

Utvrđivanje očitstva analizom DNA iz posmrtnih ostataka

Marčinković, Nedo

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:715092>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Nedo Marčinković

**Utvrđivanje očinstva analizom DNA
posmrtnih ostataka**

Diplomski rad



Zagreb, 2014.

Diplomski rad izrađen je pri Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Voditelj rada: Prof. dr. sc Milovan Kubat

Predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013/2014.

Popis kratica

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. Deoxy Ribonucleic Acid)

mtDNA – mitohondrijska DNA

STR – mikrosatelitna DNA (eng. Short Tandem Repeats)

PCR – reakcija lančane polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction)

RFLP – polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (eng. restriction fragment length polymorphism)

CODIS – eng. Combined DNA Index System

Sadržaj

Sažetak.....	i
Summary	ii
1 Uvod:	1
2 Hipoteza.....	3
3 Ciljevi rada	3
4 Ispitanici i metode	3
4.1 Ispitanici	3
4.2. Uzorci.....	3
4.3. Izolacija DNA.....	5
4.3.1. Chelex izolacija	5
4.3.2. Organska izolacija DNA.....	7
4.3.3. „FTA™ PAPER“ IZOLACIJA	8
4.4. Kvantificiranje DNA	9
4.5. PCR – lančana reakcija polimeraze.....	10
4.5.1. Amplifikacija DNA PCR metodom.....	11
4.6. Kapilarna elektroforeza	12
4.7. Statistička analiza	13
5 Rezultati.....	14
6 Rasprava	17
7 Zaključci	18
8 Zahvale	19
9 Reference	20
10 Životopis:	22

Sažetak:

Naslov rada: Utvrđivanje očinstva analizom DNA iz posmrtnih ostataka

Autor: Nedo Marčinković

Metode utvrđivanja očinstva, a posebice onih iz posmrtnih ostataka izuzetno su napredovale posljednjih desetljeća. Sve je krenulo još sredinom 80-ih godina izolacijom molekule DNA, nastavilo se mapiranjem humanog genoma, a rezultiralo da danas sa 99,9999 %-tnom vjerojatnošću možemo utvrditi da li je pokojni, otac djeteta.

Prvi korak u utvrđivanju očinstva je prikupljanje odgovarajućeg uzorka. U funkciji uzorka su najčešće krv, tkivo i kost pokojnog. Iz navedenih uzoraka potrebno je izolirati molekulu DNA koja će nam poslužiti za usporedbu s DNA potencijalnog djeteta i njegove majke.

Nakon obrade materijala i dobivanja uzorka DNA uzima se mali segment tj. STR koji se amplificira uz pomoć PCR metode. Na taj način i iz iznimno male količine genetskog materijala možemo dobiti enormne količine uzorka za usporedbu.

Usporedbom STR segmenata posmrtnih ostataka potencijalnog oca sa onima djeteta moguće je sa 99,9999%-tnom vjerojatnošću utvrditi očinstvo ili isto isključiti ako postoji više od pet STR nepodudarnosti.

Ključne riječi: utvrđivanje očinstva, DNA analiza, STR segmenti, PCR

Summary

Title: Paternal identification with DNA analysis of posthumous remains

Author: Nedo Marčinković

Methods of paternal identification especially ones performed from posthumous remains improved rapidly in last few decades. Everything begun in 80's with isolation of DNA molecule, continued with human genome mapping, and resulted that nowadays we can determine whether deceased is father of a child with 99,9999% accuracy.

First step in paternal identification is collecting adequate samples. Sample is usually blood, tissue and bone of deceased. We use samples to isolate DNA molecule which will be used to compare with DNA of potential child and it's mother. After thorough processing the samples and isolating DNA we need a small fragment called STR which is multiplied by PCR method. On that way even with small amounts of genetic material we can get enormous amounts of sample for comparison.

Comparing STR fragments of the deceased with ones from the child and it's mother we can make paternal identification within 99,9999% accuracy or exclude one if there is more than five STR expansion.

Keywords: paternal identification, DNA analysis, STR fragments, PCR

1 Uvod:

Razvoj moderne DNA tehnologije rezultirao je povećanom mogućnošću izvođenja identifikacije pojedinca. Identifikacija individue poželjna je u velikom broju situacija od otkrivanja počinitelja kaznenog djela do utvrđivanja očinstva što je ujedno i tema ovog diplomskog rada. Prvi poznati test očinstva uveden je 20-ih godina prošlog stoljeća i temeljio se na usporebi krvnih grupa potencijalnog oca i djeteta. Unatoč jednostavnosti izvođenja testa, rezultatima unutar nekoliko minuta te postojanju samo četiri krvne grupe – A, B, AB i 0 pokazao se kao loša metoda zbog niske isključivosti (40% populacije ima krvnu grupu 0) . S druge strane otkriće i upotreba RFLP-a u 80-ima pokazalo se naoko idealnom metodom zbog velikih individualnih razlika između pojedinaca, no javio se problem dugotrajne analize i velikog vremenskog odmaka od uzimanja uzorka do dobivanja konačnog rezultata. Danas su u upotrebi STR fragmenti. Riječ je o metodi koja uspoređuje specifične regije (lokuse) na molekuli DNA. STR predstavljaju mikrosatelitnu DNA sa ponavljanjem 1-6 parova baza do 100 puta. Riječ je o metodi sa velikom mogućnosti razlučivanja individualnih razlika i istovremeno kratkom vremenu analize. Vjerojatnost da dvije osobe (izuzev jednojajčanih blizanaca imaju iste STR sekvence jednaka je 1 na milijardu ili više. Budući je riječ o kratkim sekvencama molekule DNA moguća je istovremena analiza više fragmenata što dovodi do još točnije analize (Butler, 2001).

Za svako molekularno biološko istraživanje u koje spada i dokazivanje očinstva potrebno je prikupiti adekvatan uzorak; u ovom slučaju materijale koji sadrže jezgru. Biološki tragovi koji su pogodni za analizu očinstva uključuju krv, slinu, tjelesna tkiva (kost, mišić, zub) (Zečević, 2004). Nakon prikupljanja uzoraka izvodi se izolacija

DNA iz stanica te amplifikacija ciljnih regija tehnikom PCR-a. PCR producira milijune kopija željenih regija te na taj način omogućava analizu i najmanjih količina DNA.

Dobiveni rezultati STR-a potencijalnog oca usporede se s lokusima djeteta i majke i na taj način utvrdi ili isključi očinstvo (Butler, 2001).

2 Hipoteza

Istraživanjem se želi potvrditi da se analiza DNA iz posmrtnih ostataka može koristiti u slučajevima dokazivanja očinstva, tj. da se iz posmrtnih ostataka može dobiti adekvatna količina/kvaliteta DNA za analizu (utvrđivanja očinstva).

3 Ciljevi rada

1. pretražiti iz baze laboratorija sve slučajeve utvrđivanja očinstva iz posmrtnih ostataka
2. utvrditi razlike između nađenih slučajeva (prema vrsti posmrtnog ostatka, rodbini koja je dala uzorak u nedostatku posmrtnog ostatka)
3. odrediti kvalitetu dobivenih rezultata prema dobivenom genotipu posmrtnog ostatka

4 Ispitanici i metode

4.1 Ispitanici

U razdoblju od 2004.-2013. godine na Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku obrađeno je 818 zahtjeva za utvrđivanje očinstva od čega je u 22 riječ bilo o preminuloj osobi. U 10 slučajeva uzorak potreban za DNA analizu prikupljen je od pokojnika u vidu posmrtnog ostatka, dok je u preostalim 12 od rodbine preminulog uzet materijal potreban za analizu.

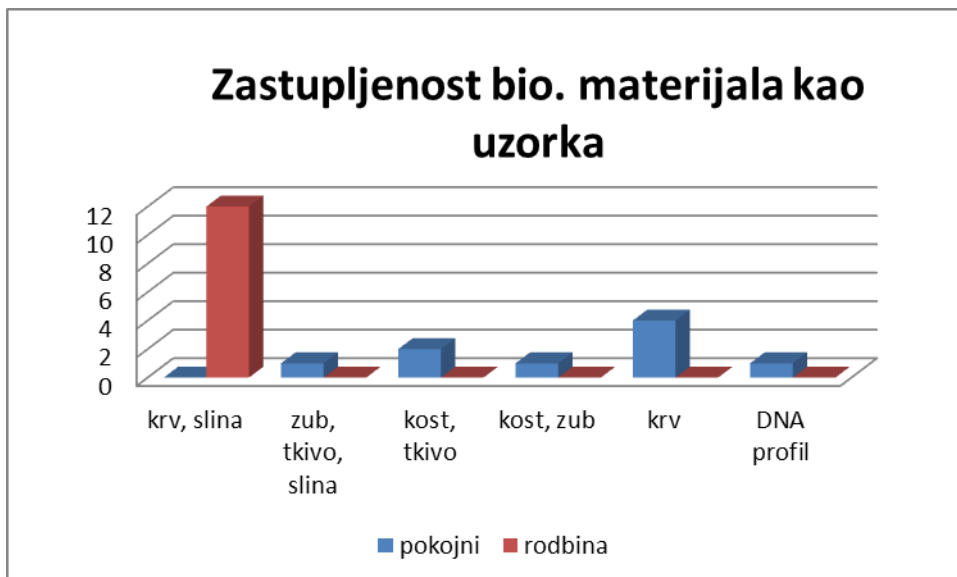
4.2. Uzorci

U slučaju utvrđivanja očinstva iz posmrtnih ostataka kao uzorak je upotrijebljen biološki materijal dobiven ekshumacijom pokojnika, uzet pri obdukciji ili već postojeći

DNA profil. Kao uzorak je upotrijebljena krv, kost, zub i tkivo (mišić). Zastupljenost uzoraka u skupini pokojnika je bila slijedeća:

- Krv : 4 uzorka
- Krv i tkivo : 1 uzorak
- Kost i tkivo : 2 uzorka
- Kost i zub : 1 uzorak
- Kost, zub i tkivo : 1 uzorak
- DNA profil : 1 uzorak

U preostalih 12 slučajeva posmrtni ostaci nisu bili dostupni već je uzorke omogućila najuža rodbina pokojnika (roditelji/brat/sestra/djeca) davši krv i slinu potrebnu za analizu.



Graf 1. Distribucija biološkog materijala kao uzorka

4.3. Izolacija DNA

Uzorci koji su pravilno prikupljeni za potrebe utvrđivanja očitstva, dostavljaju se u laboratorij za DNA analizu gdje će se obaviti izolacija molekule DNA. DNA se mora odvojiti od ostalih građevnih elemenata stanice te kontaminirajućih faktora kako bi se mogla vršiti njezina analiza. Upravo molekule kao što su proteini, masti i dr. mogu onemogućiti uspješnu analizu DNA. Postupak odvajanja DNA od ostalih staničnih i kontaminirajućih elemenata se naziva izolacija DNA. Neovisno o metodi izolacije s uzorcima valja pažljivo rukovati kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije kako sample-to-sample tako i one s stranom tj. vanjskom DNA. Stoga laboratoriji obično provode analize uzoraka u različito vrijeme, a nekad čak i na različitim lokacijama kako bi rizik kontaminacije bio što manji.

Danas su u upotrebi najčešće organaska izolacija, Chelex izolacija i FTA papir izolacija.

Izolirana DNA pohranjuje se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za dugotrajnu pohranu, pohranjuje se na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se spriječila aktivnost endonukleaza. Endonukleaze su stanični enzimi čija je funkcija degradacija DNA. Kako bi endonukleaze mogle katalizirati reakciju uništenja DNA potreban im je magnezij. Radi stroge prevencije njihovog djelovanja pri pohrani molekule DNA preporučeno je koristiti epruvete ljubičastog poklopca koje sadrže EDTA (Butler, 2001).

4.3.1. Chelex izolacija

Chelex metoda, Chelex[®]100, je 1991 godine predstavljena društvu za forenzičnu DNA analizu kao suspenzija koja se dodaje na uzorak. Suspenzija je zapravo ion-izmenjujuća smola (Walsh, *et al.* 1991).

Chelex je građen od stiren-divinilbenzenskih polimera koji sadrže parne iminodiacetatne ione. Ovi ioni imaju ulogu kelatnih skupina tako da vežu ione polivalentnih metala, npr. magnezija. Uklanjanjem magnezija iz reakcije onesposobili smo DNA uništavajuće enzime te ujedno zaštili molekulu DNA (Butler, 2001).

Chelex metoda izolacije DNA ima određene prednosti pred metodom organske izolacije. Ova metoda provodi se po postupku koji je vremenski kraći od izolacije DNA organskim otapalima. Njime ćemo brže izolirati DNA te uz to smanjiti vjerojatnost kontaminacije uzorka zbog upotrebe samo jedne epruvete za izolaciju DNA (Butler, 2001).

Rezultat je jednostruka DNA uzvojnica, bez inhibitora PCR-a, koja se nakon toga može primjenjivati radi umnožavanja DNA PCR-postupkom.

Ukoliko upotrijebimo preveliku količinu krvi, preveliku krvnu mrlju, dakle, preobilan uzorak ova metoda može rezultirati proizvodnjom faktora koji će inhibirati PCR reakciju (Butler, 2001).

Priručnici preporučaju 3 μ L pune krvi ili krvnu mrlju dimenzija 3 mm x 3mm (Perkin Elmer Corporation, 1998).

Izolacija se vrši kroz 4 koraka:

1. Uzorak dodajemo u 5% Chelex suspensiju
2. Gore navedenu mješavinu uzorka i suspenzije kuhamo nekoliko minuta kako bi dobili slobodnu DNA
 - pomoćni korak u uklanjanju mogućih nečistoća i inhibitora kao što su hem ili proteini moguće je provesti prethodnim pranjem (Willard *et al.* 1988)
 - izlaganje uzorka temperaturi od 100 °C dovodi do denaturacije DNA te uništavanja stanične membrane i proteina.

3. Centrifugiranje

- provodi se kako bi se Chelex smola spustila na dno epruvete

4. preostali supernatant se uzima i uključuje u PCR-reakciju

(Butler, 2001)

4.3.2. Organska izolacija DNA

Organska izolacija DNA ili izolacija fenol kloroformom je metoda izolacije koja se najduže koristi. Ovom metodom izdvojena DNA ostaje sačuvana u velikim komadima i čišća je nego nakon drugih ekstrakcijskih metoda.

Nedostatci ove metode su dugotrajnost, uključuje korištenje opasnih kemikalija, te zahtjeva višestruki prijenos uzorka među epruvetama i tako povećava rizik od kontaminacije uzorka ili pogreške (Butler, 2001).

Protokol izolacije:

1. Kost duljine cca 10 cm očistiti dremelom, po mogućnosti, do zdravog sloja.
2. Oprati kost pod tekućom vodom, de-vodom, aps. EtOH i osušiti.
3. U sterilnu epruvetu nadremlati 3-5 g kosti.
4. Dodati 40 mL 0,5 M EDTA, pH 7.5 i mućkati 24 sata na sobnoj temperaturi.
Nakon toga centrifugirati 5 min na 5000 g. Korak 4. ponoviti 2 puta.
5. Talog isprati sa 40 mL de H₂O i centrifugirati 15 min na 2000 g. Korak 5. ponoviti 2 puta.
6. Na talog dodati 3 mL pufera za ekstrakciju i 500 µL proK (20 mg/ mL). Mućkati 48 sati na 56 °C.
7. Phase Loch Gel (PLG) (Eppendorf) epruvetu centrifugirati 2 min na 10000 rpm da se gel spusti.

8. Izuzeti 3 mL ekstrakta i staviti u PLG epruvetu te dodati 3 mL fenol-kloroform-izoamil alkohol (PCI) otopine, pH 8.0. Centrifugirati 5 min na 5000 rpm.
9. Prebaciti vodenu fazu (gornju) u novu epruvetu i dodati 3 mL PCI otopine. Centrifugirati 2 min na 5000 rpm. Ponoviti korak 9.
10. Prebaciti vodenu fazu u novu epruvetu i dodati 3 mL n-butanola. Centrifugirati 2 min na 5000 rpm.
11. Vodenu (donju) fazu prebaciti u centrikon-100 i centrifugirati 45 min na 2600 rpm.
12. Dodati 2 mL Tris pufera i centrifugirati 30 min na 2600 rpm. Ponoviti korak 11.
13. Spustiti uzorak u kapicu centrikona centrifugirajući 2 min na 2600 rpm.
14. Prebaciti uzorak u ependorf epruvetu.

(Zavod za sudsku medicinu i kriminalistiku u Zagrebu, DNA laboratorij, 2012)

4.3.3. „FTA™ PAPER“ IZOLACIJA

1980. godine, Lee Burgoyne sa Flinders Svučilišta u Australiji razvio je FTA™ papir kao novu metodu kojom je omogućena pohrana i čuvanje molekule DNA (Burgoyne *et al.* 1994). FTA™ papir je na bazi upijajuće celuloze i sadrži 4 važne kemijske substance koje sprječavaju djelovanje nukleaza i rast bakterija (Burgoyne 1996). Kao rezultat imamo sačuvanu molekulu DNA, tijekom više godina i to pri sobnoj temperaturi (Butler, 2001).

Ova metoda iznimno je jednostavna za upotrebu. Uzorak, primjerice, mrlju krvi, stavimo direktno na FTA™ papir i pustimo da se osuši. Pri kontaktu mrlje sa papirom, stanice se razgrađuju, a molekula DNA ostaje imobilizirana unutar matrice papira. Maleni komadić papira na kojem je mrlja se izreže i izloži procesu pranja kako bi se DNA očistila od hema i ostalih mogućih inhibitora PCR reakcije. Papir koji je prije

pranja bio crven od krvne mrlje, nakon pranja izgubi boju, tako da zapravo i sami vidimo „ efekt pranja“. Čista DNA sadržana na papiru se sada podvrgava PCR reakciji (Butler, 2001).

Prednost ove metode je što se njome dobivaju dosljedni rezultati analize bez kvantifikacije DNA. Nadalje, smatra se kako bi se u budućnosti ovaj proces mogao automatizirati, odnosno robotizirati (Belgrader and Marino 1997). U situacijama kada je potrebno napraviti više analiza jednog uzorka, krvna mrlja može biti ponovno upotrijebljena za amplifikaciju i sekvenciranje DNA (Del Rio *et al.* 1996). Ova metoda se smatra vrlo korisnom pri prikupljanju uzorka bukalnih stanica jednokratnom četkicom za zube (Burgoyne, 1997). Uzorak se sa četkice prenese na FTATM papir i na taj način se opet može čuvati i pohranjivati (Butler, 2001).

4.4. Kvantificiranje DNA

Tek nakon što smo uspješno izolirali DNA iz uzorka, možemo procijeniti njezinu kvalitetu i kvantitetu, odnosno kvantificirati molekulu DNA. Točno određivanje količine DNA u uzorku esencijalna je za provedbu PCR reakcije i umnažanje molekule DNA i njenog genskog materijala. Previše DNA, jednako kao i premalo, dovesti će do neuspjele reakcije (Butler,2001).

Kvantificiranje DNA provodi se obavezno nakon izolacije DNA organskim otapalima i Chelex metodom, dok nakon FTA paper metode nije potrebna.

Najčešće korištene metode kvantificiranja molekule DNA su hibridizacijska metoda (Slot blot quantification) i Picogreen mikrotitarski test (Picogreen microtiter plate assay) (Butler, 2001).

4.5. PCR – lančana reakcija polimeraze

Značajan napredak forenzičke znanosti donijelo je otkriće nove tehnologije poznate pod nazivom lančana reakcija polimeraze ili PCR. Prvi put opisana 1985. godine od strane Kary Mullis-a i suradnika, PCR je dovela do revolucije u molekularnoj biologiji budući je omogućila da se iz iznimno male količine DNA unutar samo nekoliko sati dobiju milijuni kopija željene sekvence. Koliko je značajno otkriće PCR govori i činjenica da je Kary Mullis dobio Nobelovu nagradu za kemiju za njeno otkriće 1993. godine (Butler, 2001).

PCR je enzimatska reakcija uz pomoć koje se određene sekvence DNA mogu umnožiti milijun puta kroz samo nekoliko sati (Saiki *et al.* 1988, Reynolds *et al.* 1991). Bez mogućnosti da se napravi veliki broj kopija željene regije molekule DNA, mnogi uzorci se ne bi mogli analizirati. Normalno je da nekad uzorak dobiven od pokojnika može biti limitiran po pitanju kvalitete i kvantitete, te ga je potrebno dostaviti laboratoriju gdje će se uz pomoć PCR reakcije replicirati (Butler, 2001).

Prilikom umnažanja koriste se različiti komercijalni sustavi. Genomska DNA se amplificira PCR metodom i primjenom AmpFISTR Identifier kita (Applied Biosystems, 2001) te se koristi za uzorke koji se mogu identificirati putem DNA roditelja.

DNA nasljeđenu iz Y kromosoma dokazujemo nakon amplifikacije DNA PCR metodom i primjenom AmpFISTR Yfiler. Ovi uzorci mogu se identificirati putem DNA rodbine naslijeđene muškom linijom.

Treći je sustav, sustav analize mitchondrijske DNA koji određuje sekvencu DNA naslijeđenu ženskom linijom.

Prednosti PCR metode su visoka osjetljivost i brzina, te točnost rezultata neovisna o kvaliteti DNA iz uzorka (Butler, 2001).

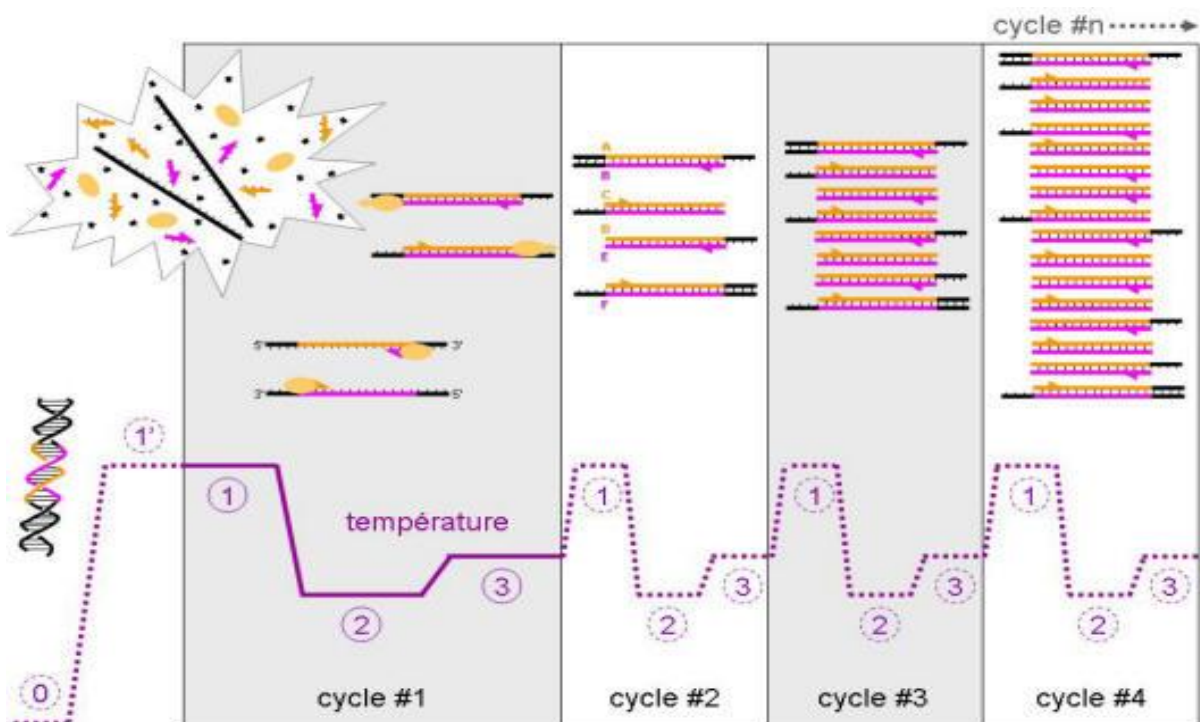
4.5.1. Amplifikacija DNA PCR metodom

Proces se provodi u točno određenim cikličkim, vremenskim i termalnim uvjetima pri kojima se uzorak zagrijava i hladi. Svaki pojedini ciklus uključuje denaturaciju dvolančane molekule DNA visokom temperaturom.

Nakon denaturacije pri visokoj temperaturi, temperatura se spušta kako bi se na jednolančanu DNA vezale oligonukleotidne početnice (engl. primers). Početnice služe kao označivači granica regije koju želimo umnožiti.

Nakon vezanja početnice temperatura se ponovno povisuje na optimalnu vrijednost za najbolju aktivnost DNA polimeraze koja produžujući početnice stvara novu kopiju DNA.

Lančana reakcija polimeraze nakon 30 ciklusa daje oko milijardu kopija željene regije (Butler, 2001).



Slika 1. Prikaz principa PCR reakcije preuzet sa

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PCR_basic_priceples1.jpg

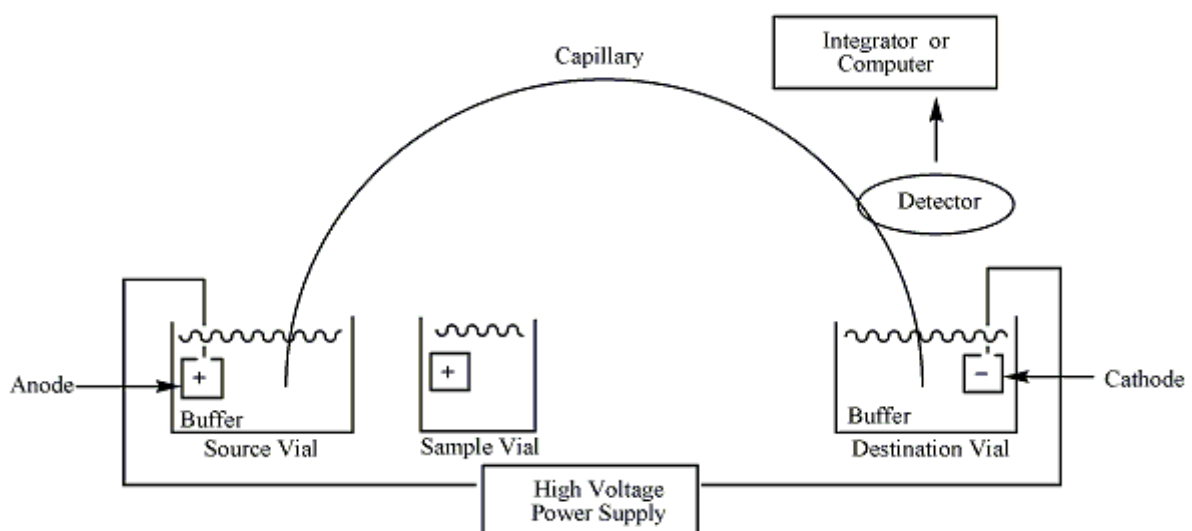
Prema Ygonaar. Uz dopuštenje autora.

4.6. Kapilarna elektroforeza

Nakon PCR-a, reakcije u kojoj su STR fragmenti višestruko umnoženi dobija se smjesa DNA molekula koje valja razdvojiti na način koji će omogućiti međusobno razlikovanje alela. Dobiveni fragmenti razdvajaju se metodom kapilarne elektroforeze. Uvođenjem kapilarne elektroforeze krajem 80ih godina 20.stoljeća smanjila se upotreba složene i dugotrajne gel elektroforeze. Ova tehnika koristi samo malu količinu uzorka, što omogućuje i njegovo ponovno testiranje ukoliko se javi potreba za time.

Riječ je o metodi u kojoj je cijeli postupak automatiziran od injekcije uzorka, separacije i detekcije te omogućava analizu većeg broja uzoraka bez ljudskog nadzora. Ova metoda je kvantitativna, te s obzirom na druge metode brza. Potrebno je oko 30-tak minuta po jednom uzorku.

Detekcija i analiza fragmenata, te obrada podataka provodi se upotrebom odgovarajućih računalnih programa bez međukoraka potrebnih za gel elektroforezu (Butler, 2001).



Slika 2. Prikaz metode kapilarne elektroforeze preuzete sa http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis

Uz dopuštenje autora <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>

4.7. Statistička analiza

U ovoj statističkoj analizi koristiti ćemo t-test kojim ćemo u skupu DNA uzoraka dobivenih post mortem ispitati je li broj dobivenih lokusa potrebnih za utvrđivanje očinstva veći od 13, tj. je li broj lokusa dostatan za neosporno utvrđivanje očinstva. Kako bi smo ispitali hipotezu vezanu uz jedno obilježje jedne testne skupine upotrijebiti ćemo t-test za jedinstvenu testnu skupinu („one-sample t-test“). Bitno je naglasiti kako ćemo pretpostaviti da je broj lokusa dobiven DNA analizom testirane skupine svojstvo koje je normalno distribuirano. Time ćemo zadovoljiti uvjete za korištenje spomenutog testa.

5 Rezultati

Tablica 1. Svi slučajevi utvrđivanja očinstva preminule osobe

Broj uzorka	Tip uzorka	Napomena	Spol djeteta	Izolirana kol. DNA	Utvrđeno očinstvo	Izolirani lokusi	Dodatne analize
17204	krv, slina	roditelji pok.	1	1	1	11	
27104	krv, slina	roditelji pok.	1	1	1	18	
8005	krv, slina	majka,sestra	2	1	1	19	
26805	kost,zub,tkivo	pokojni	1	1	1	18	
17406	kost, tkivo	pokojni	1	1	1	18	
11907	kost, tkivo	pokojni	1	1	1	19	
17607	DNA profil	pokojni	2	1	1	11	
29107	krv,tkivo	pokojni	1	1	1	18	
32207	krv	pokojni	1	1	1	19	
35907	krv, slina	majka,braća	2	1	1	18	y-filer
9408	kost,zub	pokojni	2	1	1	18	
19908	krv, slina	brat,sestra	2	1	1	18	y-filer
27708	krv, slina	majka,brat	1	1	1	18	
19109	krv	pokojni	2	1	1	18	
7409	krv, slina	roditelji pok.	2	1	1	18	y-filer
20610	krv, slina	brat,kćer	1	1	1	18	
22009	krv	pokojni	2	1	1	17	
10511	krv, slina	roditelji,sestra	1	1	0	18	
6311	krv, slina	pok.muž+pot.otac	2	1	1	16	y-filer
912	krv, slina	roditelji,sestra	1	1	1	19	
412	krv, slina	majka,brat,sestra	1	1	1	16	
45613	krv	pokojni	2	1	1	21	

Za potrebe istraživanja testirati ćemo hipoteze:

$$H_0: \mu < 13$$

$$H_1: \mu \geq 13$$

, tj. nulta hipoteza je da je broj lokusa dobivenih iz uzorka DNA manji od 13, tj. manji od minimalnog broja lokusa potrebnih za provođenje DNA analize.

Tada alternativna hipoteza kaže da je broj lokusa dobivenih iz uzorka DNA dovoljan za provođenje DNA analize, tj. barem 13.

Uz pretpostavku da je broj lokusa dobivenih iz uzorka DNA normalno distribuiran možemo koristiti t-test.

Poznato je da je testna statistika za t-test sljedeća:

$$T = \frac{\overline{X}_n - \mu}{S_n} \sqrt{n} \stackrel{H_0}{\sim} t(n - 1)$$

S obzirom da je veličina uzorka $n = 10$, a nivo značajnosti $\alpha = 0.0005$ slijedi:

$$T = \frac{\overline{X}_{10} - \mu}{S_{10}} \sqrt{10} \stackrel{H_0}{\sim} t(9)$$

Sada iz tablice Studentove t-razdiobe određujemo $t_{0.0005}(9)$ takav da vrijedi

$$\mathbb{P}(T \geq t_{0.0005}(9)) = 0.0005$$

Dobivamo $t_{0.0005}(9) = 4.781$.

Sada iz $\bar{x} = 17.7$, $s = \sqrt{6.01} = 2.45$ računamo vrijednost testne statistike:

$$t = \frac{17.7-13}{2.45} \sqrt{10} = 12.51$$

Kako je sada $t = 6.07 > 4.781 = t_{0.0005}$ odbacujemo hipotezu H_0 u korist hipoteze H_1 uz razinu značajnosti od 0.05%.

Dakle zaključujemo da je očekivani broj lokusa dobivenih iz jednog uzorka DNA 99.95% sigurno veći od 12, tj. od minimuma potrebnog za DNA analizu.

6 Rasprava

U ovom istraživanju želja je bila dokazati da je upotreba posmrtnih ostataka valjana metoda utvrđivanja očinstva.

Rezultati su pokazali da u slučaju dobivanja minimalnog potrebnog broja lokusa iz uzorka DNA možemo utvrditi očinstvo na osnovu usporedbe alela. Ovdje valja napomenuti da je kao najmanji potreban broj za analizu uzet 13, broj lokusa na kojem se temelji CODIS baza podataka (Budowle *et al.* 1998). S vremenom i napretkom tehnologije u komercijalne setove za analizu uključeni su i dodatni lokusi. Broj dodanih lokusa u set ovisi o proizvođaču.

Nadalje valja primjetiti u tablici 1. da je po jedno očinstvo u obje skupine (pokojni/rodbina) dokazano na osnovu preklapanja 11 lokusa, što ne znači da je analiziran manji broj već da određeni lokusi nisu dali rezultate potrebne za usporedbu.

U cjelokupnom ispitanom uzorku isključenje očinstva našlo se u samo jednom slučaju i to ne zbog nedovoljno izolirane količine DNA potrebne za usporedbu, već na temelju usporedbe i razlikovanja pet ili više lokusa (u ovom slučaju 5).

Iako je riječ o malom uzorku uključenom u istraživanje, valja naglasiti da je riječ o metodi koja daje prednost kvaliteti pred kvantitetom uzorka te možemo reći da u slučaju adekvatno prikupljenog uzorka i držanja laboratorijskih protokola rezultati ne bi trebali doći u pitanje.

7 Zaključci

1. Posmrtno ostacima moguće je koristiti u svrhu dokazivanja očinstva.
2. Iz rezultata možemo naslutiti da dobivanje kvalitetnog genotipa nije u korelaciji sa metodom izolacije DNA odnosno korištenog uzorka.

8 Zahvale

Zahvaljujem se svojem mentoru, prof.dr.sc. Milovanu Kubatu na stručnom vođenju, potpori i ljubaznosti prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se dipl.ing. Marijani Mašić na pomoći pri prikupljanju podataka, obradi podataka za ovaj diplomski rad i ljubaznosti koja mi je uvelike olakšala izradu ovoga rada.

Zahvaljujem se i ostalim članovima povjerenstva, prof.dr.sc. Davoru Strinoviću i doc.dr.sc. Davoru Mayeru na ukazanom povjerenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se prijatelju i studentu matematike Nevenu Grubeliću na pomoći oko izrade statistike.

9 Reference

Applied Biosystems (2001): AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit, User's Manual, Foster City, CA, USA

Belgrader, P. and Marino, M.A. (1997) Laboratory Robotics and Automation, 9, 3-7.

Burgoyne, L., Kijas, J., Hallsworth, P. and Turner, J. (1994) Proceedings of the Fifth International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation, p. 163.

Budowle, B., Moretti, T.R., Niezgoda, S.J. and Brown, B.L. (1998) The Second European Symposium on Human Identification. Madison, WI: Promega Corporation, pp. 73-88.

Burgoyne, L.A. (1996) Solid medium and method for DNA storage. US Patent 5,496,562.

Burgoyne, L.A. (1997) Proceedings of the Eight International Symposium on Human Identification. Madison, Wisconsin: Promega Corporation, p. 153.

Butler JM (2001) Forensic DNA Typing, Biology & Technology Behind STR Markers. London-San Diego: Academic Press: 13-55.

Del Rio, S.A., Marino, M.A. and Belgrader, P. BioTechniques, 20, 970-974.

Perkin Elmer Corporation (1998) AmpFISTR® Profiler Plus PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, CA: Perkin Elmer Corporation

Reynolds, R., Sensabaugh, G. and Blake, E. (1991) *Analytical Chemistry*, 63, 1-15.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) *Science*, 239, 487-491.

Walsh, P.S., Metzger, D.A. and Higuchi, R. (1991) *BioTechniques*

Willard, J.M., Lee, D.A. and Holland, M.M. (1988) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 98: *Forensic DNA Profiling Protocols*, pp. 9-18.

Zečević D. i sur. (2004) *Sudska medicina i deontologija*, IV. obnovljeno i dopunjeno izdanje, Zagreb: Medicinska naklada 215-219.

10 Životopis:

OSOBNI PODACI:

IME I PREZIME: Nedo Marčinković

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 04. kolovoz 1989. godine u Sarajevu, BIH

E-MAIL ADRESA: nedo.marcinkovic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2004. – OŠ. Šimuna Kožičića Benje, Zadar

2004-2008. – Opća gimnazija 'Franje Petrić', Zadar

2008. – Medicinski fakultet u Zagrebu, Sveučilište u Zagrebu

STRANI JEZICI:

Talijanski, aktivno u govoru i pismu

Engleski, aktivno u govoru i pismu

PROFESIONALNE KVALIFIKACIJE:

Demonstrator na katedri za Anatomiju (2009.)

Demonstrator na katedri za Fiziologiju i Imunologiju (2010.-2014.)

Demonstrator na katedri za Patofiziologiju (2011.)

Demonstrator na katedri za Patologiju (2011.-2013.)

Demonstrator na katedri za Internu propedeutiku (2012.-2014.)

PROFESIONALNE UDRUGE:

SPORTMEF (košarkaška i vaterpolska sekcija)

CROMSIC

EMSA

Sekcija za kardiologiju

USPJESI:

Pobjednik humanijade u košarci 2011. u Rovinju

Aktivni sudionik na međunarodnom kongresu MSJC Pro i Contra u Ljubljani 2013. i 2014.

Član OC EMSA Summer school Dubrovnik 2013.

Osvajač sveučilišnog prvenstva u košarci 3 x 3 2013.

INTERESI:

Sport- košarka, vaterpolo

čitanje, šetanje, igranje igrice