, mesto vezave ni poznano
- daje fenotipsko informacijo bolj kot sta si osebi sorodni več skupnih fragmentov imata
- individualno specifična
- ni bilo mogoče izračunati populacijskih alelnih frekvenc
- problem ločljivosti fragmentov
 - primerno za preverjanje očetovstva in reševanje primerov priseljevanja
 - manj za kriminalistične primere zaradi degradacije DNA in mešanih vzorcev



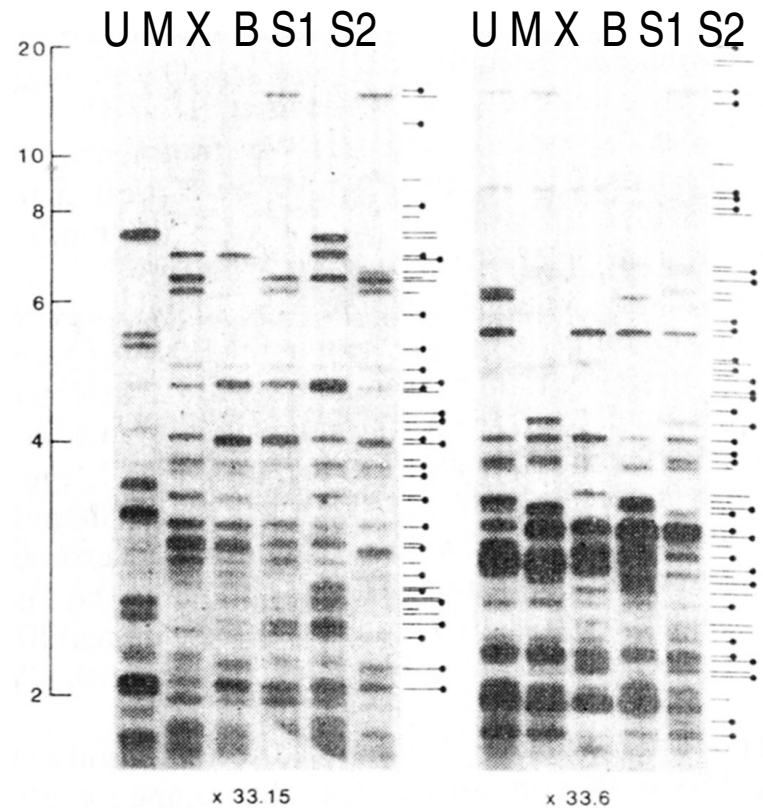
Avtoradiografska slika A. Jeffreys

Vir: The Wellcome Trust,
"Discovering DNA Fingerprinting."

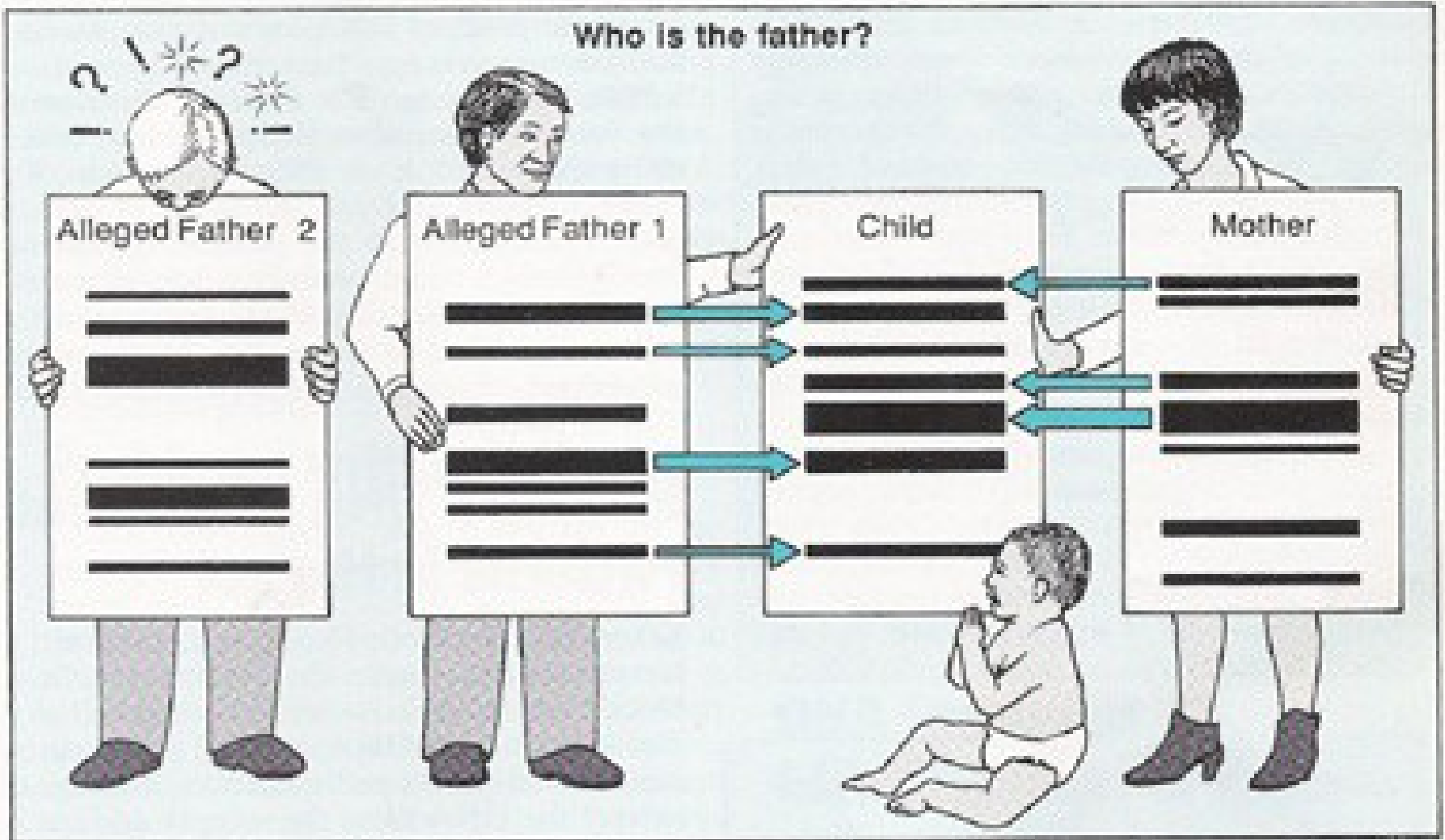
04/02/04 by Giles Newton

Multi-locus VNTR Sequences

- **Jeffreys 33.15:** [AGAGGTGGGCAGGTGG]₁₉
 - 16-mer
 - > 10⁶ copies/genome
- **Jeffreys 33.6:** [(AGGGCTGGAGG)₃]₁₈
 - 11-mer
 - >10⁶ copies/genome
- Bacteriophage M13: [AGGGTGGGYGGYTCT]
 - 15-mer
 - consensus sequence (Y = pyrimidine)



- prvi MLP sonde 33.6 in 33.15 po naključju odkril A. Jefferys - iskal humani gen za mioglobin ob tem odkril, da v intronu vsebuje VNTR
- vsebujeta 10-15 bp "jedrno sekvenco" (core sequence) skupna drugim VNTR-om
- podobna Chi sekvenci – signal za homologno rekombinacijo v E.coli
- VNTR lahko predstavljajo hot-spot mesta za rec
- hipervariabilnost posledica visoke frekvence rekombinacij



Pater pinpointed: DNA fingerprints can reveal a child's real father in paternity suits

- Metoda prstni odtis DNA prvokrat uporabljena na sodišči v VB leta 1985 za reševanje spornega priseljevanja
 - Črnski deček britanski državljani sin priseljenke iz Gane, prav tako britanske državljanke
 - Vplivala na spremembo zakona o priseljevanju
- I. 1986 pa za razreševanje umora dveh 15-letnih deklic L. Mann in D. Ashworth
 - metoda profiliranja DNA

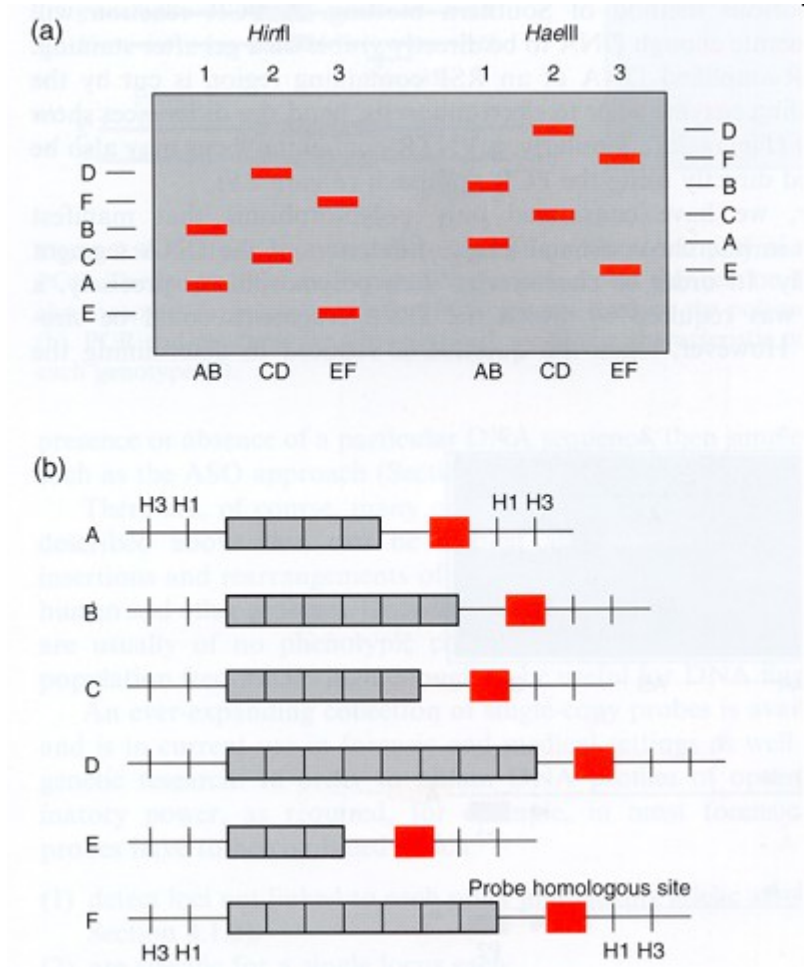
SONDA 33.15 SONDA 33.6

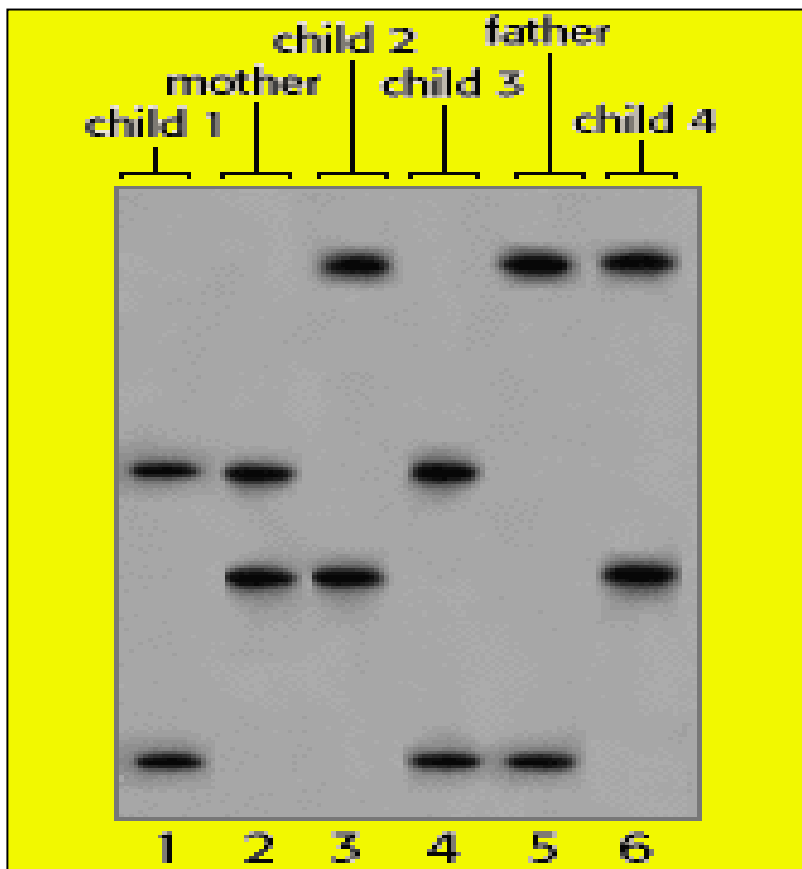


- 1 - nesorodna oseba,
- 2 - domnevna mati
- 3 - domnevni sin v preiskavi
- 4, 5, 6 - domnevni bratje in sestre

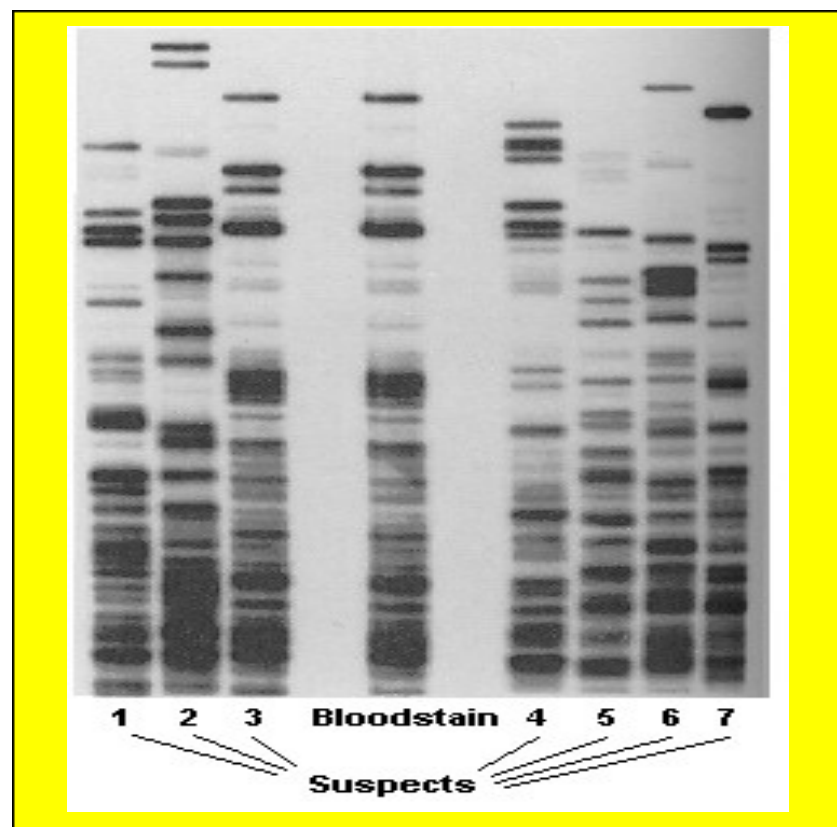
Profiliranje DNA z metodo RFLP

- Metodo prav tako odkril A. Jeffreys
- sonda SLP izvira iz robnega območja lokusa VNTR
- ponovi enkrat na haploidni genom
- specifična za posamezni lokus VNTR
- posameznik homo ali heterozigot
- populacijska genetika možna
- ni individualno specifična



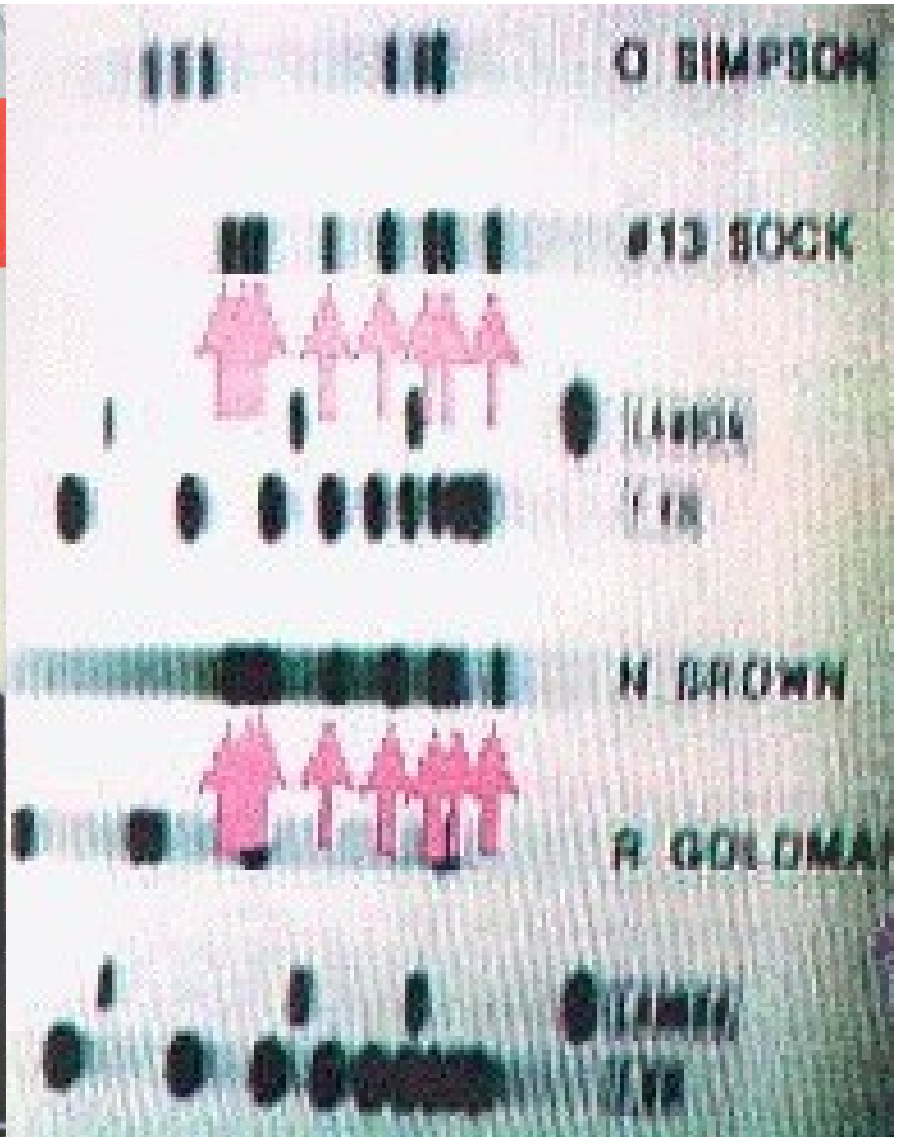
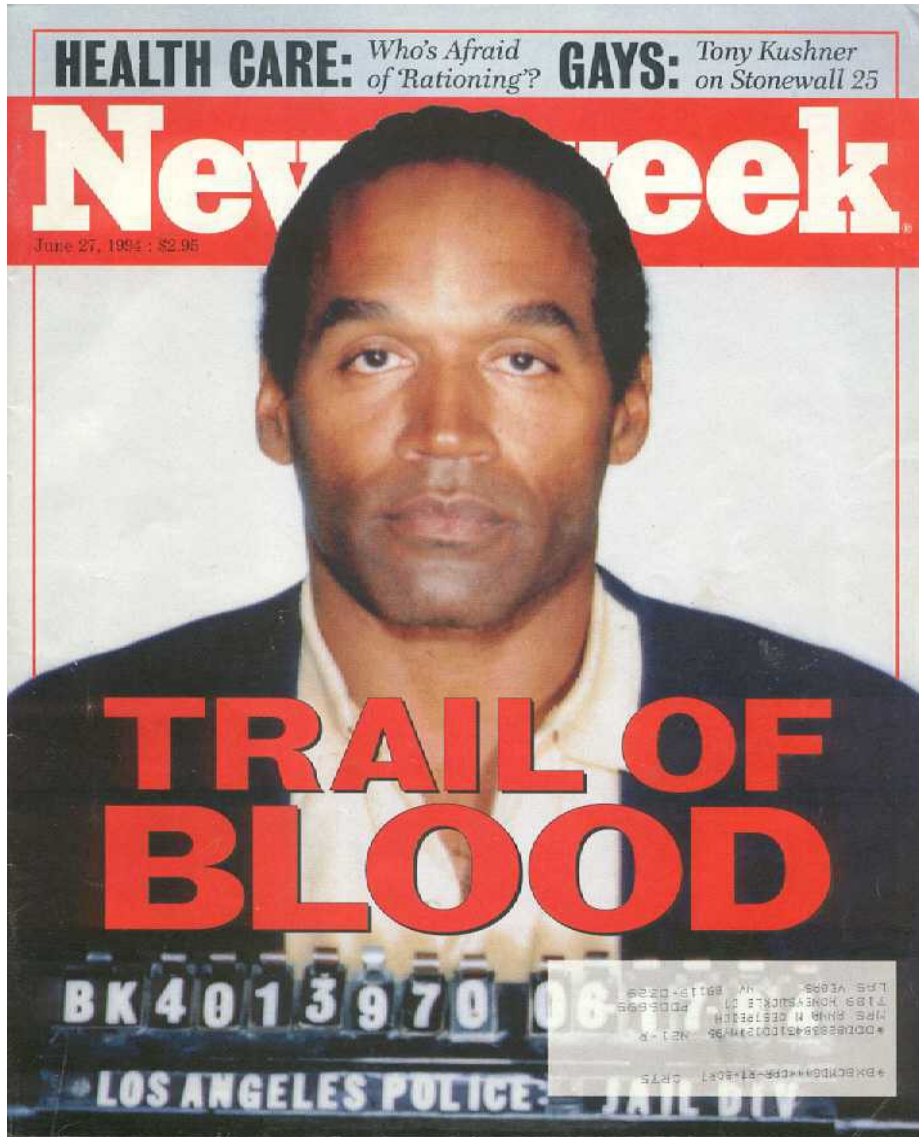


SPORNO OČETOVSTVO

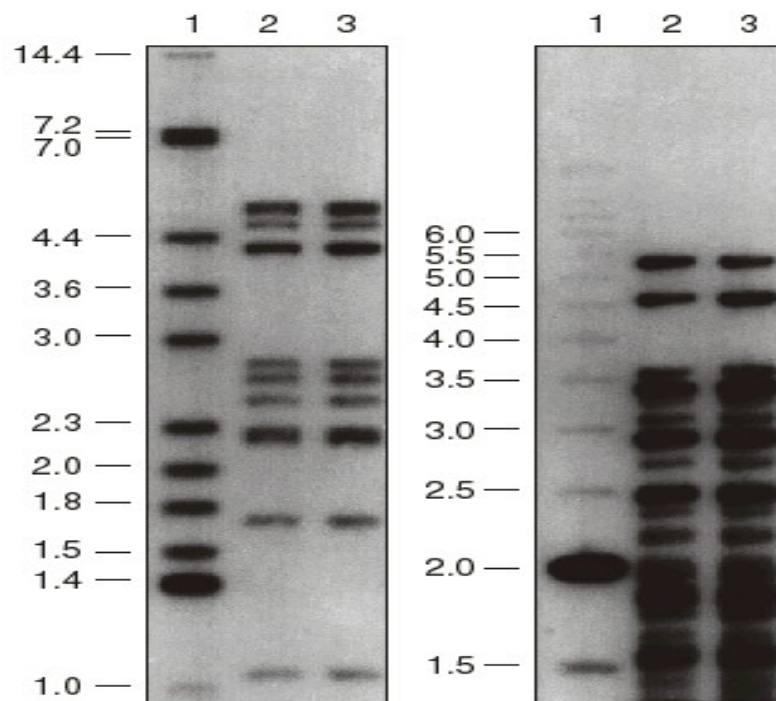


KRIMINALISTIČNA ZADEVA

O.J. Simpson – Umor Nicole Brown 1995



Primer Lewinsky - Clinton



- modro obleko Monice Lewinsky prejme v preiskavo v FBI
- RFLP preiskava madeža sperme s 7 enolokusnimi sondami
- 3 avgust 1998 odvzem krvi predsedniku Clintonu
- Ujemanje med profiloma DNA: verjetnost, da sperma izvira od predsednika je $1:7,8 \times 10^{12}$ bolj verjetna kot če od neke druge osebe

OMEJITVE PREISKAV Z RFLP

- Dolgotrajnost
 - trajajo od 7-10 dno
- Zahteva veliko količino kvalitetne DNK
 - Problem sledi iz kaznivih dejanj, ki vsebujejo velikokrat razgrajeno DNK
- Southernova metoda ima omejeno moč razločevanja
 - Problematična razdelitev alelov v velikostne razrede “bin”

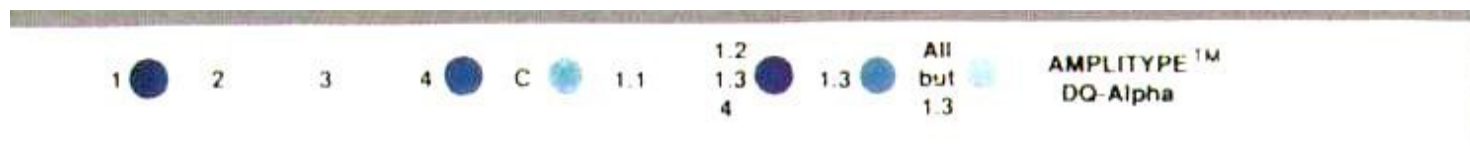
METODA AmpliFLP

(Polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov)

- Pomnoževanje lokusov z metodo PCR
 - Detekcija barvanje s srebrom, kasneje fluorescentna barvila
 - Količina DNA v vzorcu zmanjšala do 500 pg
- Preiskava dveh vrst dolžinskih polimorfizmov -
 - lokusov VNTR (le nekaj)
 - lokusov STR
- Ločevanje -
 - Poliakrilamidna elektroforeza (opušča)
 - Kapilarna elektroforeza (POP4)
- Analiza zelo hitra 1- 2 dni

AMPLITYPE

- AmpliType - Hibridizacija točkovnega odtisa prva forenzična genetska metoda, ki je temeljila na PCR
- Detekcija sprememb v sestavi nukleotidnega zaporedja – aleli razlikujejo v nukleotidnem zaporedju
 - DQA1(HLA lokusi) in PM (DNA 5 različnih proteinov)

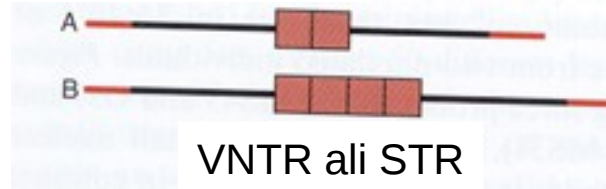


METODA AmpliFLP

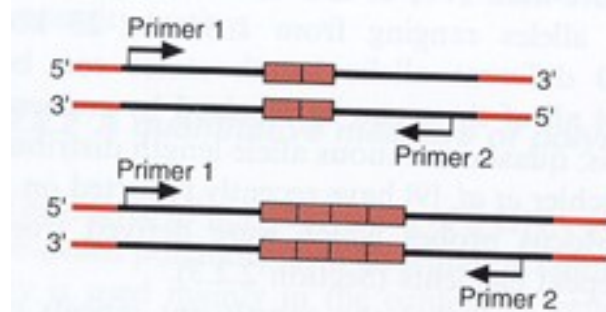


Iz 1 kopije DNA v 20 ciklih
2.097.157 kopij

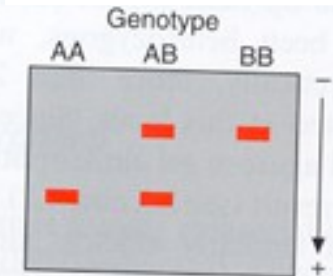
a) Izolirana DNA



b) Metoda PCR



c) Elektroforeza

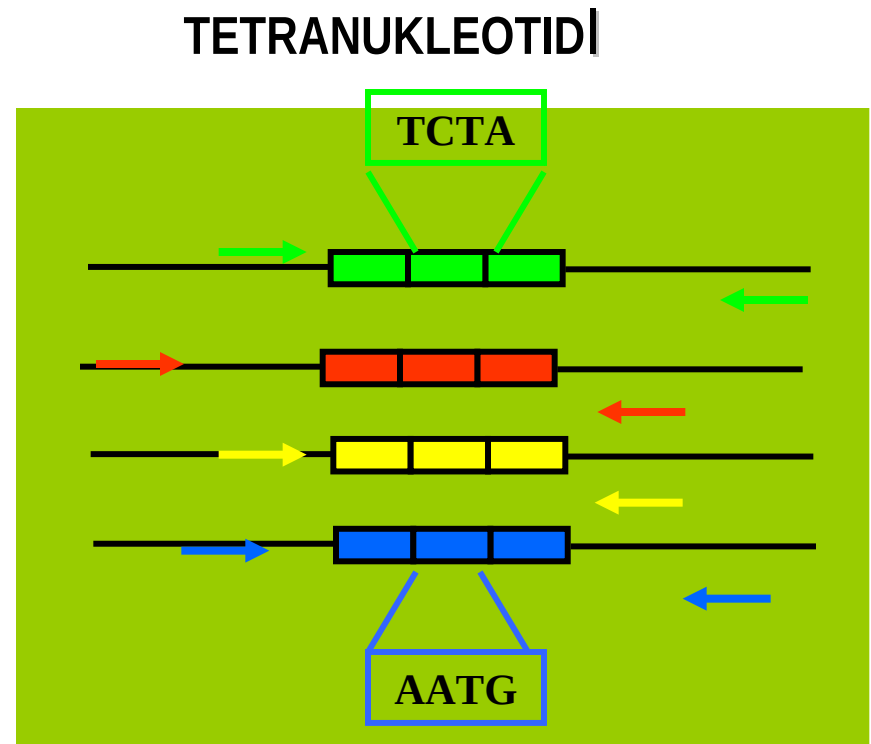


Posamezniki homo ali heteroozigoti

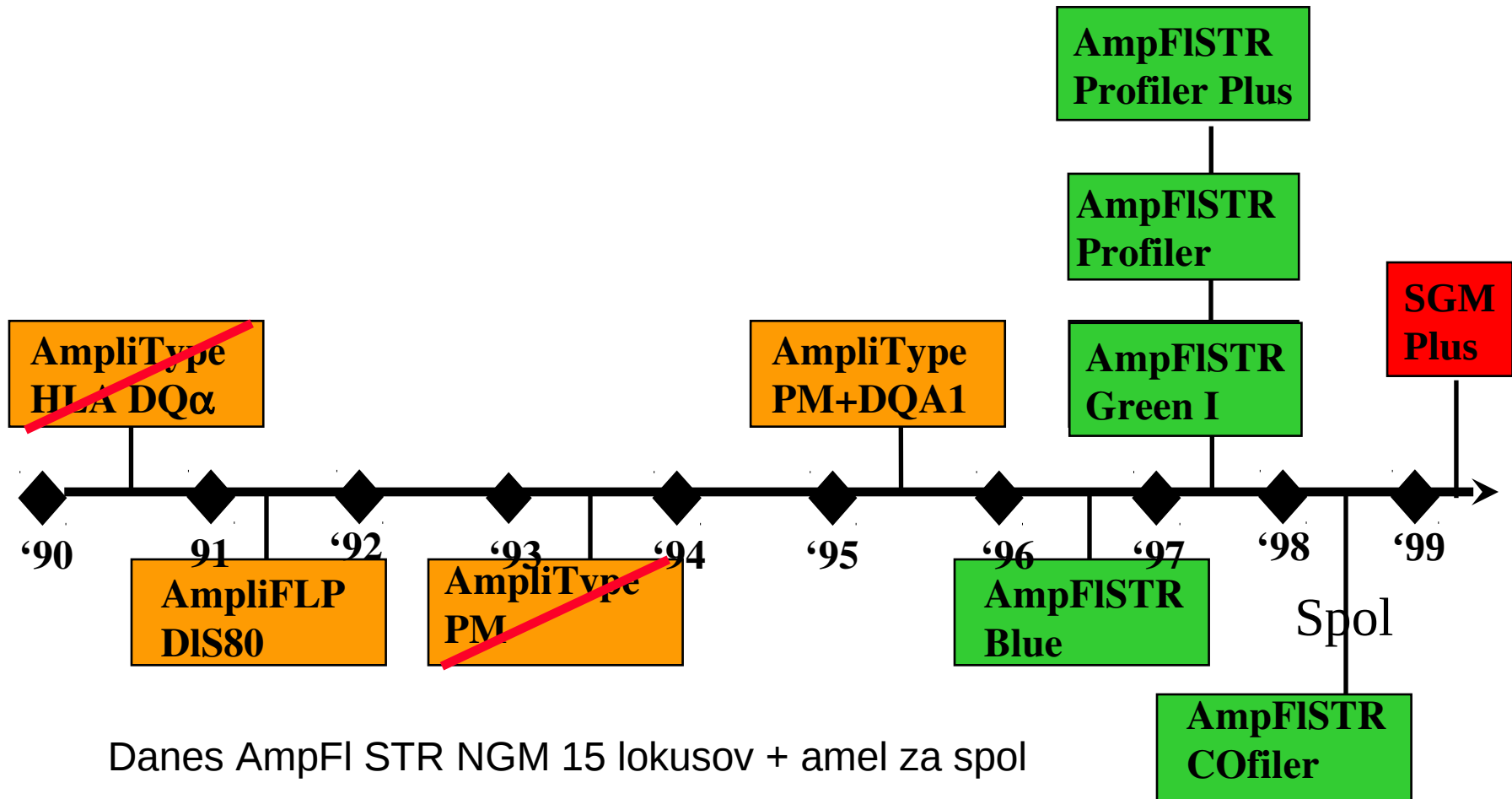
Prve preiskave – enojni PCR
FKKT 2011

Razvoj metode AmpliFLP

- Standardni genetski označevalci lokusi STR z osnovnim motivom 4 – 5 bp.
- Prehod iz barvanja s srebrom na fluorescentna barvila.
- Uporaba genetskih analizatorjev – avtomatizacija preiskav.
- Razločevanja dolžine alelov na en bp natančno.
- Možnost hkratnega PCR – sočasna analiza 15 lokusov STR
- Količina vzorca za analizo zmanjšuje
- Povečuje uspešnost analize degradirane DNA.
- Uspešnost analize mešanih sledi.
- Povečanje stopnje razločevanja.

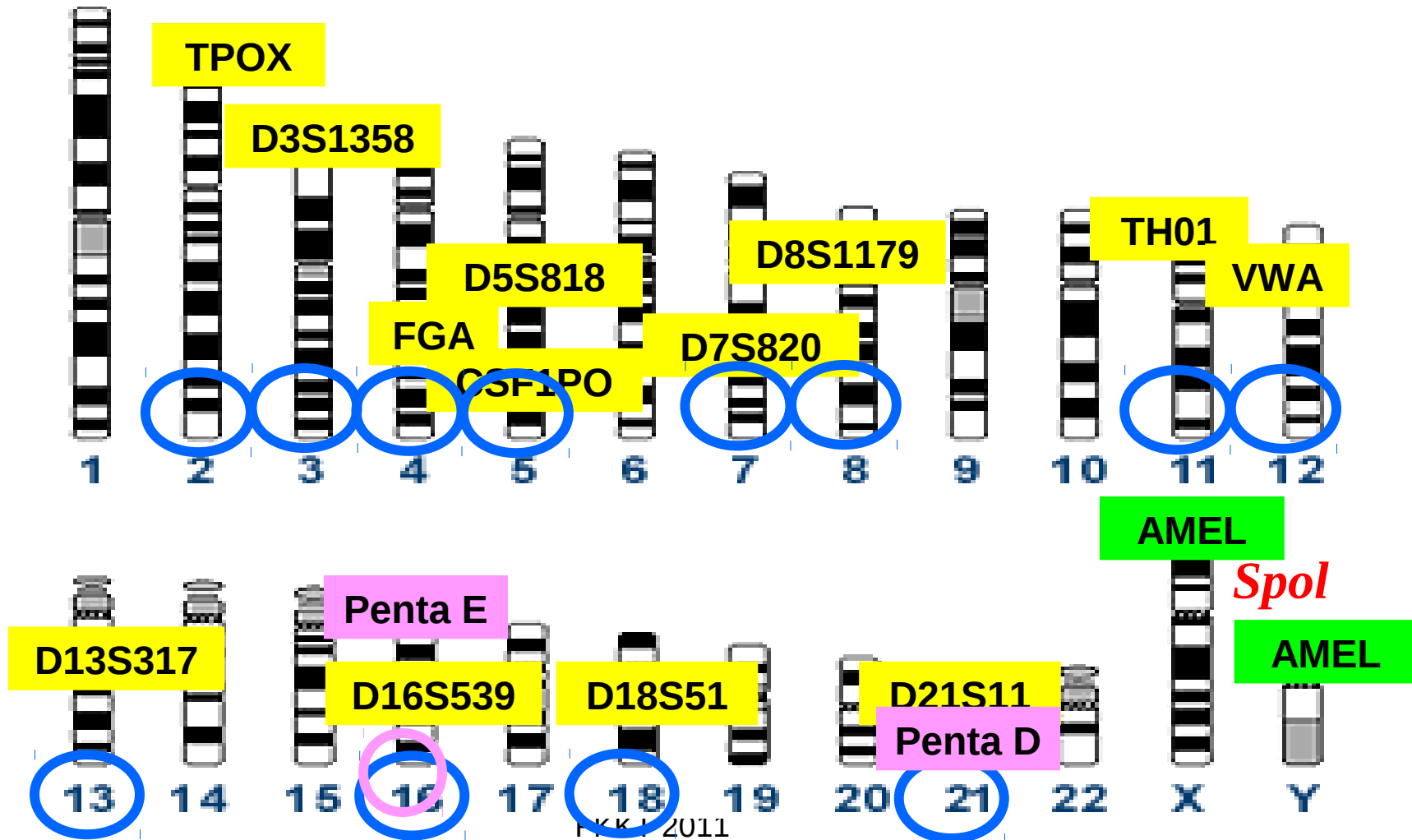


Kronološki razvoj komercialnih kompletov

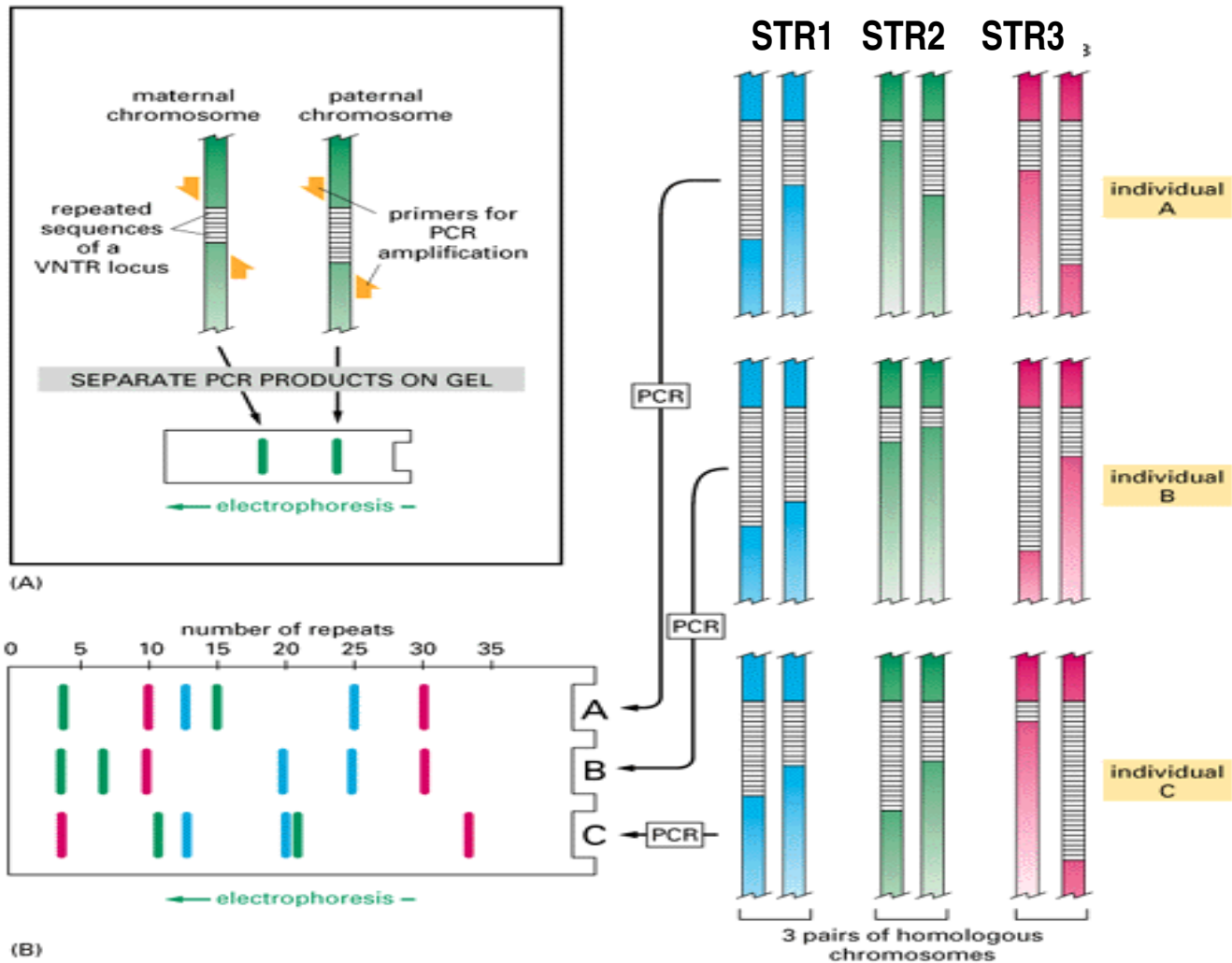


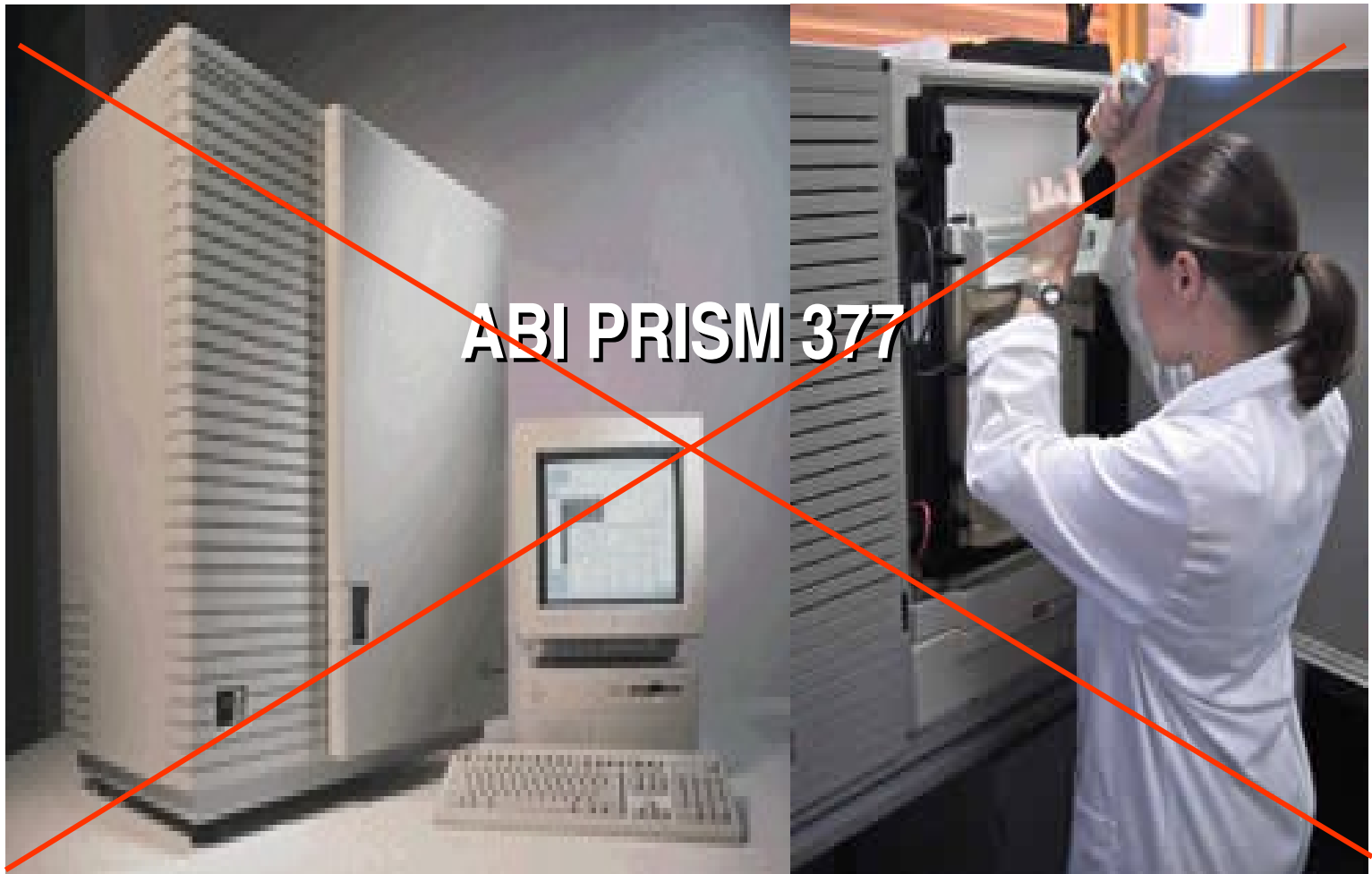
Danes AmpFI STR NGM 15 lokusov + amel za spol

Položaj lokusov STR in gena za spol



Profiliranje STR – hkratni PCR





Gelski genetski analizator za določanje nukleotidnega zaporedja ali polimorfizma dolžin pomnoženih produktov

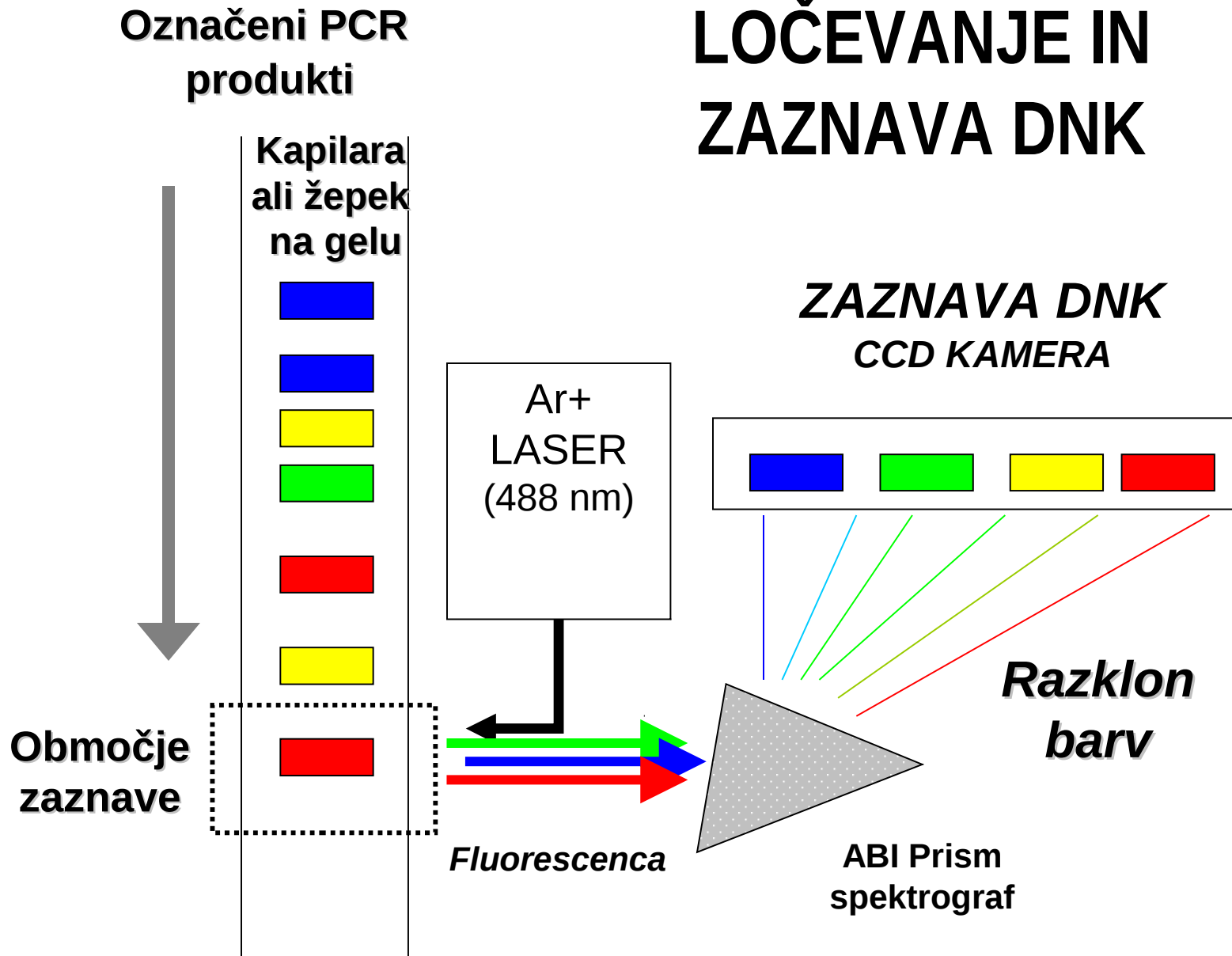


ABI PRISM 310

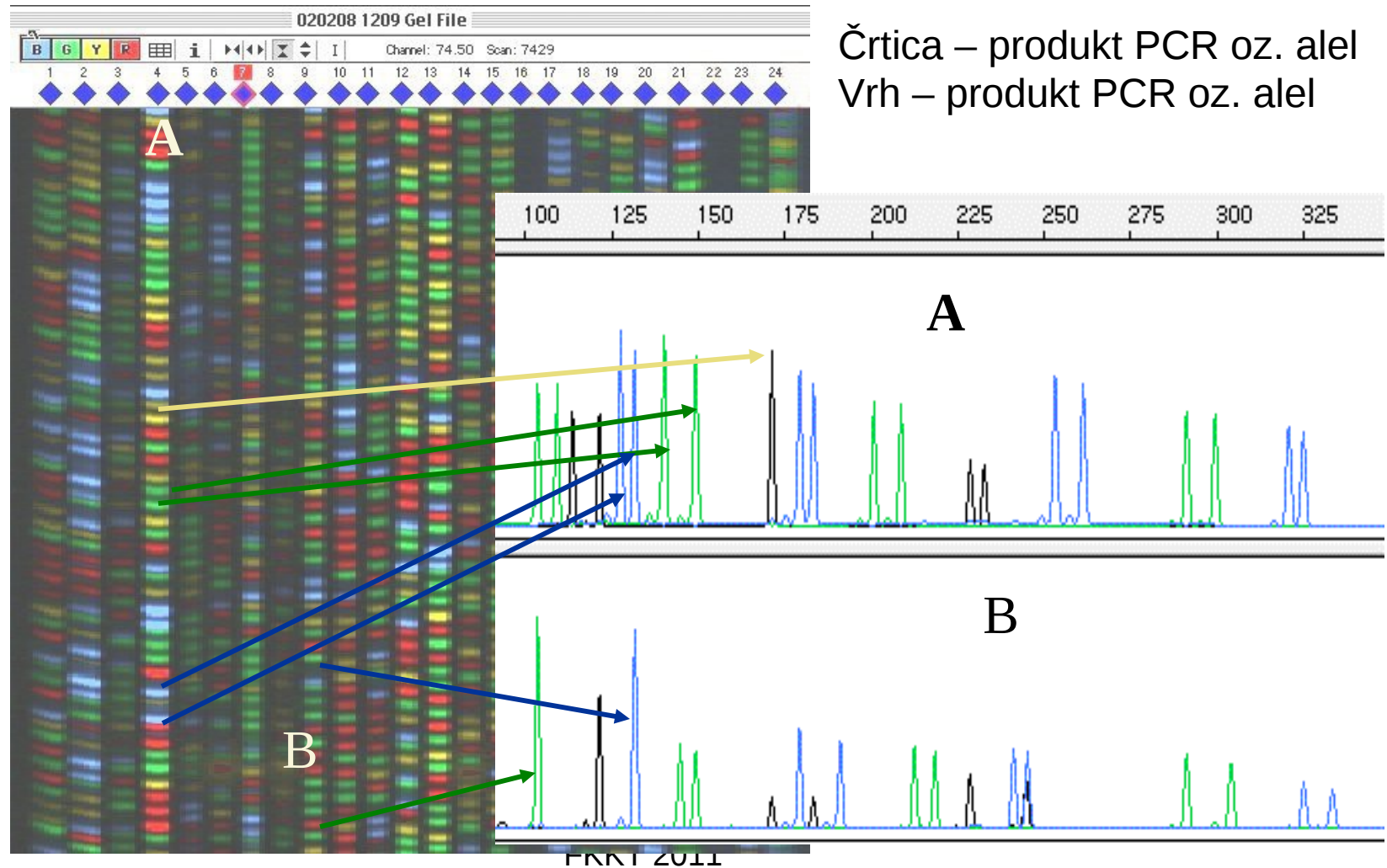


Kapilarni genetski analizator za določanje nukleotidnega zaporedja ali polimorfizma dolžin pomnoženih produktov

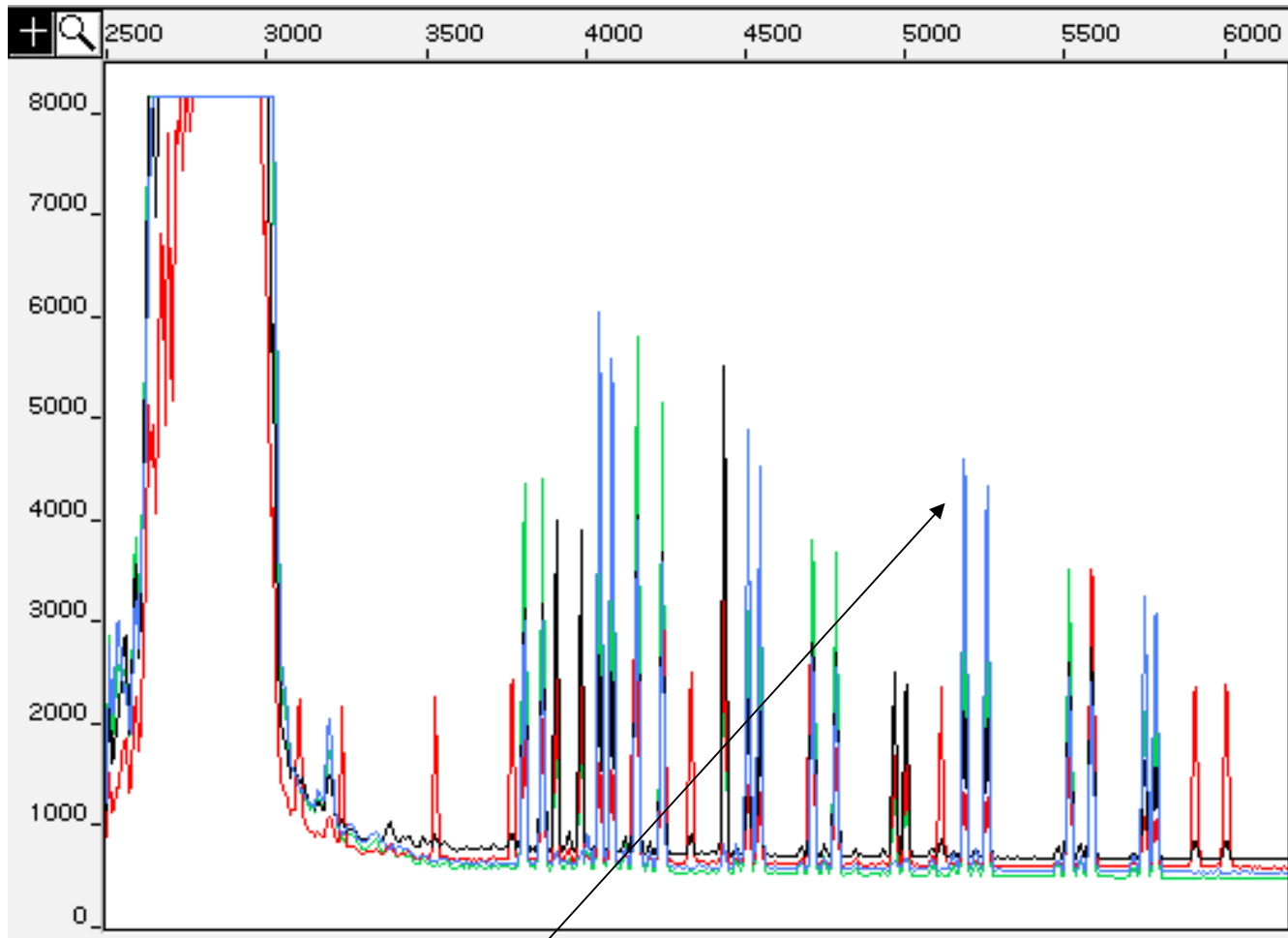
LOČEVANJE IN ZAZNAVA DNK



Rezultat gelske elektroforeze

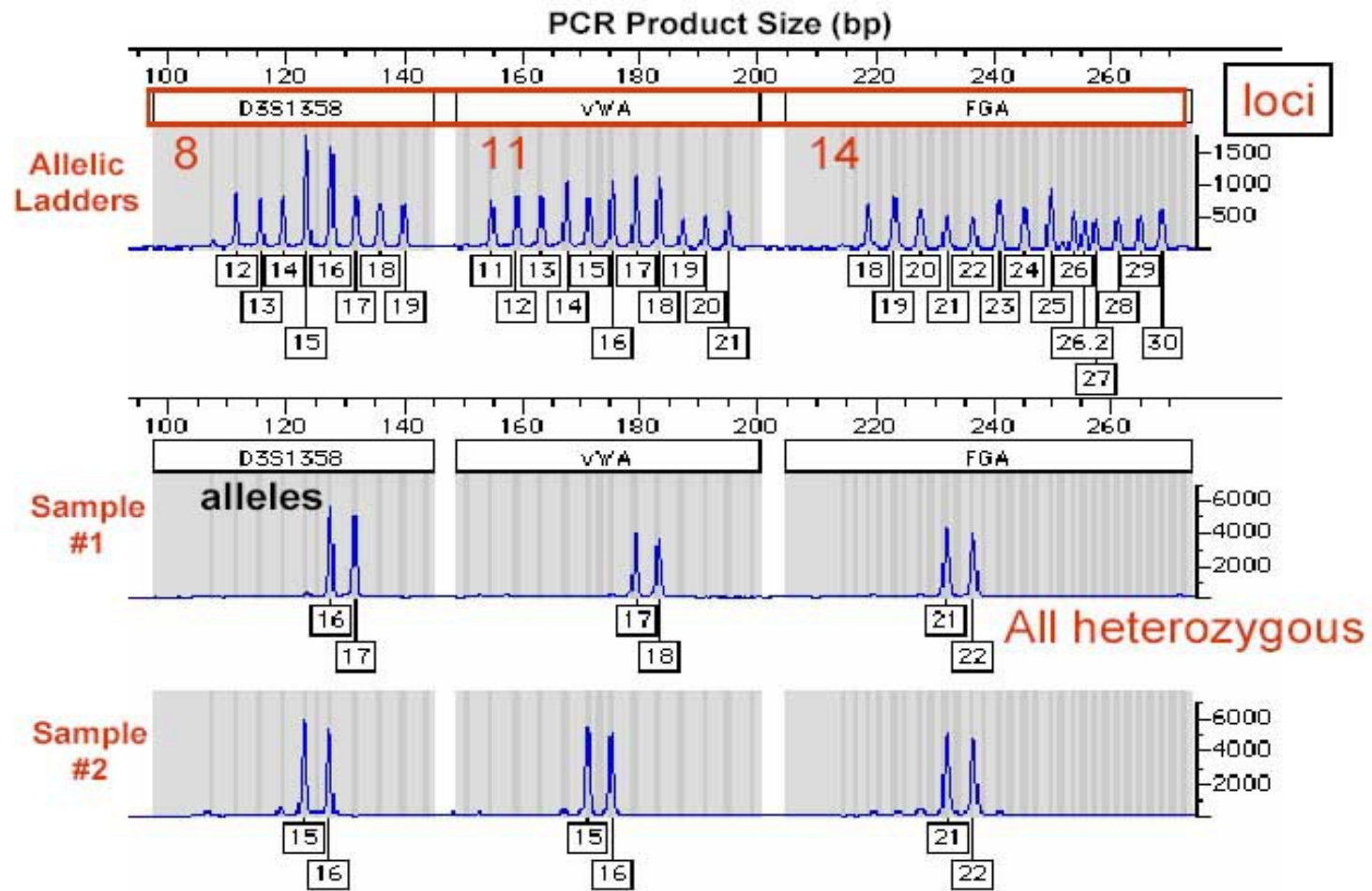


Rezultat kapilarne elektroforeze



Vrh predstavlja produkt PCR oz. alel za preiskovani lokus STR

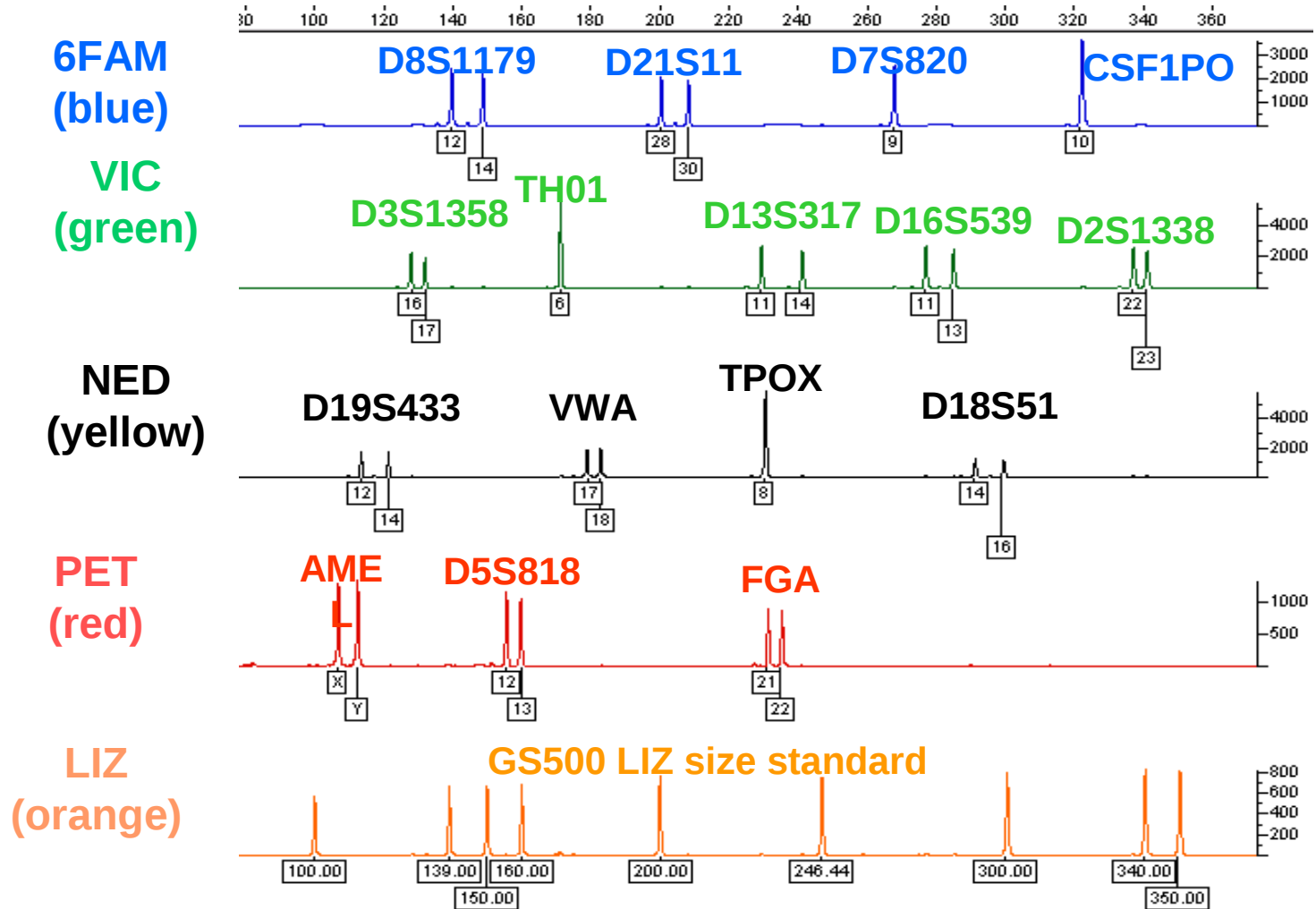
Določevanje profila DNA – delni profil



- Določitev alelov temelji na primerjavi z alelno lestvico
- Analiza poteka avtomatsko z računalniškim programom

Profil STR

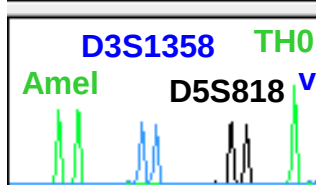
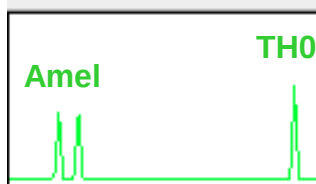
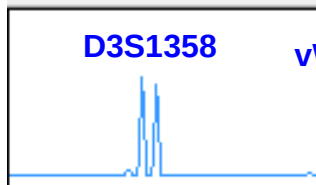
AmpFISTR® Identifiler™



FKKT 2011

Večanje moči razločevanja

VELIKOST PCR (bp)
100 125 150 175 200 225 250 275 300 325



Osnova statističnih izračunov

Homozigot: $P(A_i/A_i) = p^2$

Heterozigot: $P(A_i/A_j) = 2pq$ Verjetnost
naključnega ujemanja = $1/(P_1)(P_2)..$

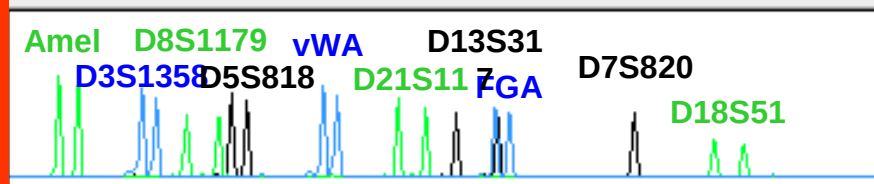
P_n

Moč diskriminacije

1:5000

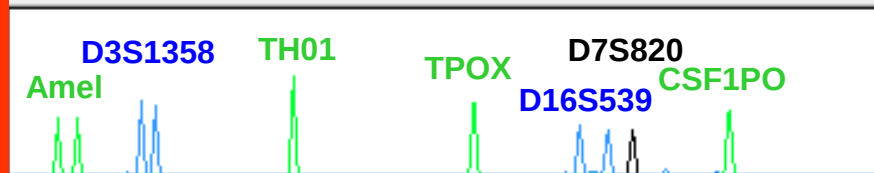
1:410

$1:3.6 \times 10^9$



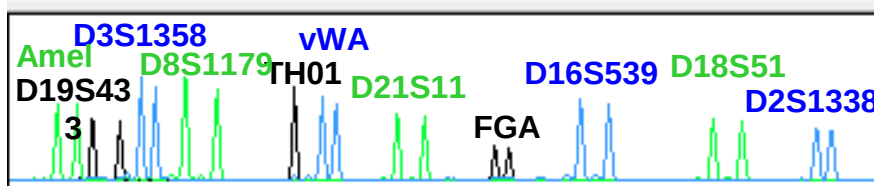
Profiler Plus™

$1:9.6 \times 10^{10}$



COfiler™

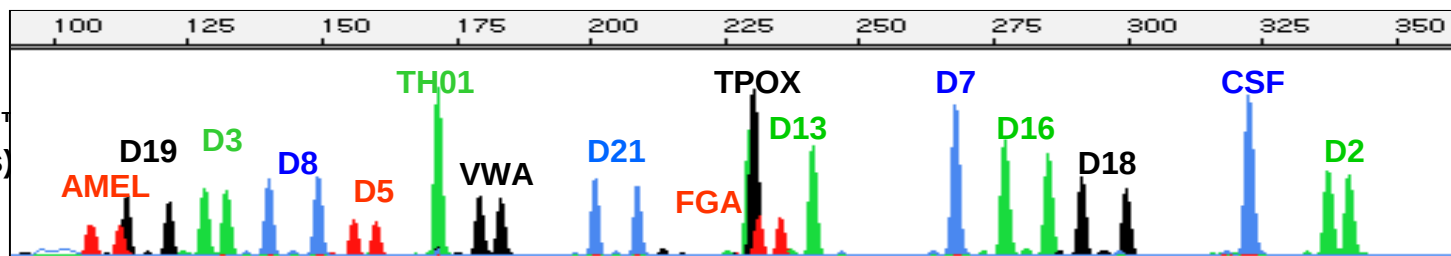
$1:8.4 \times 10^5$



SGM Plus™

$1:3.3 \times 10^{12}$

AmpFISTR® Identifier[®]
(Applied Biosystems)



Vnos v
evidenco
DNK:
16,17
17,18
21,22
12,14
28,30
14,16
12,13
11,14
9,9
9,11
6,6
8,8
10,10

Lokus	alel	vrednost	alel	vrednost	1 in	Skupaj	P
D3S1358	16	0.2533	17	0.2152	9.17	9.17	R
VWA	17	0.2815	18	0.2003	8.87	81	A
FGA	21	0.1854	22	0.2185	12.35	1005	V
D8S1179	12	0.1854	14	0.1656	16.29	16,364	I
D21S11	28	0.1589	30	0.2782	11.31	185,073	O
D18S51	14	0.1374	16	0.1391	26.18	4,845,217	
D5S818	12	0.3841	13	0.1407	9.25	44,818,259	P
D13S317	11	0.3394	14	0.0480	30.69	1.38 x 10 ⁹	R
D7S820	9	0.1772			31.85	4.38 x 10 ¹⁰	O
D16S539	9	0.1126	11	0.3212	13.8	6.05 x 10 ¹¹	D
TH01	6	0.2318			18.62	1.13 x 10 ¹³	U
TPOX	8	0.5348			3.50	3.94 x 10 ¹³	K
CSF1PO	10	0.2169			21.28	8.37 x 10 ¹⁴	T

Verjetnost naključnega ujemanja je v kavkazijski populaciji 1 oseba na 3.94 x10¹³

Populacijska analiza slovenske populacije

108

K. Drobnič et al./Forensic Science International 115 (2001) 107–109

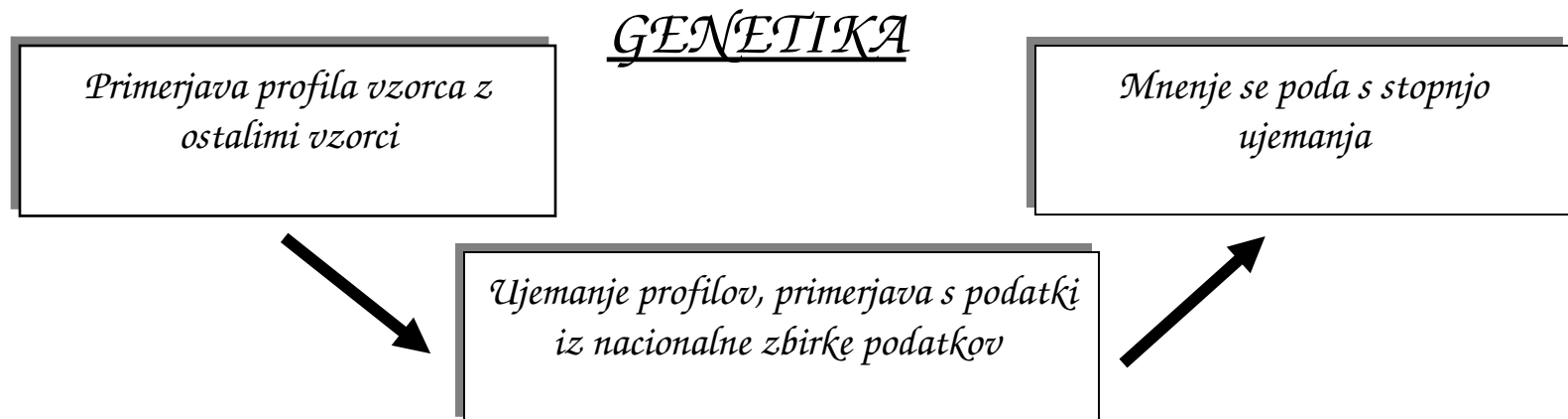
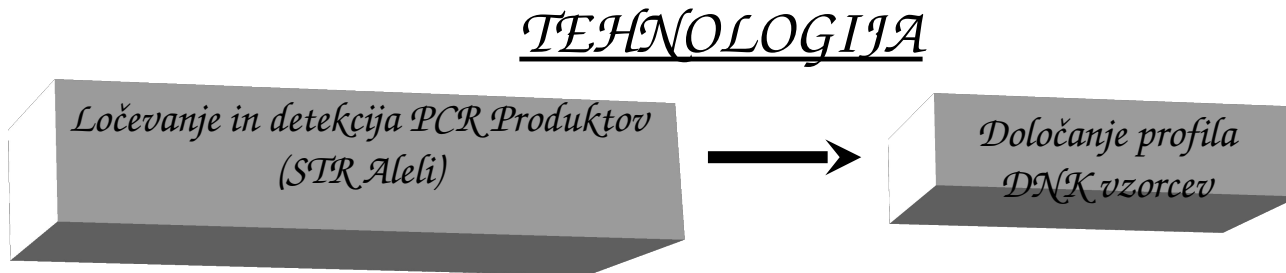
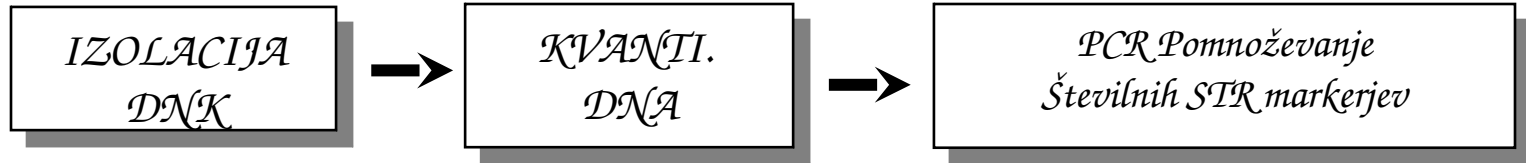
Table 1
Observed allele frequencies for AmpFISTR SGM Plus loci in a Slovene population sample (321 individuals)^a

Allele	D16S539	D2S1338	D3S1358	vWA	D18S51	D21S11	D8S1179	D19S433	FGA	TH01
6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.26168
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.11059
8	0.02336	–	–	–	–	–	0.00467	–	–	0.12305
9	0.10125	–	–	–	–	–	0.00467	–	–	0.16355
9.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.32710
10	0.05919	–	–	–	0.01090	–	0.06231	–	–	0.01402
11	0.27570	–	–	–	0.00779	–	0.05919	0.00156	–	–
12	0.30530	–	–	–	0.11838	–	0.16822	0.08879	–	–
12.2	–	–	–	–	–	–	–	0.00156	–	–
13	0.19938	–	0.00312	0.00467	0.12617	–	0.31153	0.25078	–	–
13.2	–	–	–	–	–	–	–	0.01246	–	–
14	0.03271	–	0.10903	0.09969	0.17290	–	0.24143	0.34579	–	–
14.2	–	–	–	–	–	–	–	0.02336	–	–
15	0.00312	0.00312	0.23364	0.10125	0.15109	–	0.12305	0.14642	–	–
15.2	–	–	–	–	–	–	–	0.05296	–	–
16	–	0.05452	0.25234	0.17913	0.15888	–	0.02336	0.04673	0.00156	–
16.2	–	–	–	–	–	–	–	0.02492	–	–
17	–	0.21028	0.22897	0.27882	0.09190	–	0.00156	0.00312	–	–
17.2	–	–	–	–	–	–	–	0.00156	–	–
18	–	0.09813	0.15888	0.25234	0.07632	–	–	–	0.01402	–
19	–	0.09969	0.01402	0.06854	0.04206	–	–	–	0.07321	–
20	–	0.14798	–	0.01402	0.02648	–	–	–	0.11838	–
20.2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.00156	–
21	–	0.03427	–	0.00156	0.00935	–	–	–	0.16822	–
21.2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.00312	–
22	–	0.01713	–	–	0.00779	–	–	–	0.22118	–
22.2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.00312	–
23	–	0.09657	–	–	–	–	–	–	0.13863	–
23.2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.00779	–
24	–	0.09969	–	–	–	–	–	–	0.13551	–
24.2	–	–	–	–	–	–	–	–	0.00156	–
25	–	0.12305	–	–	–	–	–	–	0.08100	–
26	–	0.01090	–	–	–	0.00312	–	–	0.02804	–
27	–	0.00467	–	–	–	0.03583	–	–	0.00156	–
28	–	–	–	–	–	0.16667	–	–	0.00156	–
29	–	–	–	–	–	0.19782	–	–	–	–
29.2	–	–	–	–	–	0.00156	–	–	–	–
30	–	–	–	–	–	0.20561	–	–	–	–
30.2	–	–	–	–	–	0.06698	–	–	–	–
31	–	–	–	–	–	0.07477	–	–	–	–
31.2	–	–	–	–	–	0.09346	–	–	–	–
32	–	–	–	–	–	0.01402	–	–	–	–
32.2	–	–	–	–	–	0.10436	–	–	–	–
33.2	–	–	–	–	–	0.03271	–	–	–	–
34.2	–	–	–	–	–	0.00312	–	–	–	–
H	0.209	0.100	0.196	0.187	0.078	0.137	0.227	0.227	0.140	0.231
PD	0.915	0.968	0.920	0.931	0.967	0.961	0.928	0.926	0.962	0.912
PE	0.567	0.749	0.586	0.611	0.747	0.718	0.600	0.589	0.715	0.556
P	0.751	0.185	0.482	0.916	0.291	0.438	0.862	0.642	0.927	0.939

^a H (observed homozygosity), PD (observed power of discrimination), PE (probability of exclusion), P (Hardy–Weinberg equilibrium, exact test based on 2000 shufflings).

Shema poteka forenzične preiskave DNA

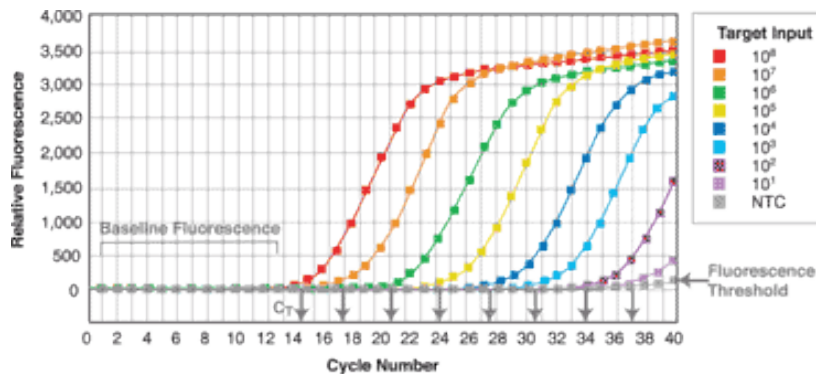
Vzorci iz kazenskih zadev
ali spornih očetovstev



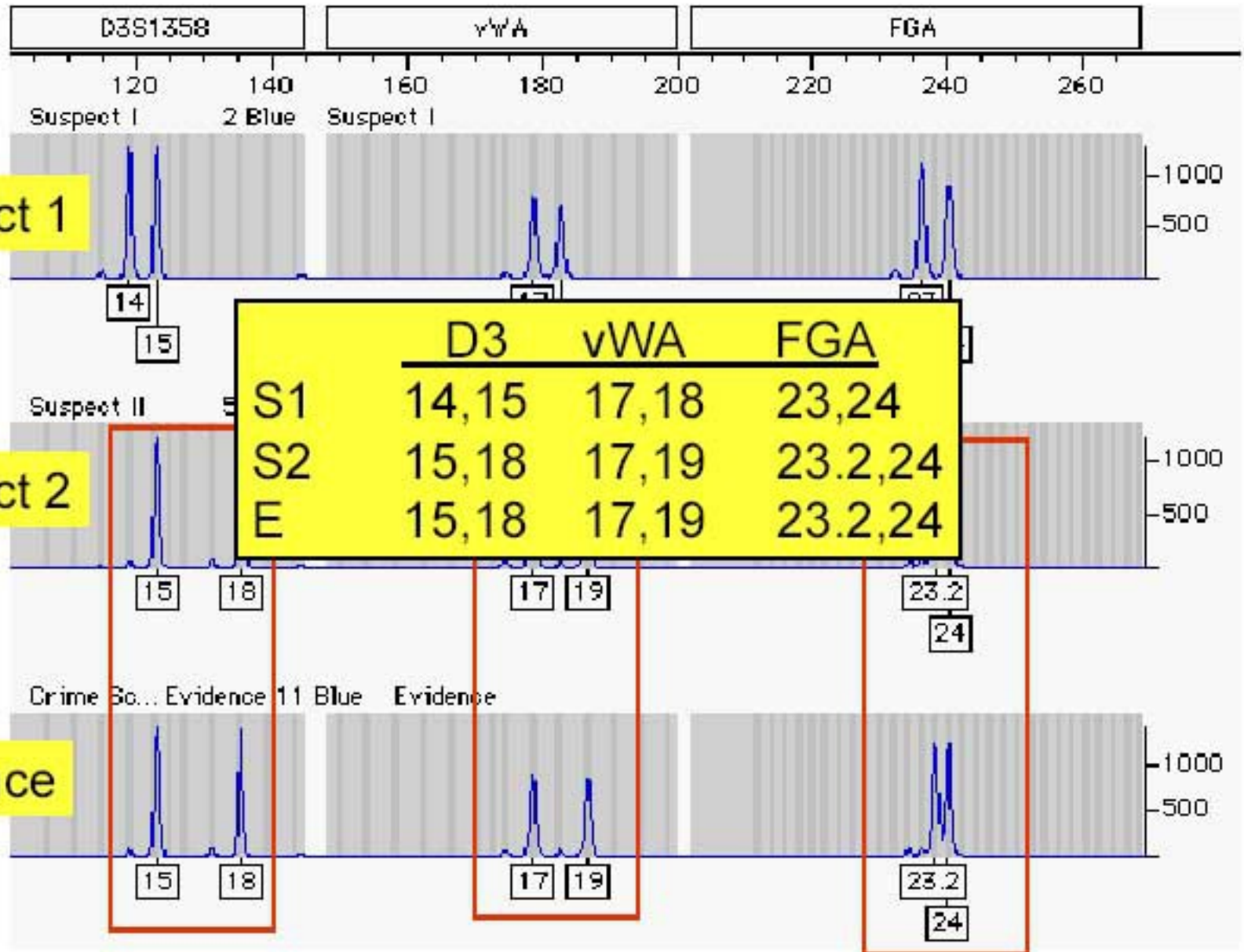
Določanje koncentracije DNA



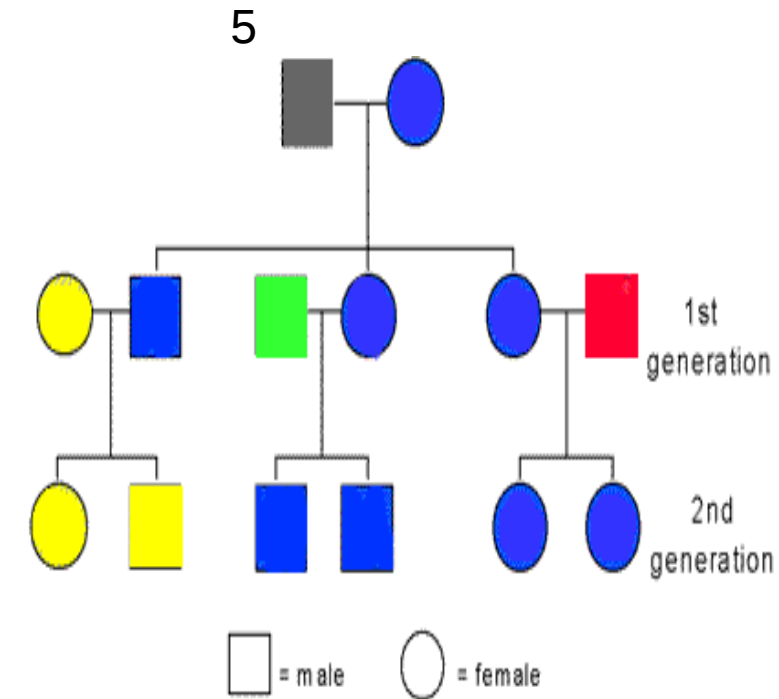
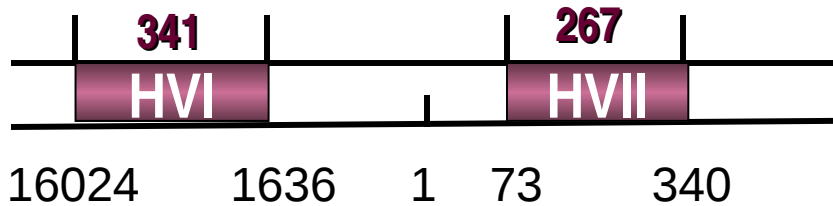
- Metoda PCR v realnem času – kvantitativni PCR
- Zaznavo 1 pg jedrne DNK
 - Telesna celica vsebuje ≈ 6 pg DNK
- Prisotnost inhibitorjev



Primerjava profila STR sledi z osumljenci

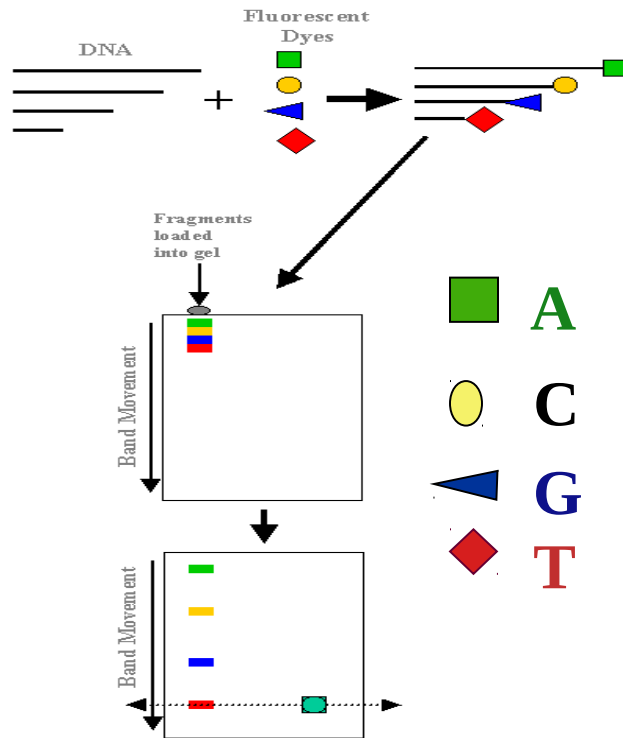


Preiskava mtDNK

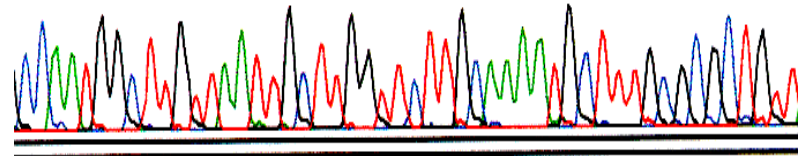


- Visoka variabilnost HVI in HVII področij
 - AFRIŠKA P.- 14 MESTIH
 - KAVKAŠKE P. - 8 MESTIH
- 604 Američanov/ 451 haplotipov mtDNK
- Deduje po materi - stopnja razločevanja nižja od STR-ov
- Ugotavljanje oddaljenih sorodstvenih povezav
- Moč ujemanja dveh zaporedji mtDNA se ovrednoti z metodo štetja

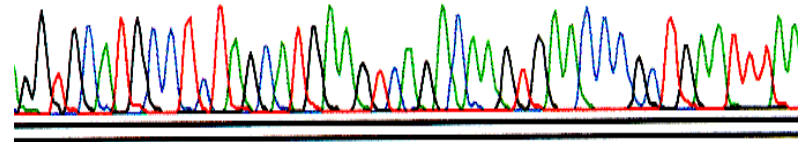
Določanje zaporedja mtDNK



CCAATGGCTTGTAAATGCTTGGTCTTGCAAAAATGC TTGCGCGCTGTT
 180 190 200 210 220



GGTGCATGCCTCTAGCATGAAGTCA GACAAGTGAACCCGCTGAATTTAA
 300 310 320 330 340

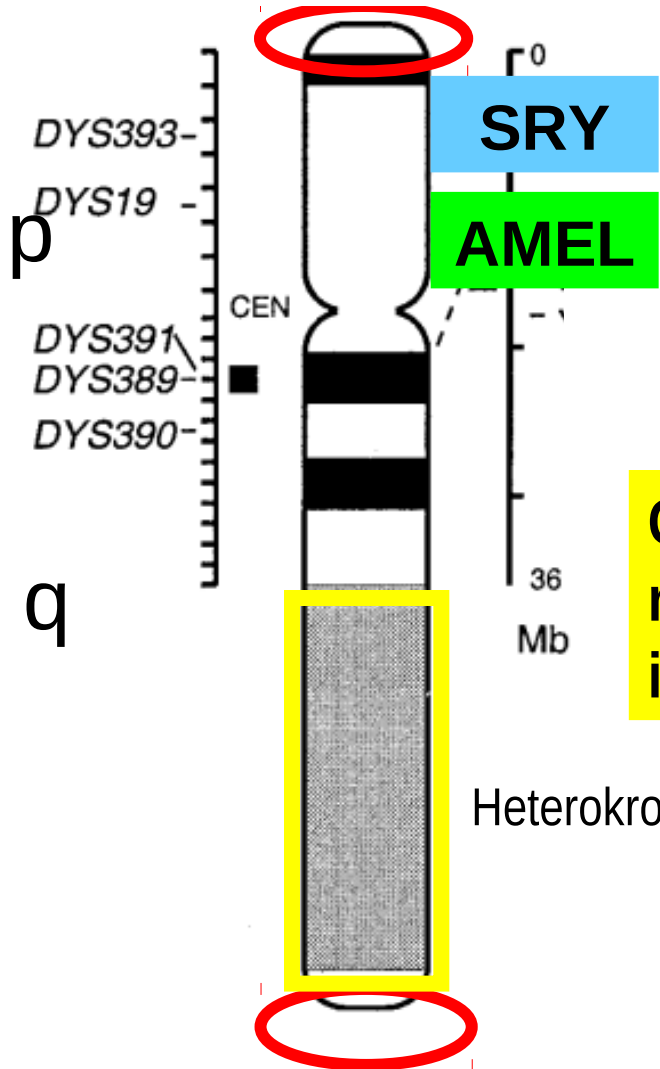


- Analiza na podlagi primerjave z Andersonovim referenčnim zaporedjem (Nature 1981; CRS); razlike zapišejo- 16325 C
 - AFRIŠKA P.- 14 MESTIH
 - KAVKAŠKE P. - 8 MESTIH
 - 604 Američanov/ 451 haplotipov mtDNK

Preiskave kromosoma Y

- Splošne značilnosti kromosoma Y
 - Ni nujen za življenje
 - Polovica sestavljena iz tandemskih ponovitev satelitne DNA, preostali del le malo genov
 - Psevdoavtosomalni regini na distalnih delih kromosoma Y odgovorni za parjenje s kromosomom X in rekombinacijo
 - Ostali del kromosoma Y se ne rekombinira – nerekombinirajoči se Y ali moško specifična regija – MSY
 - MSY v haploidnem stanju
 - Prenaša iz očeta na sina

Shema kromosoma Y



SRY ~60 Mb velik (le kromosom 22 manjši)

AMEL

~2.5 Mb krajna konca rekombinirata s kromosomom X (PAR1 in PAR2)

Genetske variacije na številnih mestih na kromosomu Y se med seboj kombinirajo in tvorijo haplotip vzorca

Heterokromatin

Preiskave Y-STR se uporabljajo

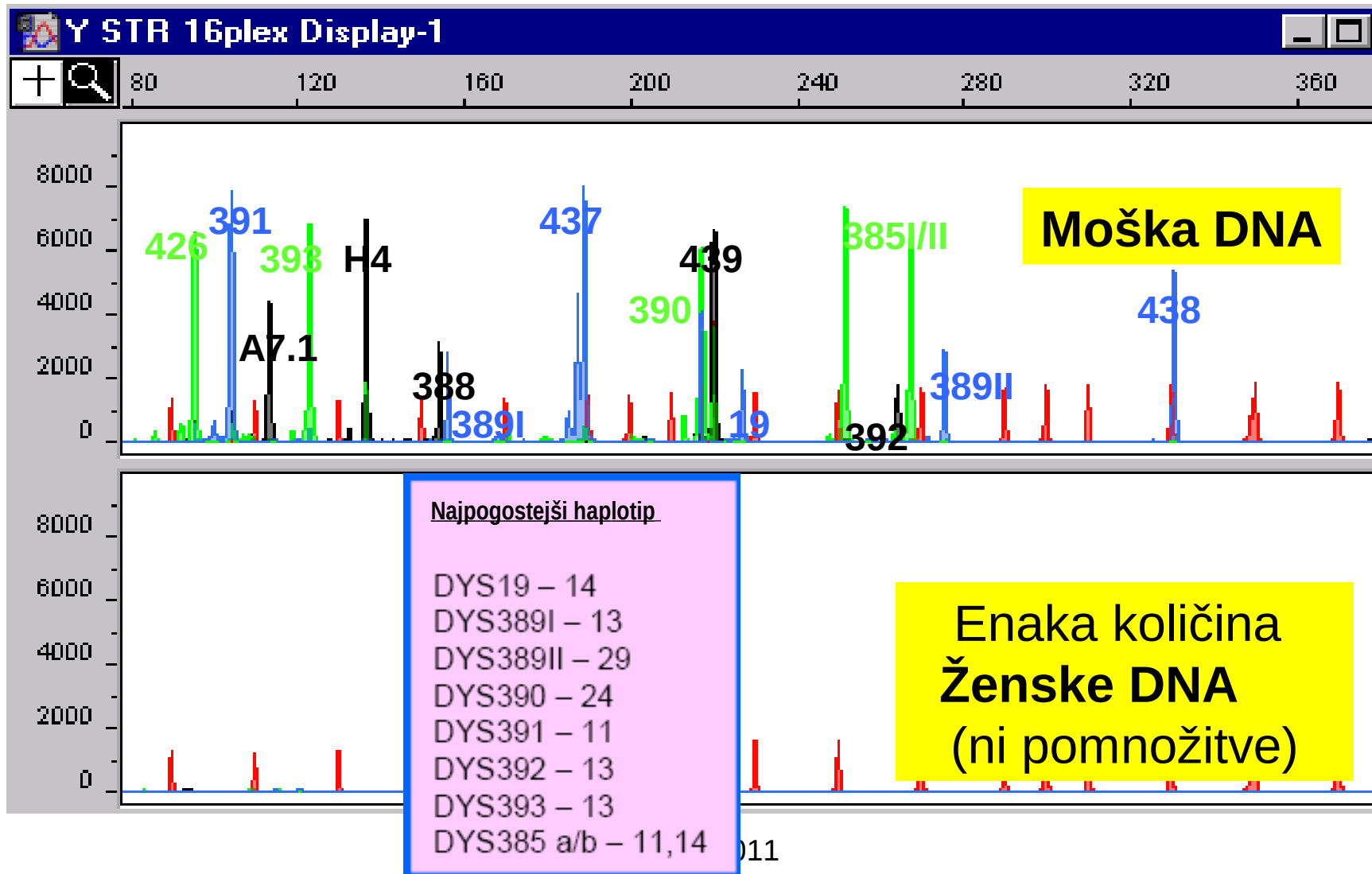
- pri mešanih vzorcih z veliko ženske DNA
- ugotavljanje sorodstvenih razmerij in identitet
- evolucijske - migracijske študije

Označevalci STR na kromosomu Y – regija MSY

Marker Name	GenBank Accession	Repeat Motif	Allele Range	PCR Product Sizes	Reference
DYS19	X77751	TAGA	8-16	178-210 bp	Roewer 1992
DYS385	Z93950	GAAA	10-22	252-300 bp	Schneider 1998
DYS388	G09695	ATT	12-17	128-143 bp	Roewer 1992
DYS389 I	G09600	(TCTG) (TCTA)	I: 7-13	239-263 bp	Roewer 1992
DYS389 II	G09600	(TCTG) (TCTA)	II:23-31	353-385 bp	Roewer 1992
DYS390	G09611	(TCTA) (TCTG)	18-27	191-227 bp	Roewer 1992
DYS391	G09613	TCTA	8-13	275-295 bp	Roewer 1992
DYS392	G09867	TAT	7-16	236-263 bp	Kayser 1997
DYS393	G09601	AGAT	9-15	108-132 bp	Kayser 1997
YCAIII	AC006370	CA	19-25	192-204 bp	Kayser 1997
DYS434	AC002992	ATCT	8-11	110-122 bp	Ayub 2000
DYS435	AC002992	TGGA	9-13	210-228 bp	Ayub 2000
DYS436	AC005820	GTT	10-15	128-143 bp	Ayub 2000
DYS437	AC002992	TCTA	8-11	186-202 bp	Ayub 2000
DYS438	AC002531	TTTTCT	6-12	203-233 bp	Ayub 2000
DYS439	AC002992	AGAT	9-14	238-258 bp	Ayub 2000
Y-GATA-A4	G42670	AGAT	11-14	242-254 bp	White 1999
Y-GATA-A7.1	G42675	ATAG	7-12	161-181 bp	White 1999
Y-GATA-A7.2	G42671	TAGA	8-12	174-190 bp	White 1999
Y-GATA-A8	G42672	TCTA	8-14	219-244 bp	White 1999
Y-GATA-A10	G42674	TATC	11-14	160-172 bp	White 1999
Y-GATA-C4	G42673	TATC	11-16	251-271 bp	White 1999
Y-GATA-H4	G42676	TAGA	10-13	362-370 bp	White 1999

**Najpogostejši
označevalci Y
-STR**

Specifično pomnoževanje le moške DNA s Y-STR Megaplexom (16plex s 4 fluorescentnimi barvami)



Razkritje usode družine Romanov

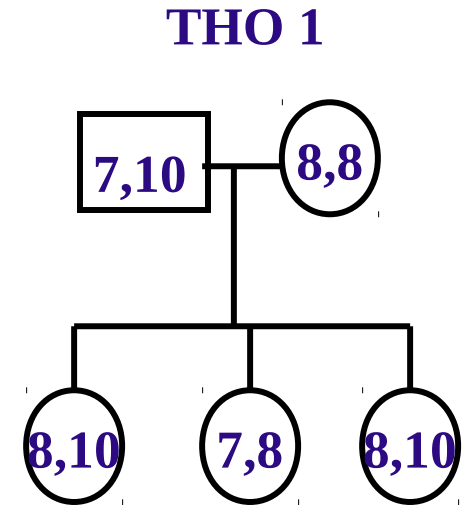
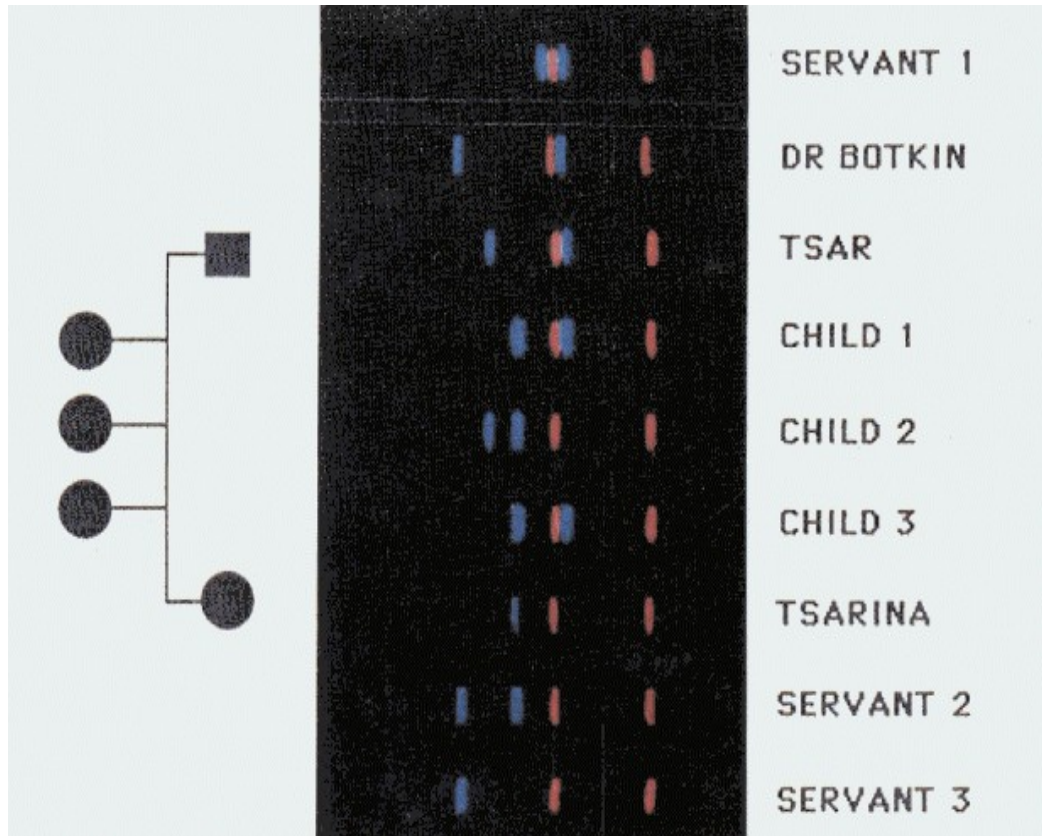
Nikolaj II in Aleksandra Fyodorovna

Olga
Tatjana
Marija
Anastasia
Alexej



- Aprila so jih boljševiki odpeljali v Jekaterinburg
- Ubiti 17. julija 1918 skupaj z zdravnikom in tremi služabniki
- Julija 1991 Jelcin dovoljenje za izkop trupel

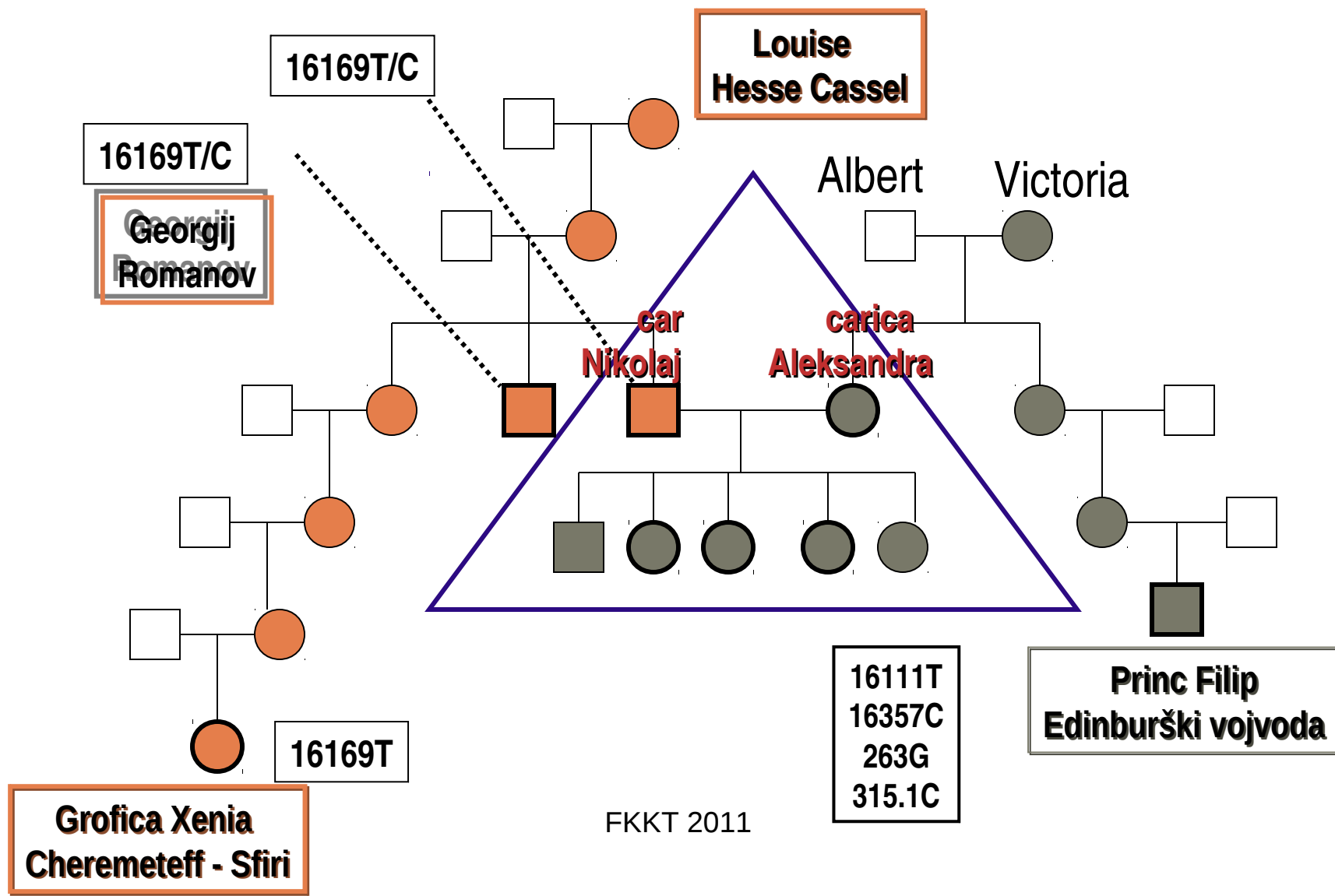
Preiskava lokusov STR



IZLOČENI

- 9,10
- 6,10
- 6, 9
- 6, 6

Družinsko deblo družine Romanov - mtDNA



- v prvem grobišču niso našli okostja carjeviča Alekseja in ene izmed njegovih sester
 - Marija ali Anastazija
- 2007 našli drugo grobišče:
 - najdeni so ostanki dveh oseb
 - ena oseba ženskega spola, stara med 15 in 19 let
 - ena oseba moškega spola, stara med 12 in 15 let
- ruska vlada k sodelovanju povabila dva laboratorija
 - AFDIL in Inštitut sodne medicine Innsbruck
 - DNK preiskava potrdila, da sta osebi pogrešana otroka Nikolaj in Aleksandre Fjodorne Romanov.

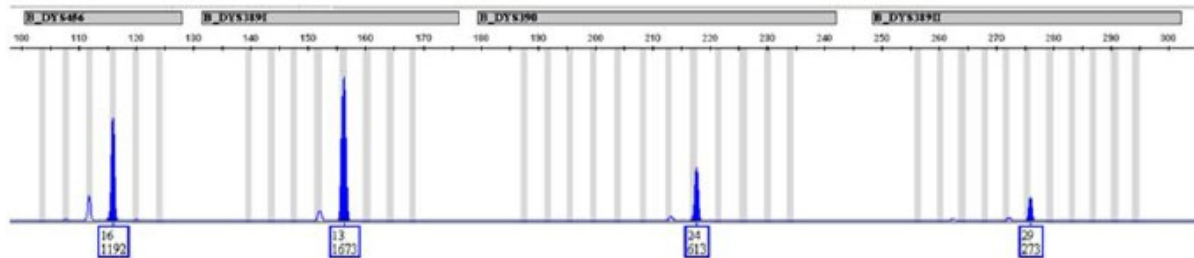
Profili STR družine Romanov

Table 3. Autosomal STR Genotypes for the Romanov Family.

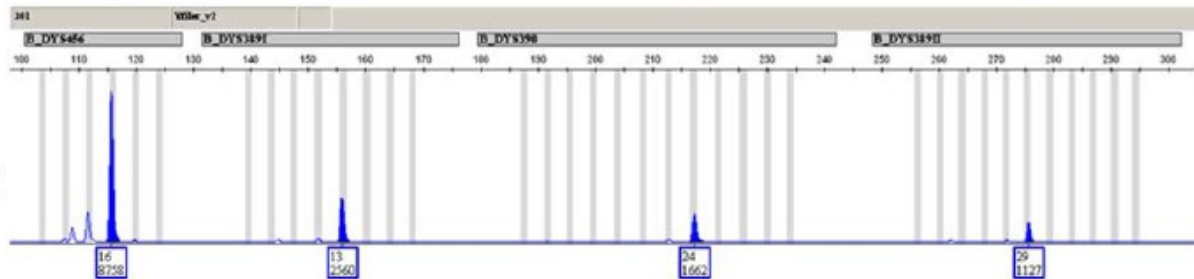
Marker	Sample 4.3	Sample 7.4	Sample 3.46	Sample 5.21	Sample 6.14	Sample 147	Sample 146.1
	Tsar Nicholas II	Tsarina Alexandra	Olga	Tatiana	Maria or Anastasia	Anastasia or Maria	Alexei
Amelog	X, Y	X, X	X, X	X, X	X, X	X, X	X, Y
D3S1358	14, 17	16, 18	17, 18	17, 18	16, 17	17, 18	14, 18
TH01	7, 9.3	8, 8	8, 9.3	7, 8	8, 9.3	7, 8	8, 9.3
D21S11	32.2, 33.2	30, 32.2	30, 33.2	32.2, 33.2	30, 33.2	30, 33.2	32.2, 33.2
D18S51	12, 17	12, 13	12, 12	12, 12	13, 17	12, 17	12, 17
D5S818	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12	12, 12
D13S317	11, 12	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 11	11, 12
D7S820	12, 12	10, 12	12, 12	10, 12	12, 12	10, 12	12, 12
D16S539	11, 14	9, 11	11, 11	11, 11	11, 14	9, 11	11, 14
CSF1PO	10, 12	11, 12	11, 12	11, 12	10, 11	10, 12	10, 12
D2S1338	17, 25	19, 23	17, 19	23, 25	17, 19	17, 23	23, 25
vWA	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16	15, 16
D8S1179	13, 15	16, 16	13, 16	15, 16	13, 16	15, 16	15, 16
TPOX	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8	8, 8
FGA	20, 22	20, 20	20, 22	20, 20	20, 22	20, 22	20, 22
D19S433	13, 13.2	13, 16.2	13.2, 16.2	13.2, 16.2	13, 16.2	13, 13	13, 13.2

Profili Y-STR veje Romanov

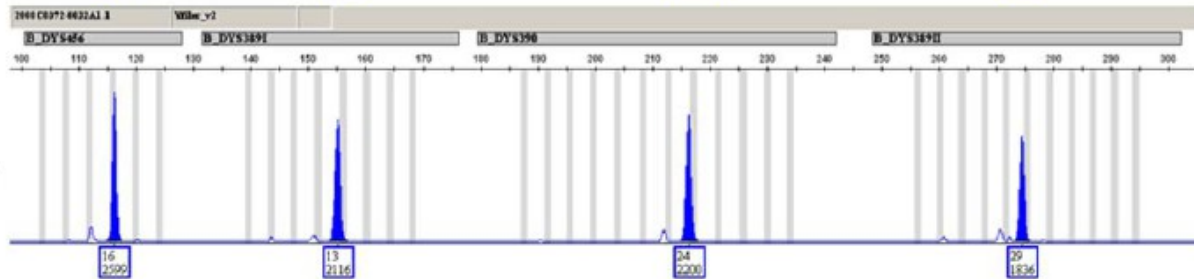
Alexei



Tsar
Nicholas II



Andrew
Romanov



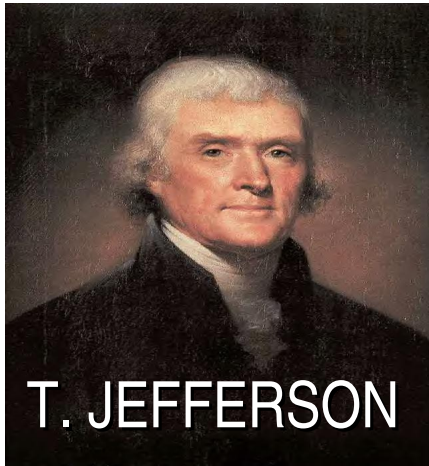
Primerjava Y-STR iz okostja s še živečim sorodnikom po očetovi strani Andrejem Andrejevičem Romanovom

Dodatne analize DNA



- Profil STR iz zoba carja Nikolaja primerjali s profilom krvi, odvzete s srajce, ki jo je nosil v času atentata 29. aprila 1891.
- Prvič povezali ante-mortem DNA profil Nikolaja s post-mortem ostanki okostja iz prvega grobišča.
- Zaključek: Raziskava DNK potrdila, da nihče izmed družine carja Nikolaja Romanova ni preživel masakra z dne 17. julija 1918.

Razkrivanje zgodovine s Y-STR

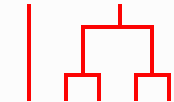
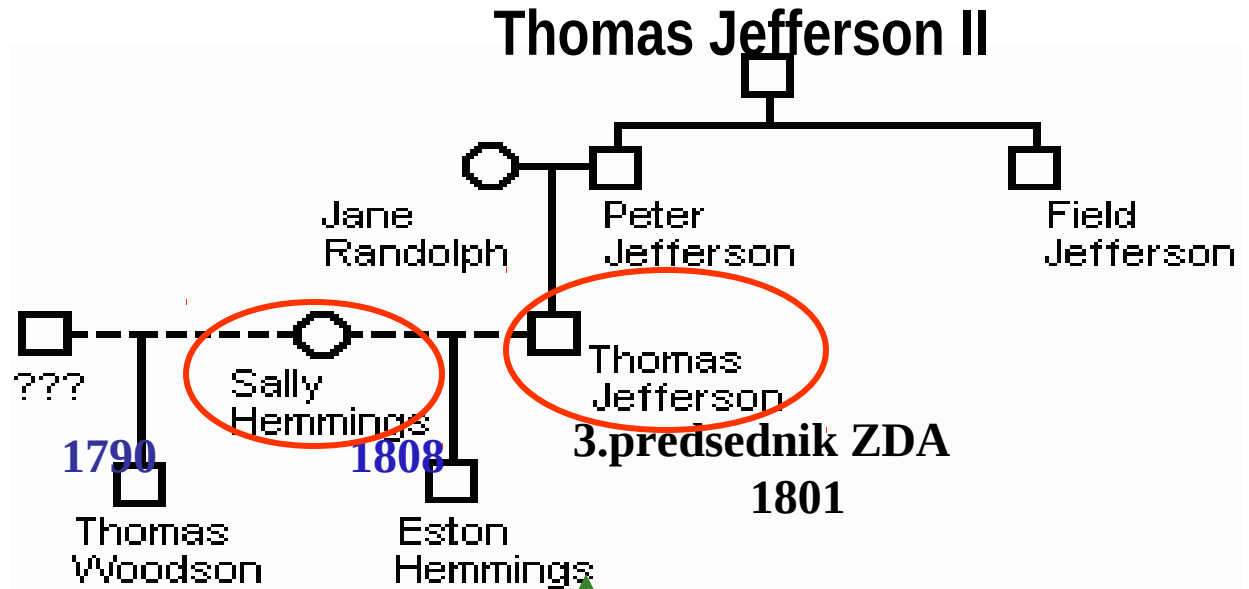


CSF2RA—Haemopoiesis
IL3RA
ANT3

AMEL



- DYS393
- DYS19
- DYS391
- DYS389
- DYS390

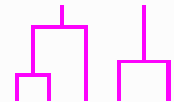


NO MATCH
DNA from 5 male-line descendants with descendants of Field Jefferson



MATCH
DNA from 1 male-line descendant with descendants of Field Jefferson

6 generacij



DNA from 5 male-line descendants of Field Jefferson

Markerji	Field	Eston	Thomas
STR	Jefferson	Hemings	Woodson

Število tipiziranih

posameznikov:

	5	1	5
DYS19	15	15	14 ←
DYS388	12	12	12
DYS389A	4	4	5 ←
DYS389B	11	11	11

Ali je preiskava Y-STR potrdila, da je T. Jefferson oče otroka E.H. svoje sužnje Sally?

DYS390	11	11	11
DYS391	10	10	13 ←
DYS392	15	15	13 ←
DYS393	13	13	13

Od 19 Y-STR-ov v haplotipu se jih pri potomcih T. Woodsona 7 razlikuje.



World Trade Center Victim Identification

OFFICE OF CHIEF MEDICAL EXAMINER

Napad na World Trade Center

Initial Recovery Operation

- 2001 and 2002
- Transportation and Conveyor Belt Operation



Initial effort suspended 2005

Razvili zmogljivejši računalniški program za različne preiskave DNA

- 19,971 remains recovered
- **1598** (58%) victims identified

FKKT 2011

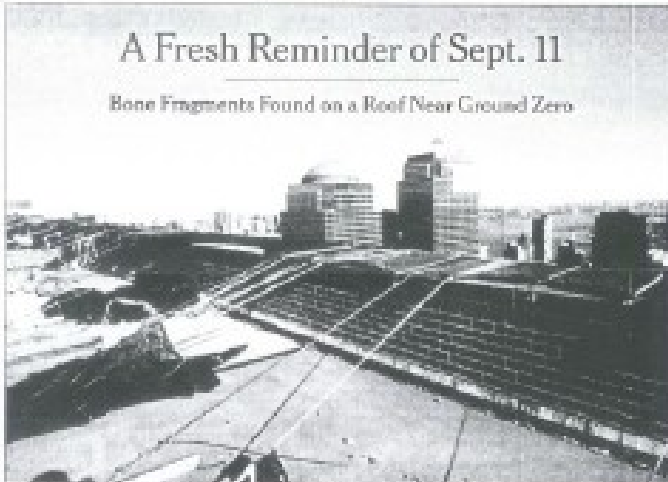
Identification effort restarted after accidental discovery of bone fragments in 2006

The Metro Section

The New York Times

A Fresh Reminder of Sept. 11

Bone Fragments Found on a Roof Near Ground Zero



The roof of the former Deutsche Bank building in a photograph taken in March. It was one of the few buildings that escaped the destruction, but its roof was damaged by the collapsing south tower.

SHOCKING WTC FIND

Con Ed crew unearths remains, wallets in Pit

ALMOST BLAZING workers clearing up a temporary roadway of Ground Zero yesterday made an air-ascending discovery — at least a dozen human remains and two wallets belonging to 9/11 victims.

The area at the southeast edge of the disaster site was assumed to have been searched long ago — and the New York-based, which had the general/forward recovery operation, would offer no explanation.

From north to south, the discovery of the remains — including two sets of partially intact arms and legs — were scattered within yards, who consider the find where the body parts were scattered.

An employee in the area was asked to take a photo of the remains. The photo was taken on the roof of the Deutsche Bank building in March. It was one of the few buildings that escaped the destruction, but its roof was damaged by the collapsing south tower.

"We got fairly involved here when we started looking for them and they were in the area that were made and in the building debris," said that it.

The workers belonged to various unions, including the International Brotherhood of Electrical Workers (IBEW).

Five years after 9/11, people were looking for the remains of those 1,361 victims who were not identified.

BY ALBERT BERNARDI
PHOTOGRAPHER
GREG G. KAMON
AND CHRIS BISHOP
FOR THE TIMES

of the rubble along time to find the 9/11 was shocking, no more could access the site.

Construction workers began digging up the rubble yesterday to remove a machine and debris rubble that had been put down in 2006.

The crew was one of the workers and located it first. In a Con Ed tunnel made near the 9/11 site, it was not until 1:45 a.m. yesterday that workers found the human remains inside an air-ascending passage box, a 10-foot by 10-foot opening.

To find these body parts, but not immediately nearby. The workers took the remains to the 10th St. yard and then moved the remains to the site.

Workers from the medical examiner's office quickly determined the remains were human. They put the remains in bags and they were sent to the site.

Investigators offered details on the site that had been located by the Con Ed yard for the day before. "They found some 100 items found since period of 2006," a Con Ed spokesman said.



Workers very rarely found remains from Ground Zero that authorities looked up.

Systematic review revealed other areas in need of search.



World Trade Center Victim Identification

OFFICE OF CHIEF MEDICAL EXAMINER - Dept Forensic Biology - THE CITY OF NEW YORK

New sifting operation 2006/2007



World Trade Center Victim Identification

OFFICE OF CHIEF MEDICAL EXAMINER - Dept Forensic Biology - THE CITY OF NEW YORK

V PREISKAVO WTC VKLJUČILI ŠE FORENZIČNE
ARHEOLOGE

Remains from Access Ramps (recovered in Sifting Center)

- 566 remains were tested
- 449 gave DNA profiles (79%)
 - 435 of DNA profiles associated with a person
 - remains belong to 129 different victims
 - 1 victim had 110 separate remains
 - 14 DNA profiles not associated to a known person
 - remains belong to 10 different people
- 5 New Identifications



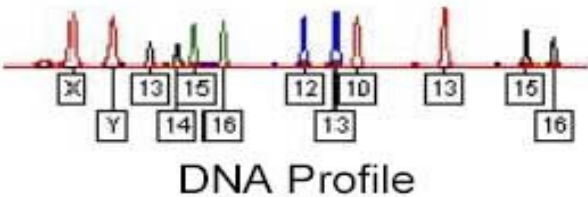
World Trade Center Victim Identification

Preverjanje identitete Sadama Huseina



December 14, 2003

“We got him!”



Saddam Hussein's capture verified with DNA testing

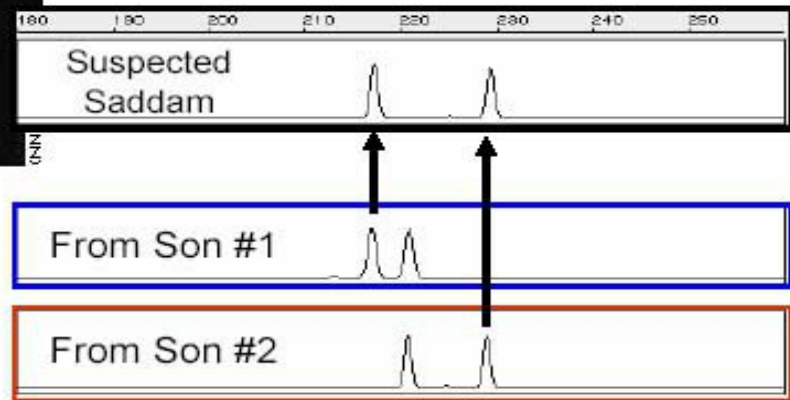
“A Forensic Paternity Test”

Captured December 13, 2003



Y-chromosome tests were also used to verify male lineage...

Portion of DNA Profile



Killed
July 22, 2003



DNA Used as the Ultimate Biometric for Confirming Saddam's Identity

Source: www.cnn.com Uday and Qusay Hussein

Živalski forenzični genetski markerji -I

- Uporabne iste biološke sledi kot pri človeku – kri, dlaka, slina..
- Ogromno število ljubljencev: Švica – 1mačka/6 ljudi; 1pes/12 ljudi
- Struktura živalske DNA podobna človeški:
 - Označevalci VNTR in STR na jedrni DNK in polimorfizem nukleotidnega zaporedja na mtDNK
- Razlike v številu kromosomov
 - psi – 37 parov kromosomov
 - mačke – 19 parov kromosomov
 - konji – 32 parov kromosomov
 - krave – 30 parov kromosomov

- Namen ugotavljanja identitete živali
 - Testiranje očetovstva zaradi parjenja pri rodovniških pasmah
 - Forenzične namene – sledi na KD, divji lov, prepovedano trgovanje z živalmi itd

Živalski forenzični genetski markerji - II

- Mačke – 65 milijonov v ZDA, kromosomi:
A1,A2,A3,B1,B2,B3,B4,D1,D2,D3,D4, E1,E2, E3,F1, F2

Table 1. Cat STR Markers Used in the MeowPlex Assay. Results obtained from typing over 200 cats representing 29 different breeds (5).

Locus Identifier	Dye Label	Chromosomal Location	Observed Heterozygosity (range across breeds)	Alleles Observed	Repeat Motif
F53	Blue	A1	0.53–0.93	9	Simple repeat [AAGA]
C08	Blue	B2	0.44–1.00	17	Compound repeat [ATAG][ATAC]
B04	Blue	A1	0.35–0.93	22	Compound repeat [AAGG][AAAG]
G11	Blue	B1	0.10–0.80	6	Simple repeat [ATCC]
FCA441	Green	D3	0.20–0.89	10	Simple repeat [ATAG]
D09	Green	B4	0.43–0.93	26	Compound repeat [ACAT][ATAG]
F124	Green	E1	0.51–0.93	20	Compound repeat [AGGA][AGAA]
C12	Green	F2	0.20–0.96	14	Complex repeat [AGAT][ACAT]
C09	Yellow	D4	0.00–0.94	15	Simple repeat [CTTT]
F85	Yellow	B1	0.66–0.98	33	Complex repeat [TTTC][TCTC]
D06	Yellow	C1	0.17–0.94	22	Simple repeat [TATC]
SRY	Green	Y	N/A	+/-	Gender ID

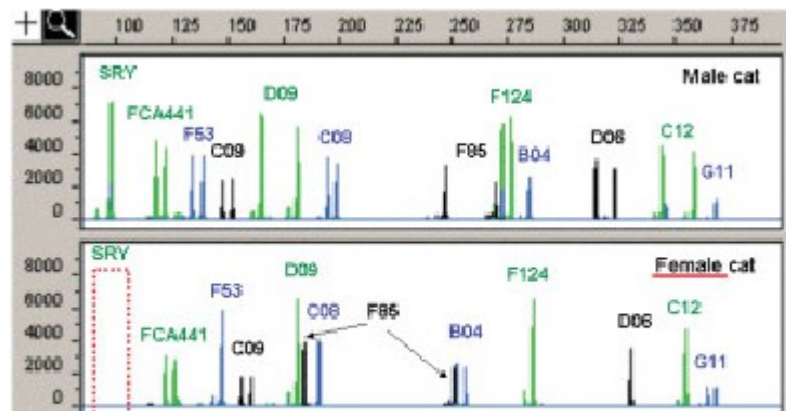
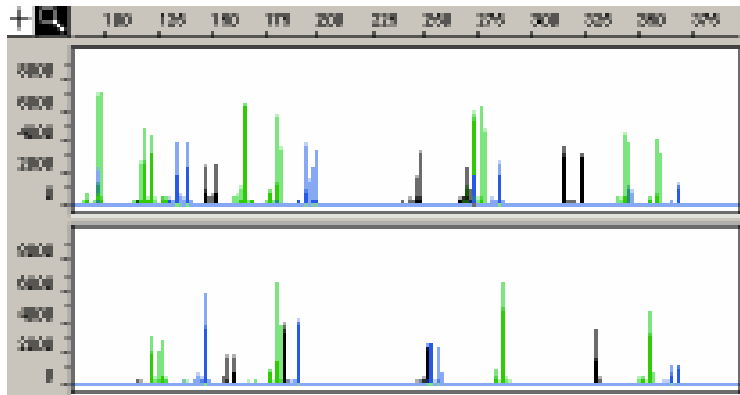


Figure 2. Meowplex PCR amplification of male and female cats. Four nanograms of DNA isolated from cat hair was amplified per reaction.

Verjetnost ujemanja $10^{-7} - 10^{-8}$ FKT 2

Prvi primer uporabe mačje DNA za razrešitev umora



- Menotti- Raymond določila 400 dinukleotidov ter 10 STR-ov izbrala za forenzične preiskave (leto 1997)

Prime

- leta 1994 je RCMP našla truplo pogrešane S.D.
- v bližini trupla najdena jakna s krvnimi madeži S.D.
- komu pripada jakna
- osumljen bivši mož D.B.
- na jakni dve mačji dlaki
- ujemanje s profilom STR krvi mačke Snežna kepica staršev osumljenca D.B.



Snežna kepica

Razrešitev umora s preiskavo pasje DNK

- J.J in R.R. sta živela skupaj s psom mešancem pitbul terierjem - "Chief" - v Južnem parku.
- Leta 1996 so člani okoliške bande vlomili, ju ubili in prav tako njunega psa, ki je bil ustreljen dvakrat. Preživel še 24 ur.
- Poimenovali klavci iz Južnega parka



- Policija prijela nekaj storilcev, v hotelski sobi najdena usnjena jakna in hlače poškropljene s krvjo. Oblečena pripadala dvema osebama.
- Oblečena poslana v lab, domnevali, da je človeška kri. Amplifikacija DNK ni uspela, ni bilo.
- Oblečena poslali v lab QuestGena (Celera), DNK testirali z 10 za pse specifičnimi markerji STR.
- Prišlo do ujemanja med profili STR primerjalne krvi ustreljenega psa "Chief" in sledmi krvi na oblečeni. Verjetnost naključnega ujemanja je 1 na 350 milijard skupne pasje populacije.
- Podan zaključek, da kri izvira od psa "Chief".

Profil STR psa "Chief"

Locus	Genotype	Allele Freq.
PEZ01	A, C	0.0164, 0.2167
PEZ03	B, G	0.0714, 0.0893
PEZ05	A, B	0.6379, 0.2069
PEZ06	D, F	0.2419, 0.2097
PEZ08	B, C	0.4333, 0.1667
PEZ12	G, H	0.1452, 0.5161
UCB2010	B, D	0.5323, 0.2419
UCB2054	B, H	0.1452, 0.0159
UCB2079	A, F	0.3667, 0.0164

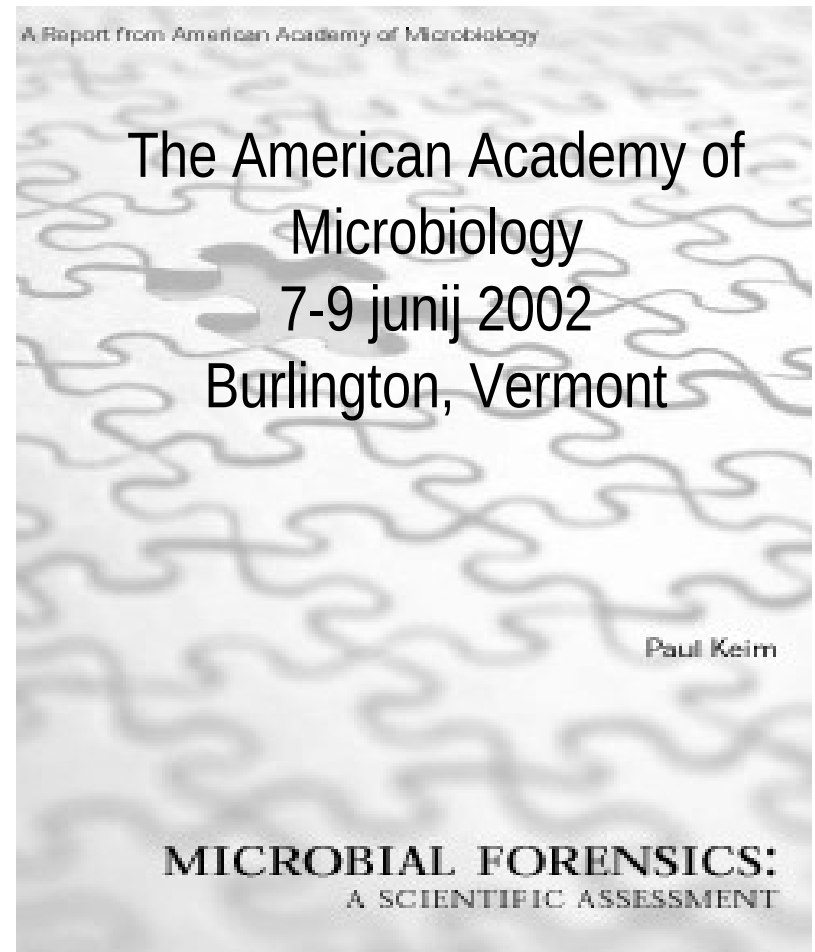


Zoogenova zbirka na študiji 438 psov

FKKT 2011

Forenzična mikrobiologija

- *Bacillus anthracis* - antraks (patogena vrsta Ames)
- HIV – AIDS (primerjalno filogenetsko metodo)
- *Staphylococcus epidermis*, *E.coli* in drugi
- Markerji: VNTR, STR, plasmidi, celotni genom
- Tehnologija – RAPD, AFLP, RFLP (16sRNA), določitev nukleotidnega zaporedja, profiliranje DNK



Forenzična botanika

- Patentna zaščita
- Kazniva dejanja:
 - posedovanje prepovedane droge - *Cannabis sativa*
 - umori
- ribosomalna DNK -
internal
transcribed spacer regions
18S, ITS1, ITS2; DNK
kloroplastov - *rbcL*, *atpB*, and
ndhF; STR, VNTR
- Metode: RAPD, AFLP, RFLP,
kvantitativni PCR, profiliranje
DNK SNP



Drevo s puščavskega področja
Palo verde v Arizoni

Prvi primer uporabe rastlinske
DNK pri razrešitvi umora

Identifikacija bioloških sledi

- Ugotavljanje vrste telesne tekočine
 - Kri, sperma,
 - Protitelesi in mRNA
- Ugotavljanje živalskega izvora (species)
 - Človek, pes
 - Protitelesa in Cyt B na mtDNA