

# DIAGNOSTIKA

## RNA

EXPRESE

SESTŘIH „SEKV. EXONŮ“

## DNA

### PŘÍMÁ

#### SCORING

- Restrikční analýza PCR produktu
- Hybridizace PCR produktu s alelově specifickými oligonukleotidy
- detekce variant pomocí sond
- ARMS
- MLPA
- Triplet Primed PCR

#### SCANNING

- analýza teploty tání (SYBR Green)
- sekvenování

### NEPŘÍMÁ

analýza mikrosatelitů

# FRAGMENTAČNÍ ANALÝZA

Analýza mikrosatelitů



# Jednobodový polymorfismus (*single nucleotide polymorphism – SNP*)

- rozdíly v jednom nukleotidu v určitém místě
- vyskytuje se asi jedenkrát na 1000 párů bazí.
- celý lidský genom obsahuje více než 1,5 milionu SNPs
- vyskytují se v intronech, v extragenových oblastech

## Detekce

RFLP (restriction fragment length polymorphism)

restrikční štěpení genomické DNA s následným Southern blottingem

PCR amplifikace s následným restrikčním štěpením

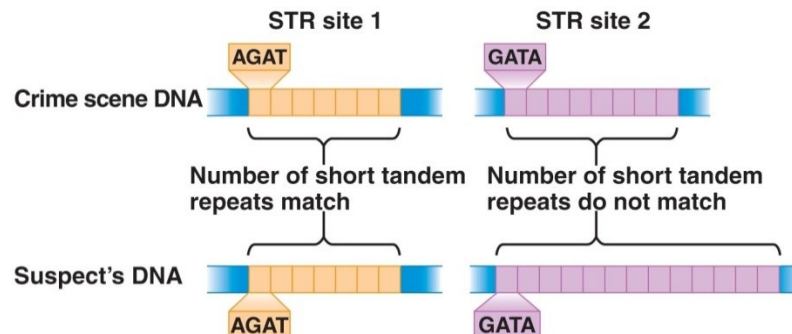
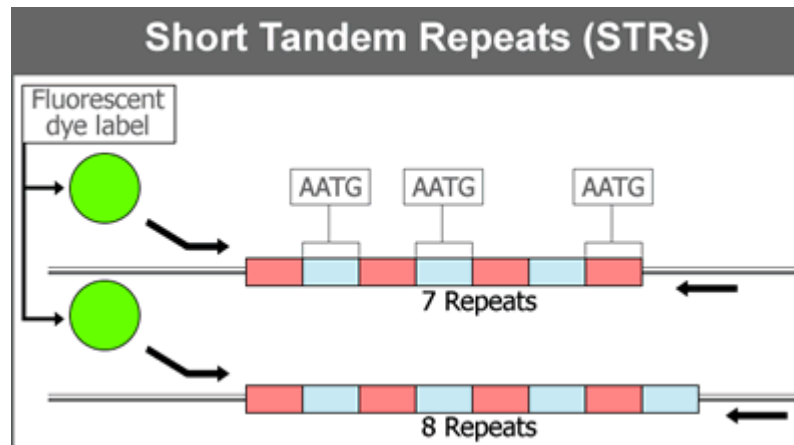
PCR amplifikace s následnou sekvenací

Real-time PCR – analýza teploty tání

DNA array (čipy)



# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)



# Využití mikrosatelitů

- ❑ Nepřímá diagnostika monogénních chorob
- ❑ Identifikace osob/vzorků DNA (A. Jeffreys 1985)  
(lidé obvinění z kriminálních činů, oběti katastrof)
- ❑ Určování paternity
- ❑ Molekulárně genetická analýza aneuploidii
- ❑ Genetická genealogie



# Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)





# QF-PCR

## **Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)**

představuje metodu vhodnou k rychlé diagnostice  
nejčastějších aneuploidií

a umožňuje okamžitý management patologických těhotenství



# QF-PCR

Při analýze se využívá PCR amplifikace chromozom-specifických polymorfních STR markerů. Metody využíváme v prenatální i postnatální diagnostice a analýze potracených plodů



# Klasické metody vyšetření

Vyšetření karyotypu (hodnocení barvených metafázických chromozomů v optickém mikroskopu)



# Vyšetření karyotypu

- základní metodou vyšetření karyotypu (nejen) v rámci prenatální diagnostiky chromozomálních aberací

## Výhody

- možnost prohlédnout celý karyotyp, zhodnotit strukturu každého jednotlivého chromozomu - a i jejich počet.

## Nevýhody

- časová náročnost

klasické vyšetření karyotypu vyžaduje kultivaci získaných buněk ve speciálním médiu, což výrazně prodlužuje dobu, která uplyne mezi samotným odběrem vzorku a vydáním výsledku.

- amniocentéza či odběr choriových klků je nutné počítat v průměru s minimálně dvoutýdenní lhůtou (výsledky CVS bývají obecně o něco dříve díky většímu růstovému potenciálu choriových buněk).

- kordocentéza má v tomto případě značnou výhodu rychlého zpracování vzorku (obecně jen několik dní), neboť je odebírána fetální krev (velký růstový potenciál lymfocytů).

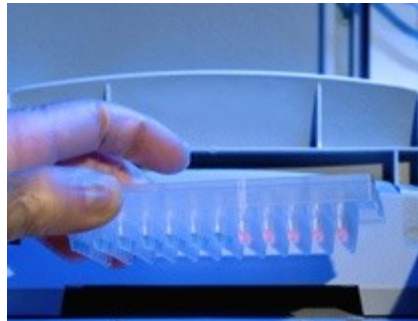
- omezená schopnost detekovat určité chromozomální přestavby malého rozsahu (například mikrolece)
- určovat původ marker chromozomů apod.

V této oblasti pak nastupují metody molekulární cytogenetiky jako je například FISH (fluorescent in-situ hybridization - fluorescenční in-situ hybridizace).

# QF-PCR

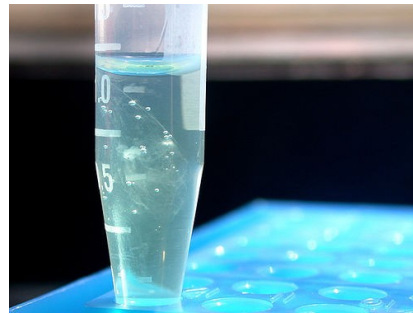
neboli kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (Quantitative  
Fluorescent Polymerase Chain Reaction)

- speciální aplikací klasické PCR metody, sloužící k namnožení definovaného úseku DNA.
- V rámci prenatální diagnostiky se lze také setkat s označením amnioPCR (v souvislosti s amniocentézou - jako metodou, použitou k získání vzorku).
- Tato metoda umožňuje vyloučit / potvrdit numerické odchylky vybraných chromozomů a to v extrémně krátkém časovém období jednoho, maximálně dvou dnů.
- Nejčastěji jde o chromozomy, jejichž numerické abnormality tvoří většinu (cca 90 %) chromozomálních aberací: 13, 18, 21, X a Y.

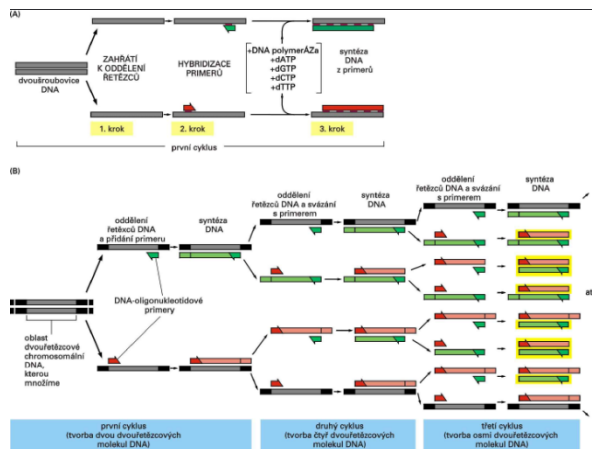


# QF-PCR

- Ze vzorku AMC, CVS se pomocí některé ze standardních metod nejprve **izoluje DNA.**



- Polymerázová řetězová reakce-PCR**



Pro vlastní **PCR** metodu jsou připravené speciální „kity“ s **fluorescenčně značenými primery.**

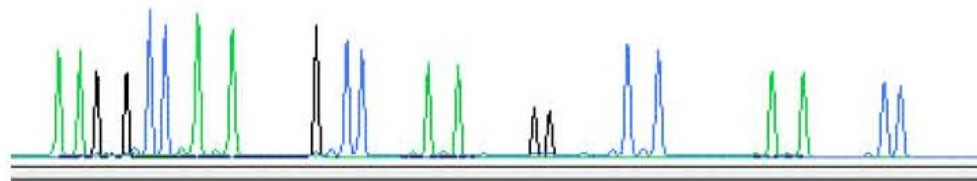
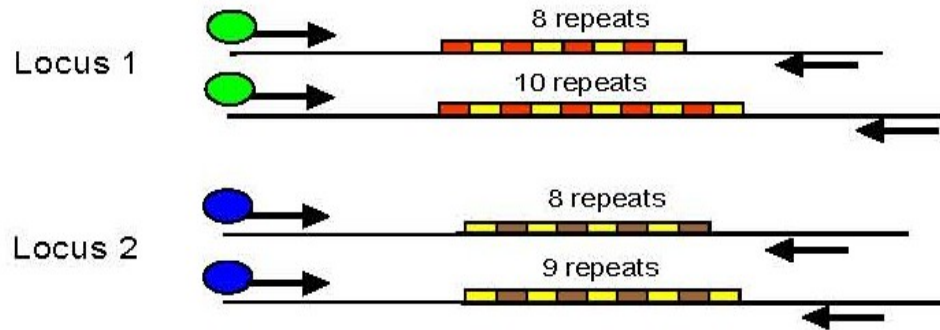
Tyto primery ohraničují specifické lokusy STR na příslušných chromozomech (13, 18, 21, X a Y),

# QF-PCR

Metoda PCR amplifikuje STR oblasti a vytváří fluorescenčně značené amplikony za pomoci lokus specifických primerů



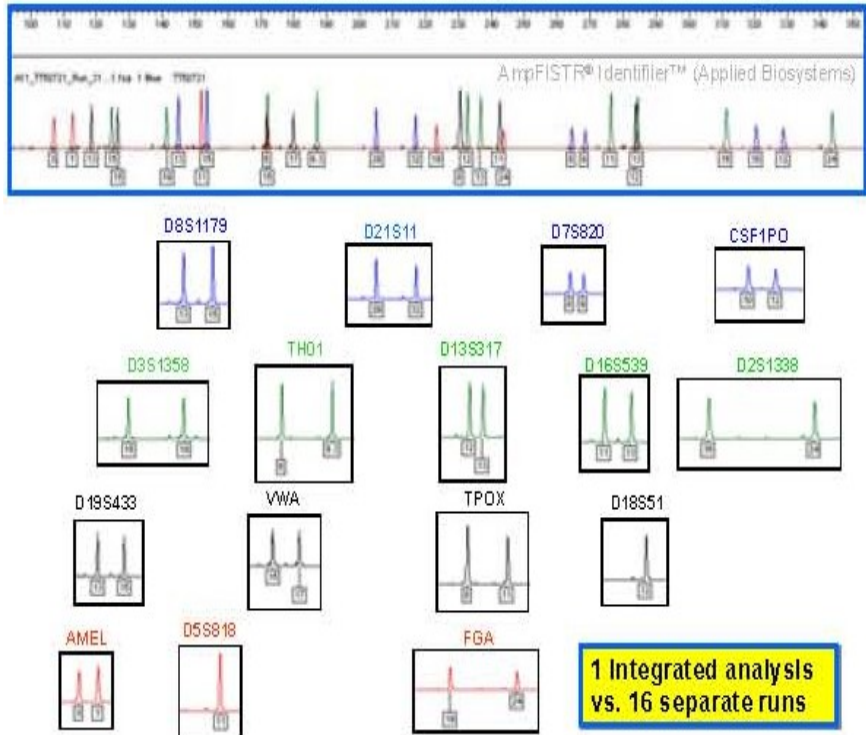
Scanned Gel Image



Capillary Electropherogram

# QF-PCR

## Multiplex PCR





# QF-PCR

## Multiplex PCR

- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 21
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 18
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomu 13
- 7 markerů pro diagnostiku chromosomů XY.

### 8. Výsledky a analýza (pokrač.)

#### Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 1

Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13A	13q12	234 - 327	232 - 323	Zelená
13B	13q21	370 - 430	365 - 425	Modrá
13C	13q31	425 - 474	425 - 474	Žlutá
13D	13q13	420 - 490	413 - 479	Zelená
18A	18q11	190 - 230	190 - 230	Zelená
18B	18q12	180 - 228	180 - 228	Žlutá
18C	18q12	298 - 350	298 - 350	Modrá
18D	18q22	330 - 408	325 - 403	Zelená
18I	18q21	360 - 415	360 - 415	Žlutá
21A	21q21	160 - 205	160 - 207	Modrá
21B	21q21	220 - 283	220 - 285	Modrá
21C	21q22	256 - 350	256 - 353	Žlutá
21D	21q22	440 - 492	440 - 492	Modrá

\*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravu.

### 8. Výsledky a analýza (pokrač.)

#### Přehled markerů

Devyser™ Complete Mix 2

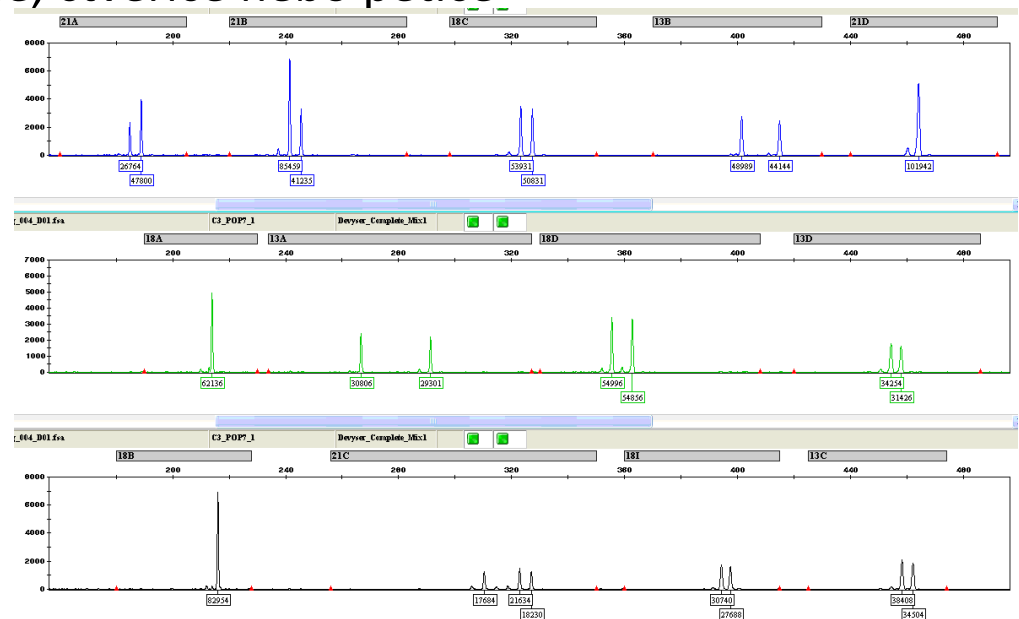
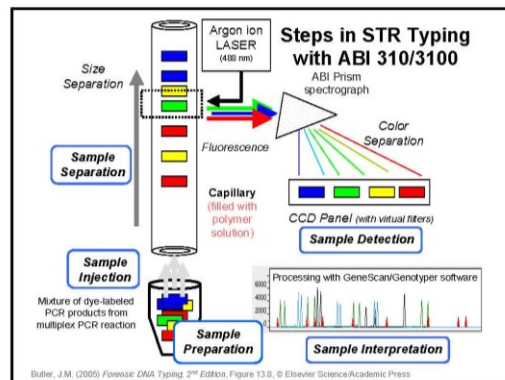
Název Markeru	Pozice	Velikost markeru (bp)* POP-4/POP-6	Velikost markeru (bp)* POP-7	Barva fluoroforu
13E	13q32	160 - 248	160 - 248	Žlutá
13F	13q12	260 - 320	260 - 320	Modrá
13G	13q14	314 - 415	314 - 415	Zelená
18G	18q11	326 - 380	326 - 380	Modrá
18J	18p11	430 - 487	430 - 487	Žlutá
21E	21q22	370 - 410	370 - 410	Žlutá
21F	21q22	386 - 445	388 - 449	Modrá
21G	21q22	430 - 490	430 - 490	Zelená
XY1	Xp22/Yp11	X = 105 Y = 110 (+/- 2bp)	X = 106 Y = 111 (+/- 2bp)	Zelená
XY2	Xp22/Yp11	180 - 220	182 - 222	Modrá
X1	Xq26	120 - 170	120 - 170	Zelená
X2	Xq13	230 - 260	230 - 260	Zelená
X3	Xq26	262 - 315	262 - 315	Žlutá
Y1	Yp11	235 (+/- 2bp)	236 (+/- 2bp)	Modrá
7X	7q34/Xq13	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	7 = 182 X = 202 (+/- 2bp)	Zelená

\*Na základě pozorovaných a kalkulovaných velikostí markerů. Píky markerů s velikostmi mimo dané rozpětí se mohou vyskytnout, ale nezahrnují se do analýzy v rámci Devyser™ Complete. Doporučujeme pro tyto případy použít Devyser™ Resolution soupravu.



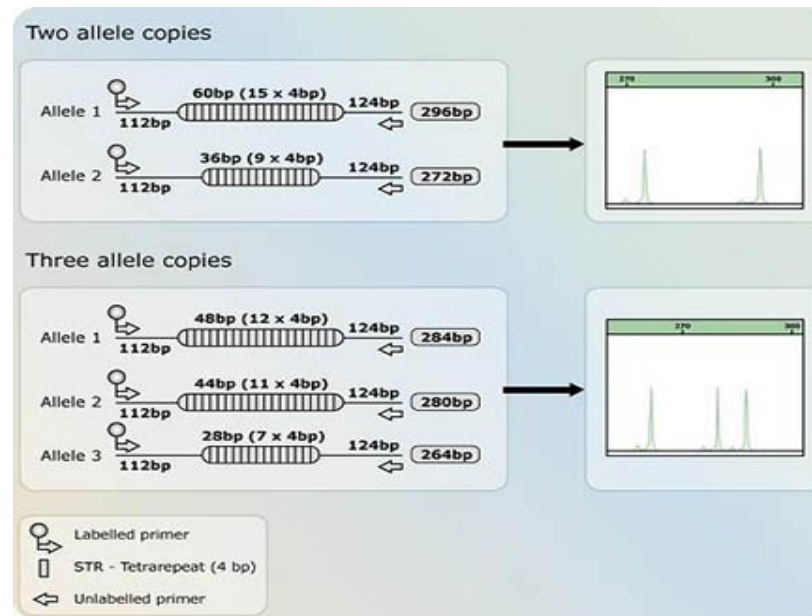
# QF-PCR

- Vzniklé PCR produkty jsou separovány a analyzovány pomocí automatického genetického analyzátoru.
- Relativní množství každé STR alely je kvantifikováno pomocí výpočtu poměru obsahu píků, příp. jejich výšek.
- STR se liší mezi jedinci velikostí, podle toho, kolikrát se opakují trojice, čtveřice nebo pětice nukleotidů.



# QF-PCR

- V případě diploidie, je signál dvou alel 1:1, když se jedná o homozygota, pak jeden peak s dvojitým signálem.
- Při trizomii dostaneme signál 2:1, 1:2, nebo 3 peaky 1:1:1.
- Chybějící chromozom X u Turnerova syndromu je detekován pomocí poměru X vs. 7. chromosom. U normální ženy je tento poměr 1:1, u postižené je 1:2.



# QF-PCR

- DNA amplifikovaná z normálního heterozygotního jedince (má alely s různou velikostí) pro specifickou STR sekvenci bude mít dva píky s odlišnou délkou v daném rozsahu

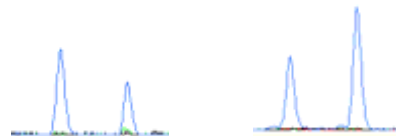


Heterozygotní marker (poměr ploch 1:1)

- DNA amplifikovaná z trizomických jedinců vykáže buď další pík (tři různé alely) se stejnou plochou nebo jen dva píky (dvě různé alely), z nichž jeden má dvojnásobnou plochu, než ten druhý



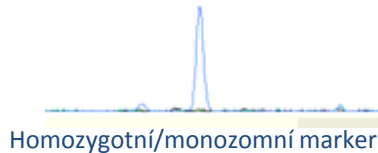
Trizomický troj-alelický marker (poměr ploch 1:1:1)



Trizomický dvoj-alelický marker (8.3: poměr ploch 2:1; 8.4: poměr ploch 1:2)

# QF-PCR

- Homozygotní jedinci (mají alely se stejnou délkou) nebo monozomní vykážou pouze jeden pík



Jedinci homozygotní nebo monozomní jsou největším problémem pro testování abnormalit pohlavních chromozomů. Pokud použijeme STR specifické pro chromozom X, některé vzorky z normální ženy XX mohou vykazat homozygotní QF-PCR výsledek, který nelze odlišit od vzorků s jediným X, jako při Turnerově syndromu. Začleněním dalších STR markerů chromozomu X do analýzy redukuje pravděpodobnost homozygotnosti, ale neeliminuje ji zcela. Problém monosomie X řeší 7X marker pro relativní kvantifikaci chromozomů 7 a X. Pro normální ženu je poměr 7X 1:1 Pro normálního muže a ženu s monosomií X je typický poměr 2:1



Normální žena s poměrem 7X 1:1 .



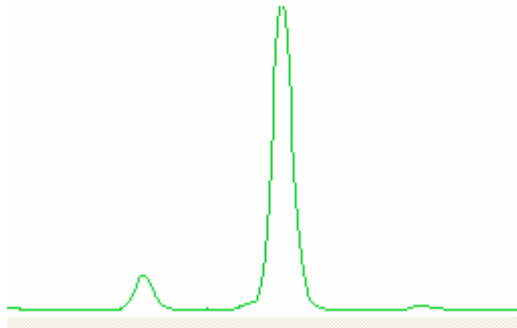
Normální muž s poměrem 7X 2:1 .

# Artefakty QF-PCR

## Stutter píky

- jsou samostatné píky vznikající v průběhu PCR amplifikace STR alel a jsou o jednu nebo několik repetitivních jednotek menší (minor) nebo výjimečně i delší, než hlavní alela
- typický stutter pík má obsah menší, než 15% vůči příslušnému STR píku.
- mohou se tvořit v důsledku prokluzu DNA polymerázy při prodlužování DNA vlákna
- Počet stutterů závisí na
  - lokusu
  - PCR podmínkách a používané polymeráze. Procento stutterů se zvyšuje s vyšším počtem PCR cyklů a s větším počtem templátové DNA.
  - výskyt stutterů klesá s delšími opakujícími jednotkami (pentanukleotidové jednotky < tetra < tri < dinukleotidy).
    - tetranukleotidové repetice se objevuje asi v 15 %,
    - tri- a dinukleotidové repetice se zvyšuje až na 30 %
  - Počet stutterů je nižší, pokud je sekvence opakování nedokonalá, narušená nepravidelností sekvence (imperfect)

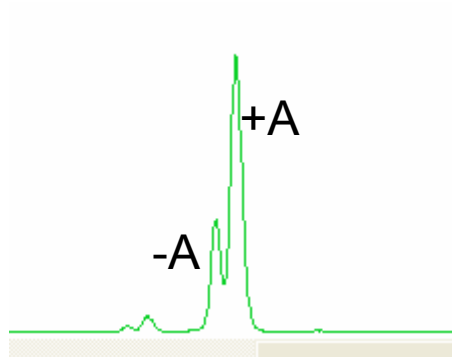
Při interpretaci výsledků je nutné stutter píky brát v úvahu



# Artefakty QF-PCR

## SPLIT PÍKY (+/- A)

- -A píky jsou detekovány jako samostatné píky, které jsou o jeden pár bazí kratší, než PCR produkt s plnou délkou (+A pík). -A píky můžeme zahrnout do výpočtu poměrů.
- Split píky jsou obvykle způsobeny nižší aktivitou Taq polymerázy, která přidává další adenosin na 3' konec PCR produktu nebo příliš velkým množstvím DNA v PCR reakci



# Artefakty QF-PCR

## Alelický drop-out

- je jev, při kterém dochází ke ztrátě jedné ze dvou alel v průběhu PCR amplifikace.
- problém nastává, pokud k tomuto jevu dojde u heterozygotního genotypu (2 odlišné alely). Alelický drop-out tak může vést k falešnému určení homozygotického genotypu (1 alela) a tím i k špatné interpretaci výsledků
- při degradované vstupní DNA může někdy docházet i k lokusovému drop-outu. Takový lokus je pak neinformativní.

## Pull up píky(BLEEDTHROUGH)

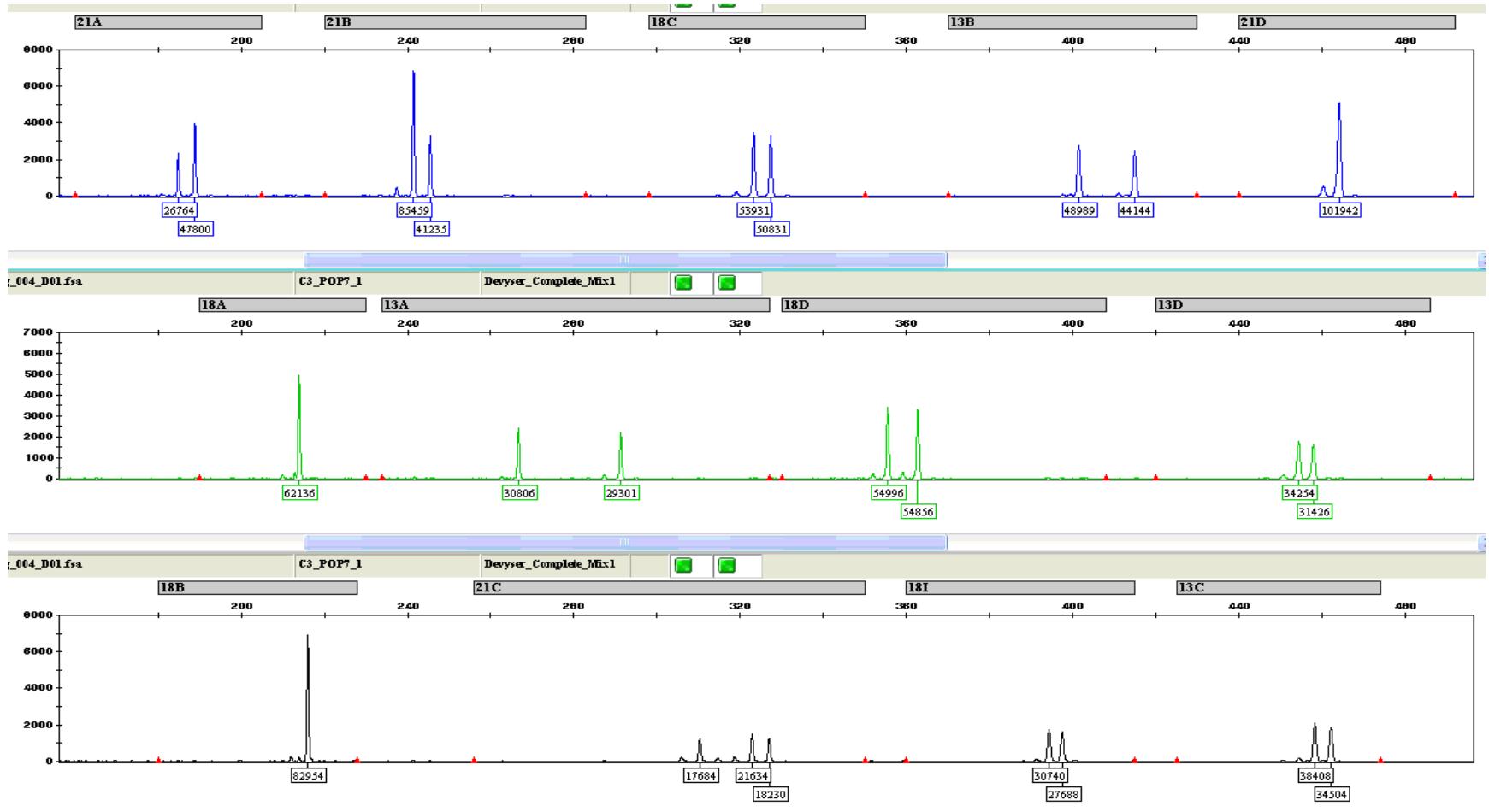
- jsou malé píky jedné barvy nacházející se na místě hlavního píku jiné barvy
- vznikají při příliš silném signálu amplikonu hlavního píku (příliš mnoho templátové DNA při PCR).
- Vzniklé přesahující píky musí být z analýzy vyloučeny.

## Spikes

jsou ostré píky, které se objevují se stejnou intenzitou fluorescence v několika barevných kanálech. Píky vzniklé z elektroforetických spiků musí být z analýzy vyloučeny.



# QF-PCR



Typical electrophoretogram (Mix 1) showing the profile of a trisomic sample (47, XY +21)

# Hodnocení QF-PCR

Review Report

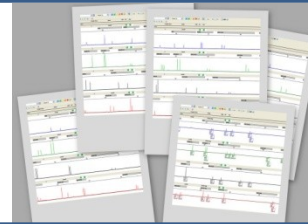
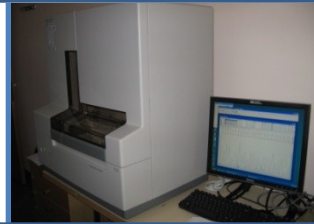
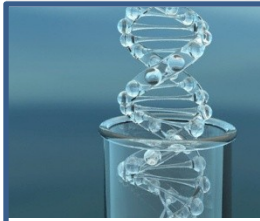
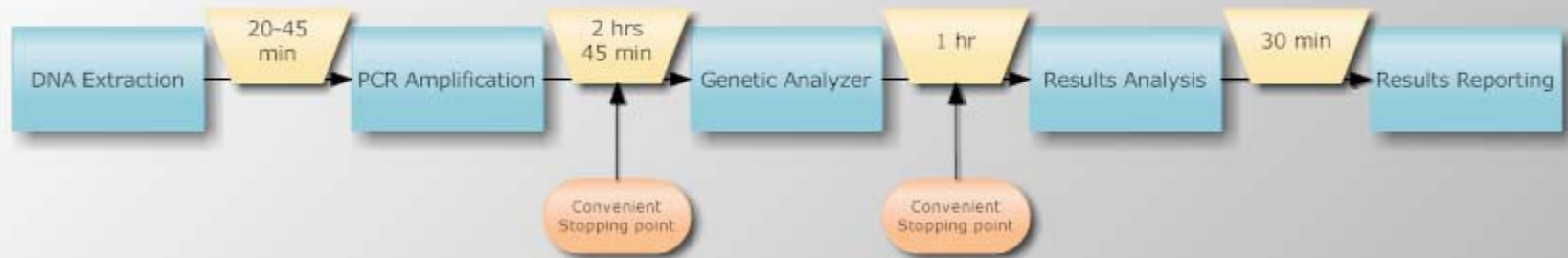
Chromosome 13 Chromosome 18 Chromosome 21 Chromosome XX

MarkerID	Include	Size	Height	Alle	Ratio	Relative peak area (%)	Comment
21A	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	185	731	7853	1:2		
	<input checked="" type="checkbox"/>	189	1210	12038			
21B	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	242	823	8113	2:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	246	511	4441			
21C	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	318	257	2554	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	323	287	3266			
	<input checked="" type="checkbox"/>	327	254	2658			
21D	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Non-informative
	<input type="checkbox"/>	457	150	1790			Suspected stutter or A peak
	<input checked="" type="checkbox"/>	465	1733	20511			
21E	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	387	854	10779	1:2		
	<input type="checkbox"/>	394	105	797			Suspected stutter or A peak
	<input checked="" type="checkbox"/>	395	1533	17246			
21F	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative
	<input checked="" type="checkbox"/>	391	856	8711	1:1:1		
	<input checked="" type="checkbox"/>	415	778	8556			
	<input checked="" type="checkbox"/>	419	723	7947			
21G	<input type="checkbox"/>					25 50 75	Informative

Approve



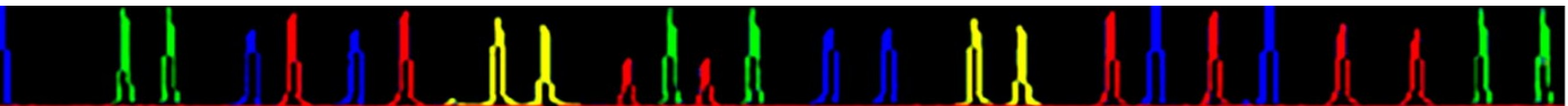
## Flowchart Devyser® QF-PCR



Case#	Index	Sex	Height	Age	Tab#	Reference	Result	Comment
21A	181	M	176	1.8	10/16	201505	201505	Reference
	181	M	176	1.8	10/16	201505	201505	Reference
21B	182	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	182	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21C	183	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	183	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21D	184	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	184	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21E	185	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	185	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21F	186	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	186	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21G	187	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	187	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21H	188	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	188	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21I	189	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	189	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
21J	190	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference
	190	M	171	2.1	10/16	201505	201505	Reference

# Výhody QF-PCR

- odstraňuje nutnost opakovat některé testy s nejasným výsledkem (jako u kayotypizace), protože je každý syndrom analyzován pomocí mnoha STR současně.
- pro každý chromozom jsou zahrnuty i velmi krátké STR úseky, díky nimž lze analyzovat i částečně degradovanou DNA.
- test odhalí kontaminaci mateřskými buňkami, není nutné analyzovat současně vzorky rodičů.
- test zjistí i případný mosaicismus
- detekce Turnerova syndromu
- reagensie v alikvotech zjednodušují použití a snižuje možnost kontaminace
- analýza trvá méně než 5 hodin, takže lze mít výsledky ještě týž den.
- Hands-on doba je cca 90 minut





# Nepřímá DNA diagnostika

Nepřímá diagnostika byla daleko více používána v minulosti, kdy u většiny chorob nebyla známa přesná molekulární povaha poškození genu, popř. ani který gen přesně je u dané choroby poškozen.

U nepřímé diagnostiky postačuje, je-li známa jen jeho přibližná poloha v genomu.

Dnes se tento typ vyšetření používá tehdy, kdy sice víme, porucha kterého genu je zodpovědná za daný patologický fenotyp, ale nevíme, jaké konkrétní poškození genu chorobu u vyšetřovaného jedince vyvolá.

# Nepřímá DNA diagnostika

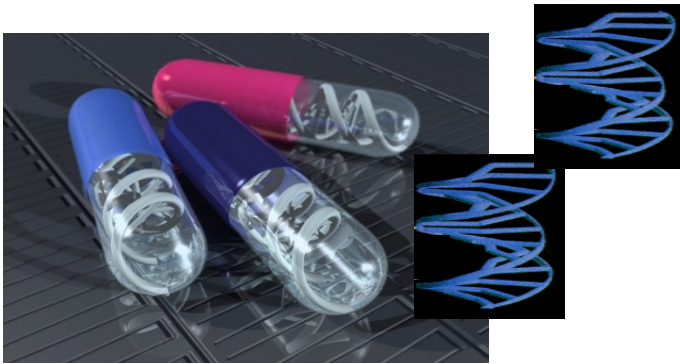
nezkoumá se přímo přítomnost  
nebo nepřítomnost určité poruchy v genu,  
ale segregace markeru, který je ve vazbě na alelu genu,  
jejíž porucha vyvolá vadný fenotyp.

Marker, jehož segregace v rodokmenu se sleduje,  
se dědí totiž společně s alelou genu,  
sám ale s chorobou nemá žádnou příčinnou souvislost.

Ve zkoumaném rodokmenu se porovnává segregace markeru  
se segregací choroby

Jako markery se používají **DNA polymorfismy** .

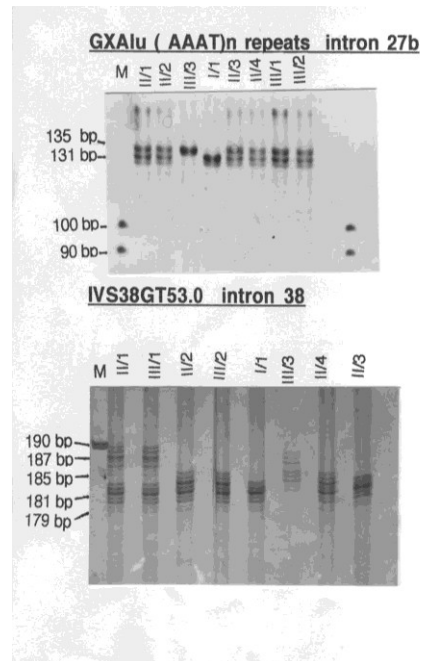
# Nepřímá DNA diagnostika





# Nepřímá diagnostika

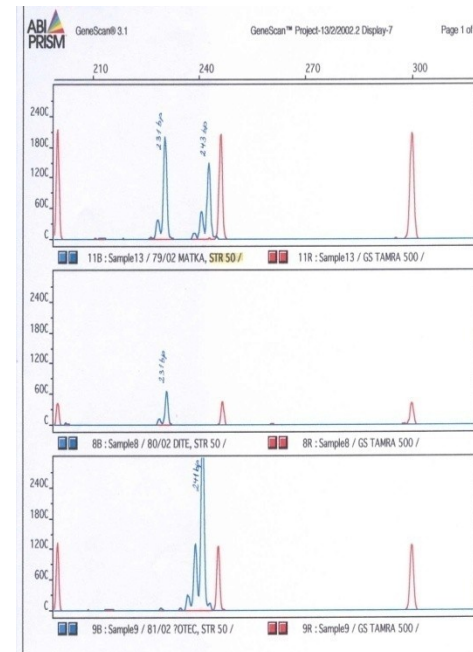
## gelová elektroforéza



5% PAGE, 200V / 20°C / 2 h.  
barveno AgNO<sub>3</sub>

6,5% denaturační PAGE,  
50W / 50°C / 2,5 h.

## kapilární elektroforéza



# Nepřímá DNA diagnostika

Vazebná analýza je umožněna:

- v rodinách s dvěma a více jedinci s klinicky potvrzenou diagnózou
- rozlišením dvou chromozomů pomocí markerů na DNA
- přiřazením DNA markerů (tj. chromozomu) k patologii v rodině

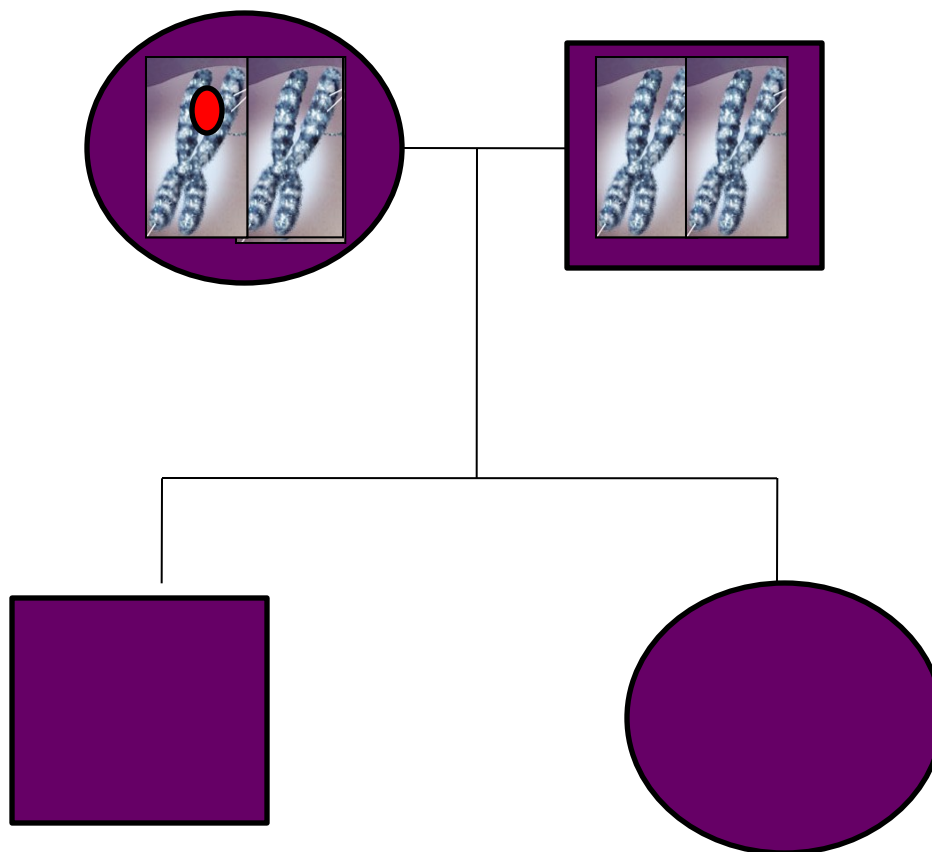
## Základní principy nepřímé DNA diagnostiky

- 1) odlišení dvou chromozomů rodičů (heterozygota markerů)
- 2) určení fáze (určení haplotypu - souboru alel polymorfních míst ve vazbě)
- 3) určení haplotypu (chromozomu) asociovaného s patologií v rodině

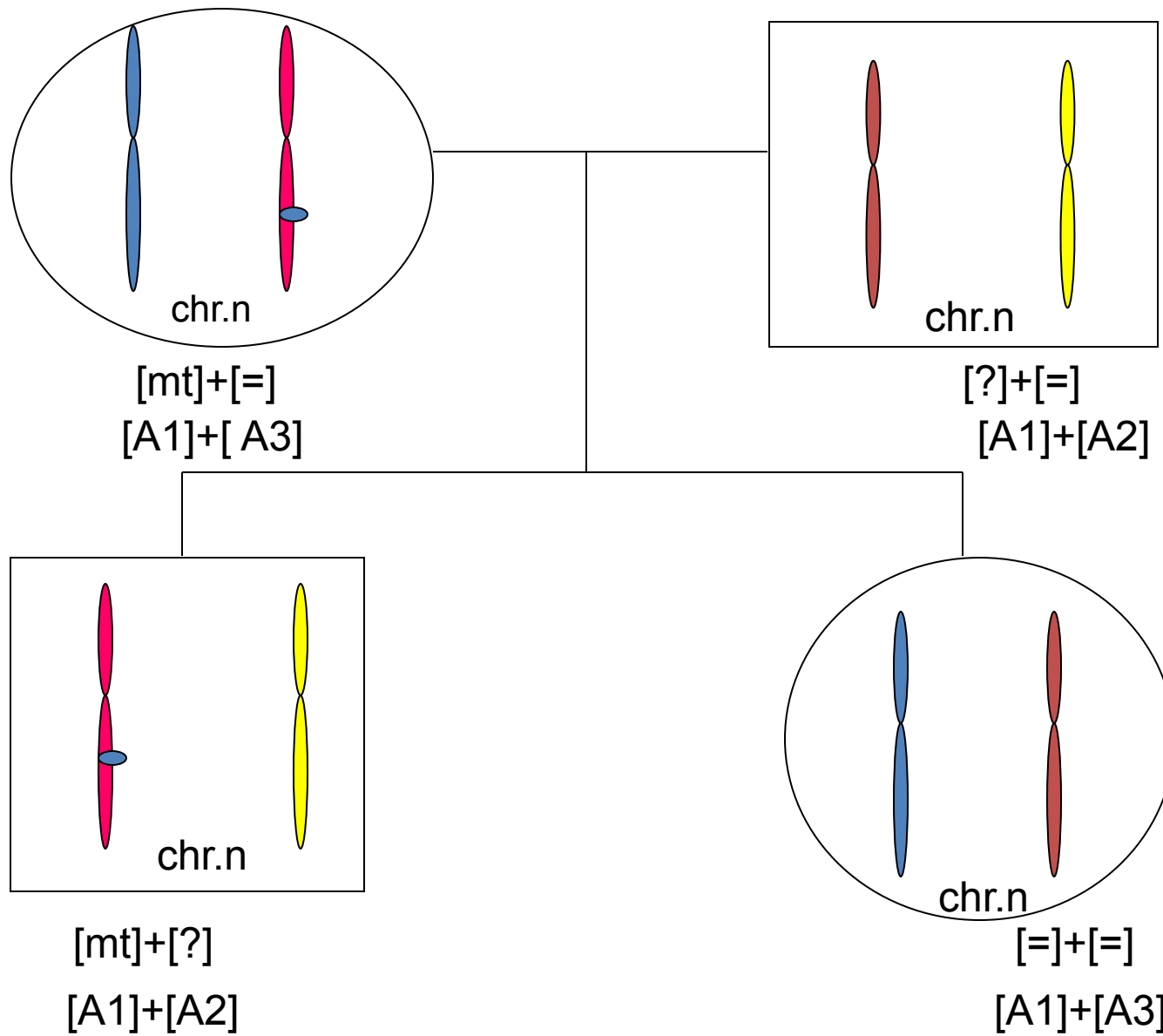
Přísná rodinná specifita  
Nikdy nepotvrzuje diagnózu

# Nepřímá DNA diagnostika

užitím vazebných markerů v rodinných studiích odhalí chromozom v asociaci s nemocí v rodině

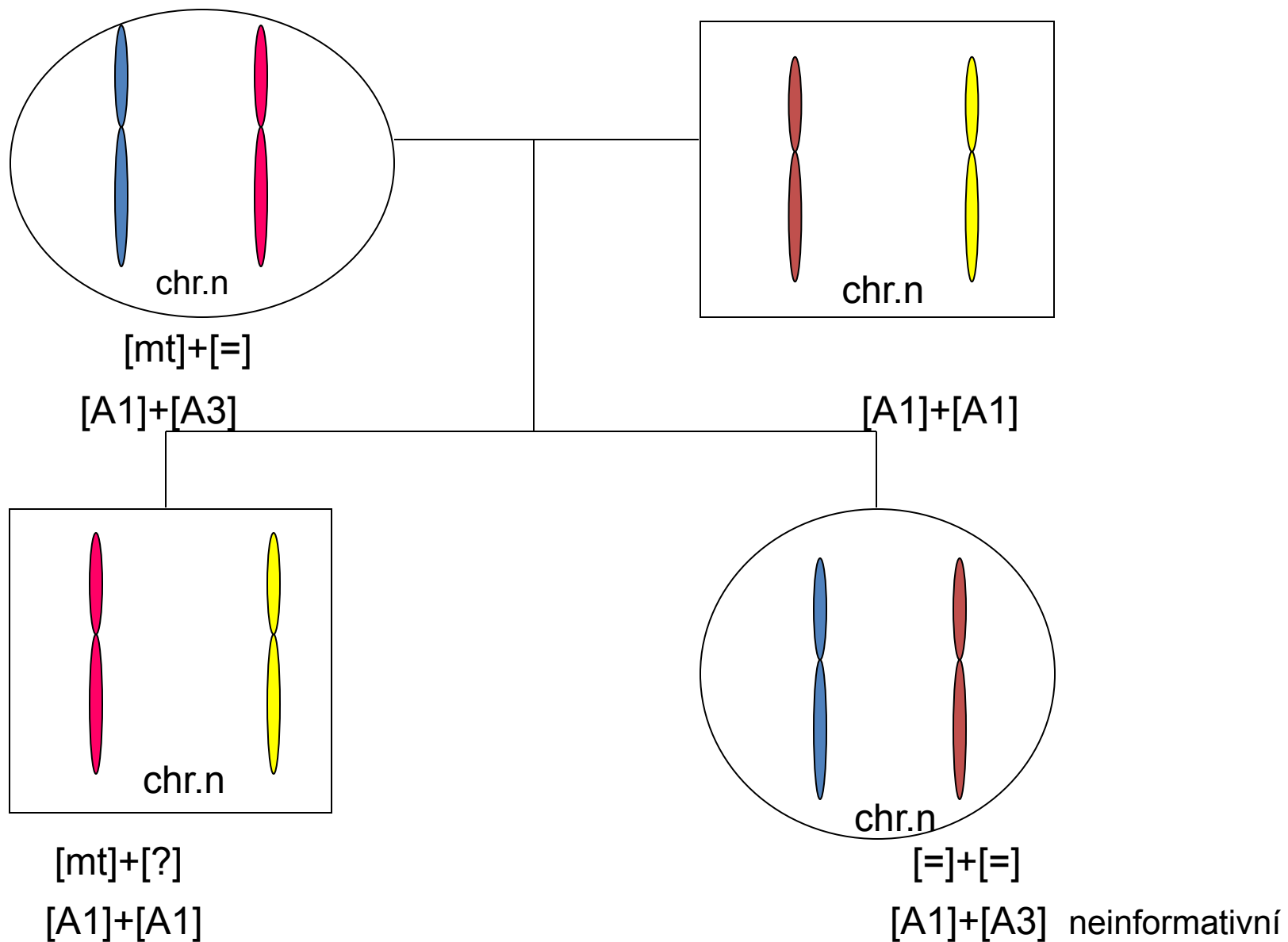


# Nepřímá DNA diagnostika



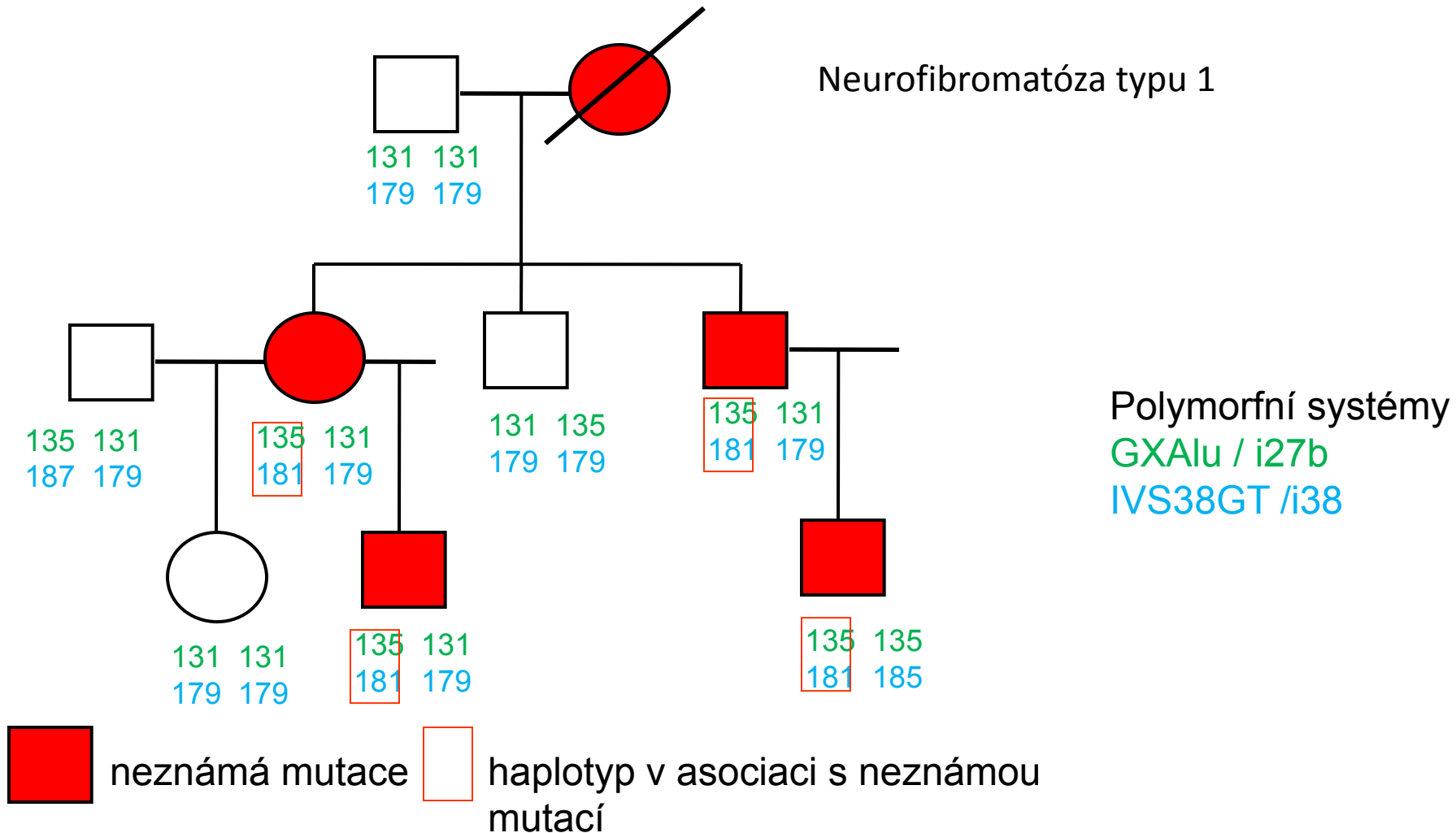
informativní

# Nepřímá DNA diagnostika



# Nepřímá DNA diagnostika

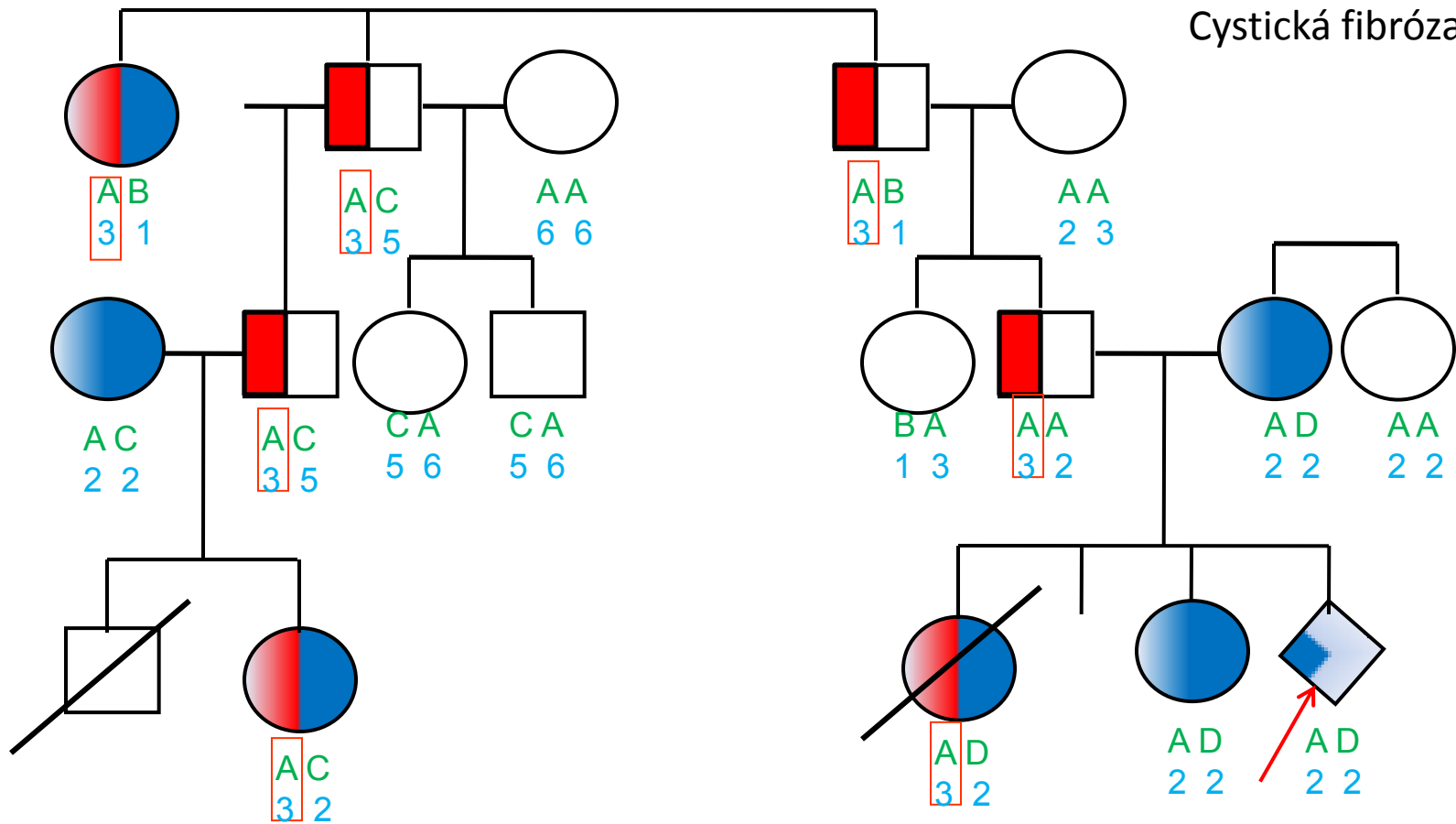
## Autozomálně dominantní dědičnost



# Nepřímá DNA diagnostika

## Autozomálně recesivní dědičnost

Cystická fibróza



F508del

neznámá mutace

Polymorfní systémy IVS17BTA alely 1 - 6

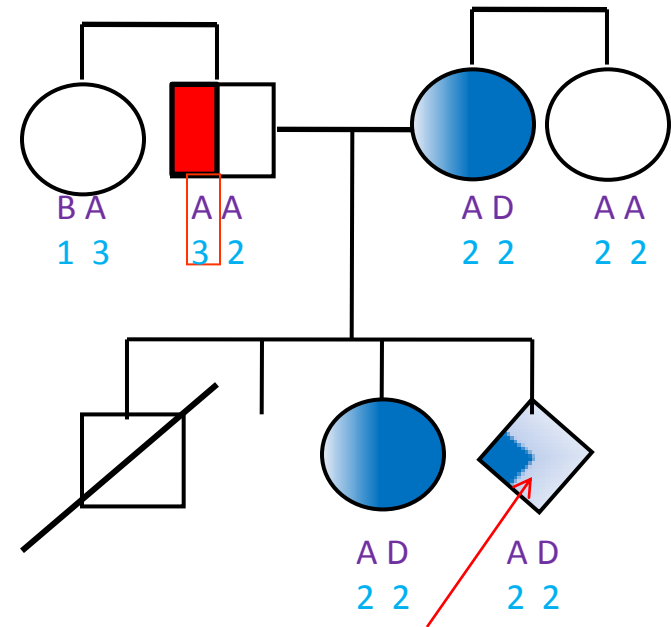
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací

# Nepřímá DNA diagnostika

## Autozomálně recesivní dědičnost

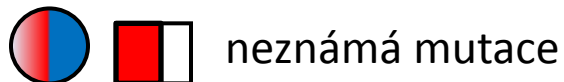
Cystická fibróza



K určení patologického haplotypu slouží genotyp zdravé sestry zemřelého probanda



F508del



neznámá mutace

Polymorfní systémy IVS17BTA alely 1 -6

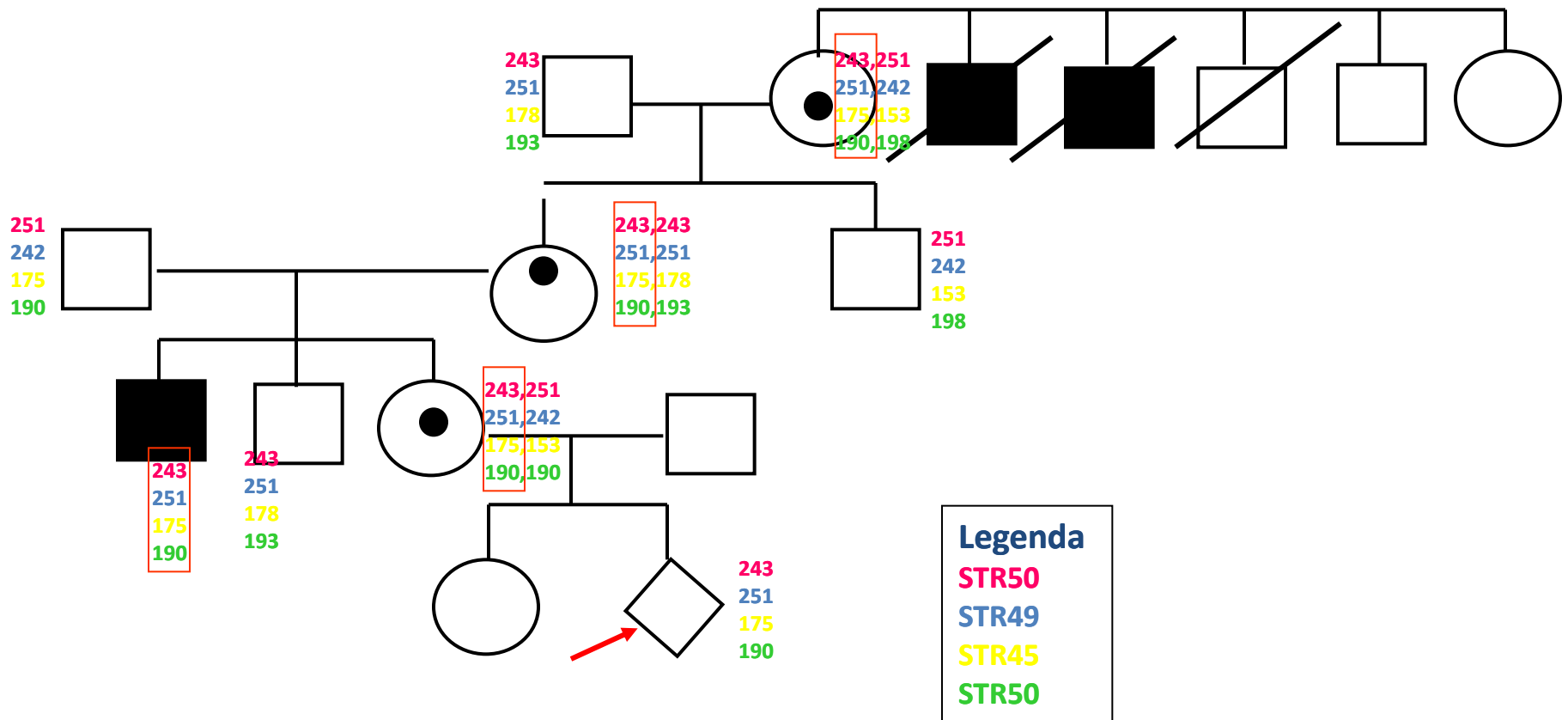
IVS8BTA alely A - D

haplotyp v asociaci s neznámou mutací



# Nepřímá DNA diagnostika

## X vázaná dědičnost Duchennova svalová dystrofie

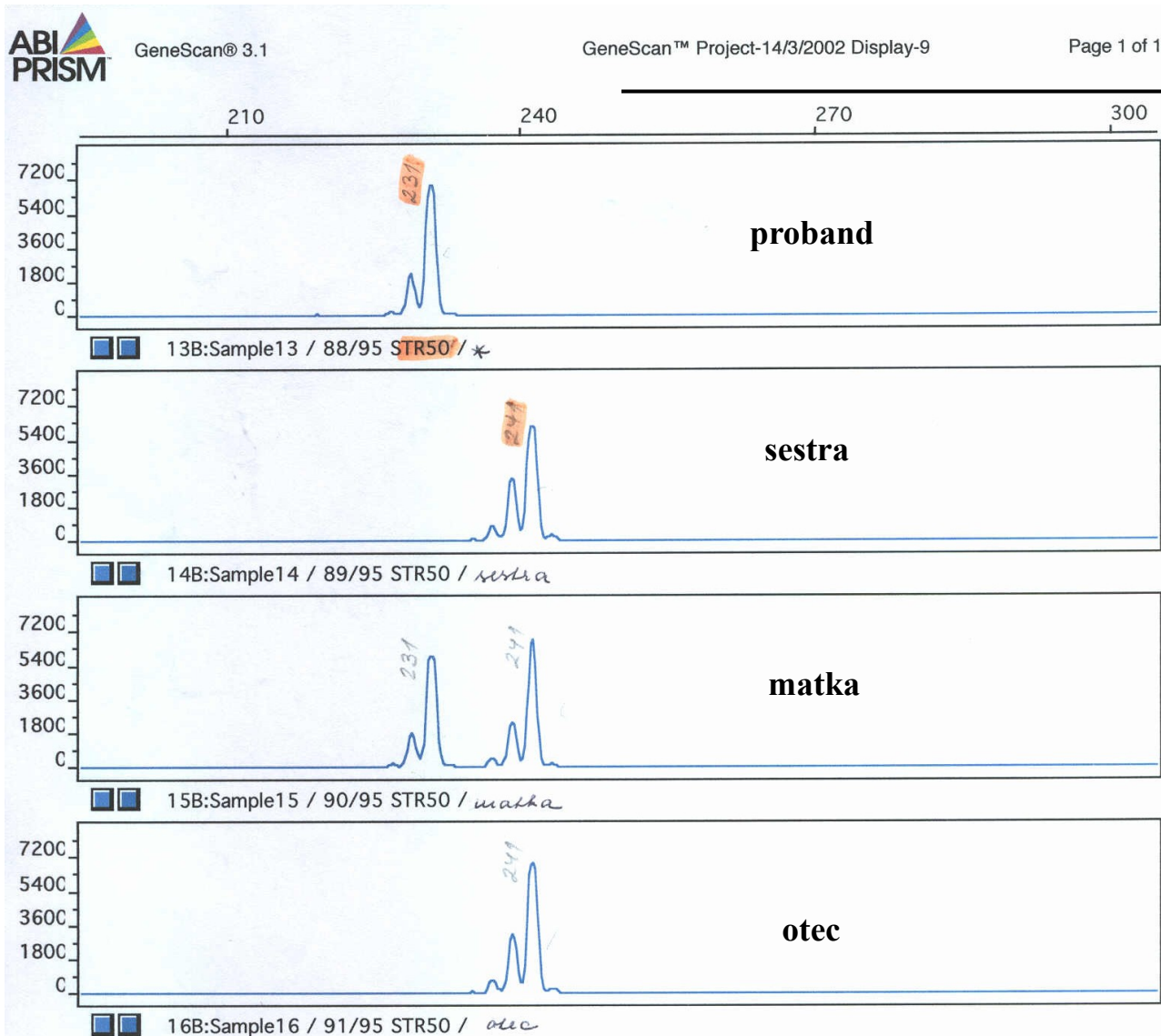


■ neznámá mutace □ haplotyp v asociaci s neznámou mutací

# Nepřímá DNA diagnostika

## X vázaná dědičnost

Duchennova svalová dystrofie



# Nepřímá DNA diagnostika

## X vázaná dědičnost Duchennova svalová dystrofie

### Polymorfní místa v dystrofinovém genu

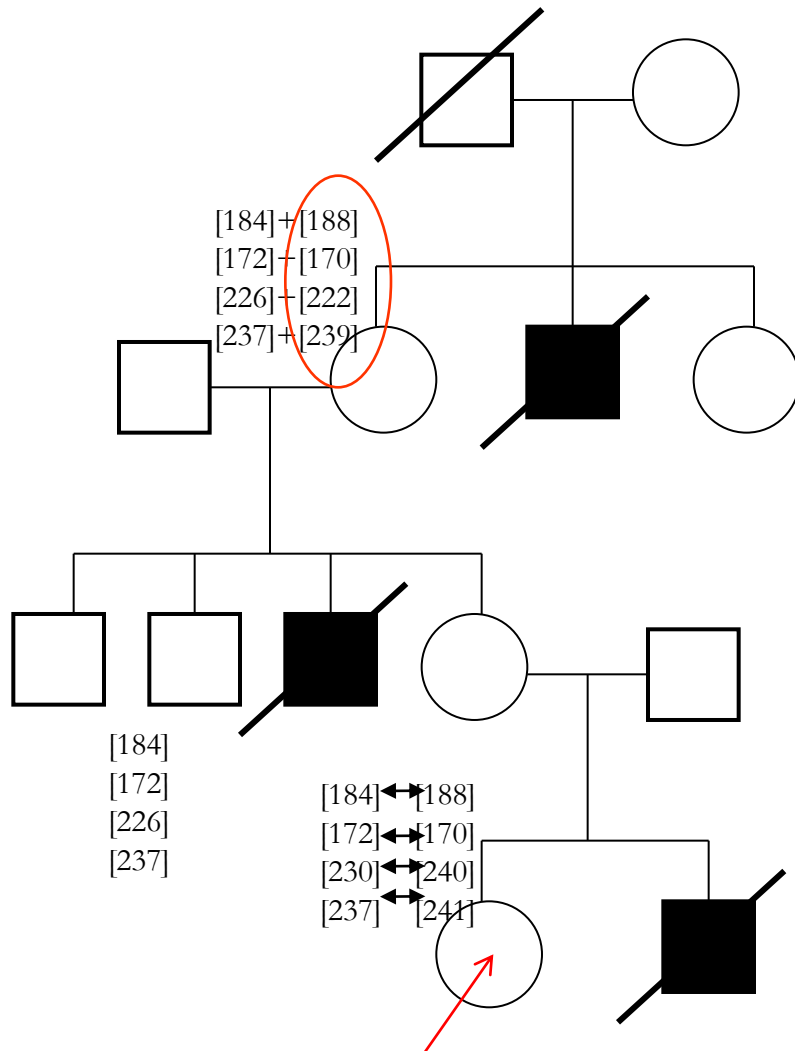


#### Legenda

- 5'(CA)n alely 172 – 184 pb
- pERT 87-8/Taq I alela 145 pb (-), 71 pb a 74pb (+)
- pERT 87-15/BamH I alela 216 pb (-), 166 pb a 50 pb (+)
- STR sekvence /(CA)n/: STR44 alely 174 – 204 pb, heterozygozyta 87%
- STR45 alely 156 – 184 pb, heterozygozyta 89%
- STR49 alely 227 – 257 pb, heterozygozyta 93%
- STR50 alely 233 – 251 pb, heterozygozyta 71%
- 3'(CA)n alely 131 – 137 pb

# Nepřímá DNA diagnostika

## X vázaná dědičnost Duchennova svalová dystrofie



Nelze určit haplotyp probandky  
vzhledem neznalosti genotypu  
otce a matky

Probandka není DMD přenašečka

haplotypy polymorfních markerů

[xxx] STR44

[xxx] STR45

[xxx] STR49

[xxx] STR50

[xxx]

[xxx]

[xxx]

[xxx]

haplotyp polymorfních markerů  
ve vazbě s patologií

# Nepřímá DNA diagnostika

Faktory, které ovlivňují spolehlivost nepřímého molekulárně genetického vyšetření

## 1. Spolehlivost klinické diagnózy

Klinická diagnóza onemocnění musí být naprosto přesná.

Je-li vyslovena špatná klinická diagnóza, uvedené molekulární vyšetření nemá smysl, protože se sledovala segregace markeru vázaného na gen, který nemá s chorobou nic společného.

Výsledek molekulárního vyšetření je v tom případě nesmyslný a zavádějící.

## 2. Možnost rekombinace mezi markerem a genem

Mateřská a otcovská chromozomální DNA se v průběhu crossing-overu "promíchá" v rámci homologních chromozomů.

Pohlavní buňka pak nese nově "smíchanou" DNA - takto se vedle sebe mohou v gametě dostat informace, které spolu původně nesousedily

Např. marker původně v sousedství patologické alely na otcovské DNA se tímto "smícháním" octne v sousedství "zdravého" alely pocházející z mateřské DNA, neboť mezi ním a markerem došlo k rekombinaci.

Pravděpodobnost rekombinace roste se vzdáleností mezi sledovaným markerem a genem.

## 3. Spolehlivost biologických vztahů v rodokmenu

Biologické otcovství vyšetřovaných osob v rodokmenu musí souhlasit s údaji uvedenými v rodinné anamnéze, která je většinou sestavena na podkladě výpovědi probanda.

Je-li zapotřebí vyšetřit široký rodokmen, proband nemívá o těchto citlivých údajích týkajících se rodičů, prarodičů nebo vzdálenějších příbuzných znalost.

Někdy je jako vedlejší produkt nepřímého molekulárně genetického vyšetření odhaleno, že u některých osob nesouhlasí biologické vztahy v rodině.

Někdy může tato souvislost zůstat nepoznána a může vést k falešnému výsledku.

# Nepřímá DNA diagnostika

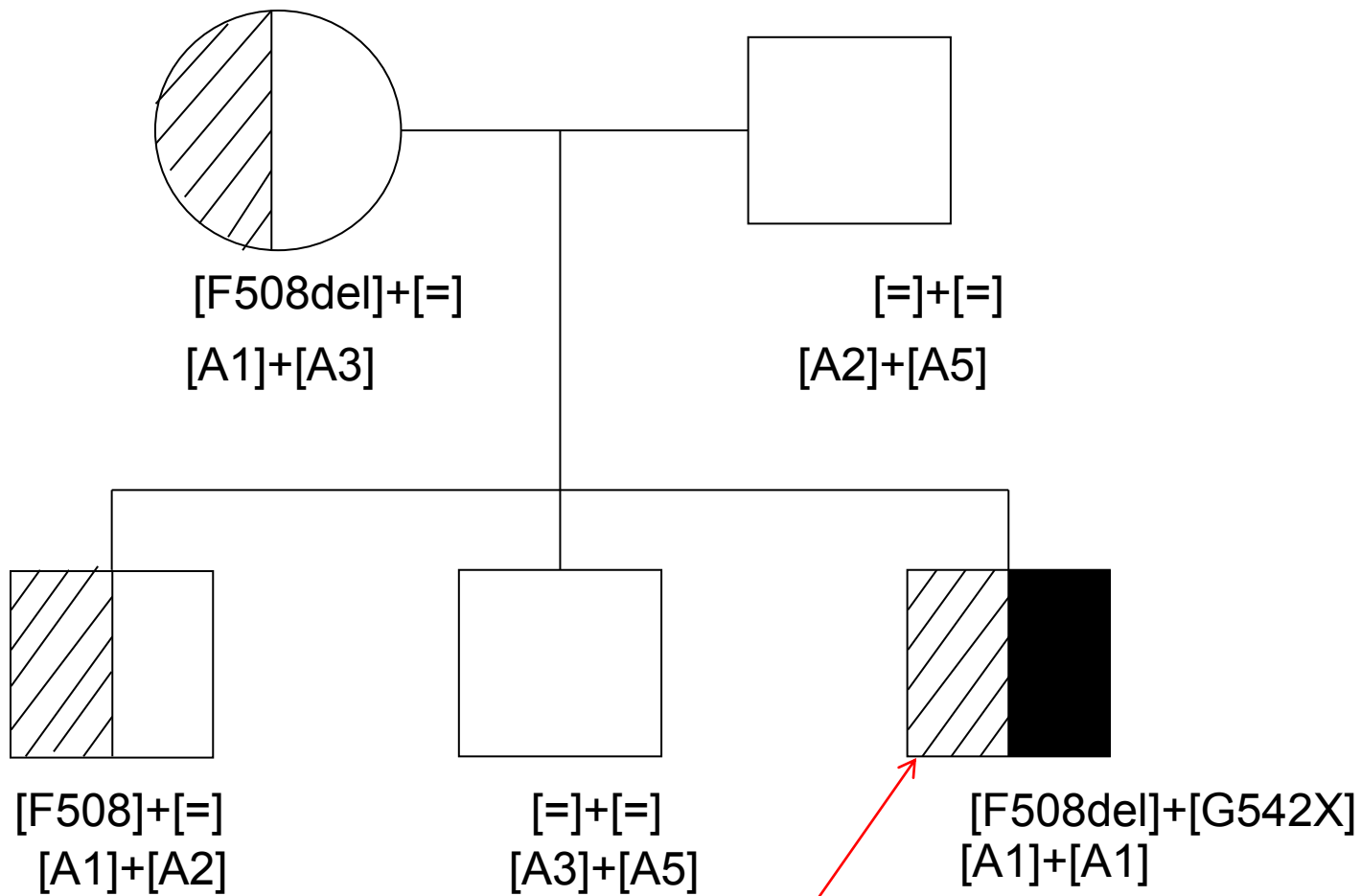
K provedení **nepřímé diagnostiky** je u některých chorob nutné vyšetřit co největší okruh členů rodiny, tedy i zdravých, u kterých se nepředpokládá, že by mohli být nositeli patologie v(**partneři osob v riziku**).

Z praktického hlediska je to komplikované a někdy až nemožné, v některých rodinách se jejich členové ani příliš neznají a nemají ochotu podstupovat vyšetření kvůli probandovi, který je z jejich hlediska vzdáleným příbuzným.

Nepřímá molekulárně genetická diagnostika má mnoho nevýhod a její význam postupně klesá s tím, jak se vyvíjejí možnosti přímého molekulárně genetického vyšetření.

# Nepřímá DNA diagnostika

Cystická fibróza



# Určení otcovství a příbuznosti





Matka je vždy jistá, otec ne, říká staré úsloví.

I když by se v dnešní době darování vajíček a pronájmů děloh dalo polemizovat i s první částí, rčení o nejistém otci je platné už tisíciletí.

Uvádí se, že až deset procent dětí má v rodném listě uvedeného otce jiného, než je ten biologický.

Nejednomu muži z toho vstávají vlasy hrůzou a po právu hodně z nich znejistí, jestli na něj jeho partnerka náhodou neušila taky nějakou boudu. Co když jsem zrovna ten desátý?

## To dítě není moje?!



Až donedávna museli muži spoléhat na partnerčinu věrnost a pravdomlupnost, což je stavělo do horší pozice a všechny trumfy jsme držely v rukách my, ženy. A o tom, že všechny ženy taky nemají čistý štít, není třeba diskutovat. Každá desátá žena svému muži celoživotně lže.



Až donedávna měli muži tak trochu smůlu,  
jedinou možnost jim nabízelo testování **krevních skupin**.  
Ale tou je možné otcovství víceméně jen vyloučit než stoprocentně potvrdit.  
Všichni další muži se stejnou krevní skupinou mohli být úplně klidně také otci dítěte.  
Protože krevních skupin není tolik a variabilita je malá.

Prvně začalo ženám trochu téct do bot s rozvojem transplantací,  
protože při transplantaci se hledá dárce se stejným **imunologickým profilem**  
a ten dědíme po rodičích.  
Zejména u transplantací krve a kostní dřeně se začne hledat dárce v nejbližší rodině.



Ale opravdovou revoluci pro muže znamenal rozvoj genetiky a zkoumání DNA.



Dnešní genetiky ovšem během posledních let nabízí možnosti, o jakých se dřív ani nesnilo.

Nejistý otec si bez problémů ověří,

jestli vychovává svoje dítě

a nejistá matka zjistí, který z tatínek je ten pravý, biologický

DNA je natolik variabilní, že každý člověk je de facto unikát

a otcovství se tak dá potvrdit

nebo vyvrátit s téměř stoprocentní pravděpodobností.

Nakolik je celá tahle revoluce ve finále přínosná pro děti, je ovšem téma k další diskuzi.



A pokud se v "klasickém" příběhu nevěry při testu potvrdí mužovo tušení, že dítě není jeho, spustí se trpký proces, z nějž málokdo vyvázne bez rány.

Vztahy se hroutí, domácnost je po invazi pravdy zamořena zlověstnými výrazy.

Zrada. Potupa. Ostuda.

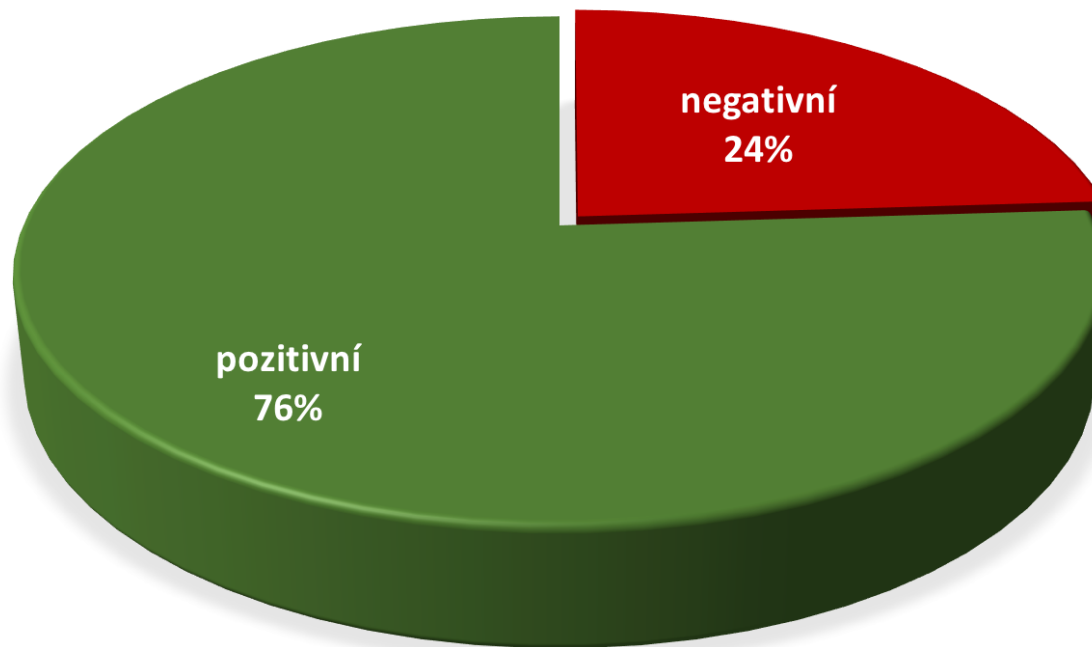
Výčitky. Urážky. Hádky.

Soud. Rozvod. Alimony.

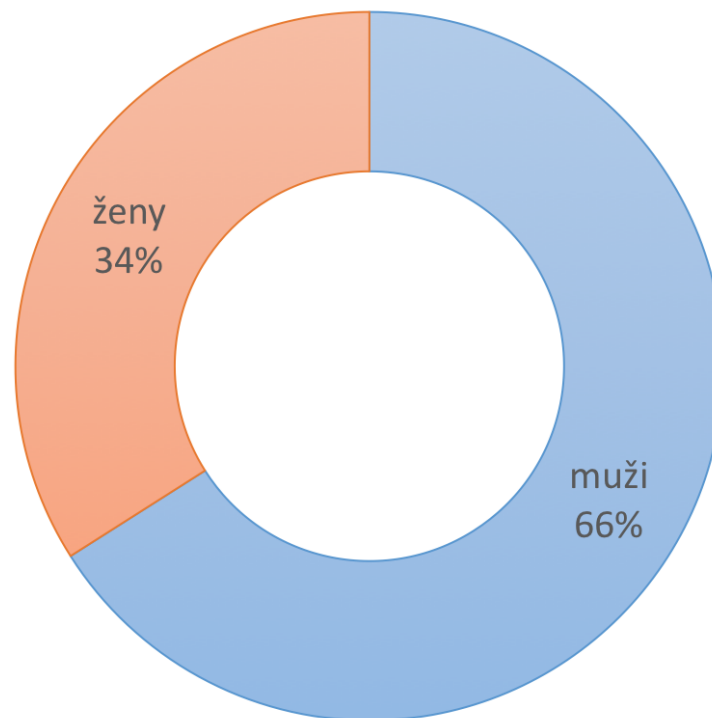
Zdroj: [http://ona.idnes.cz/je-moje-linda-me-dite-test-otcovstvi-na-vlastni-kuzi-fyj-/vztahy-sex.aspx?c=A080424\\_165928\\_ona\\_on\\_ven](http://ona.idnes.cz/je-moje-linda-me-dite-test-otcovstvi-na-vlastni-kuzi-fyj-/vztahy-sex.aspx?c=A080424_165928_ona_on_ven)



## VÝSLEDKY TESTŮ OTCOVSTVÍ - ROK 2014



## objednávky testů dle pohlaví objednatele - rok 2014





# DNA fingerprinting

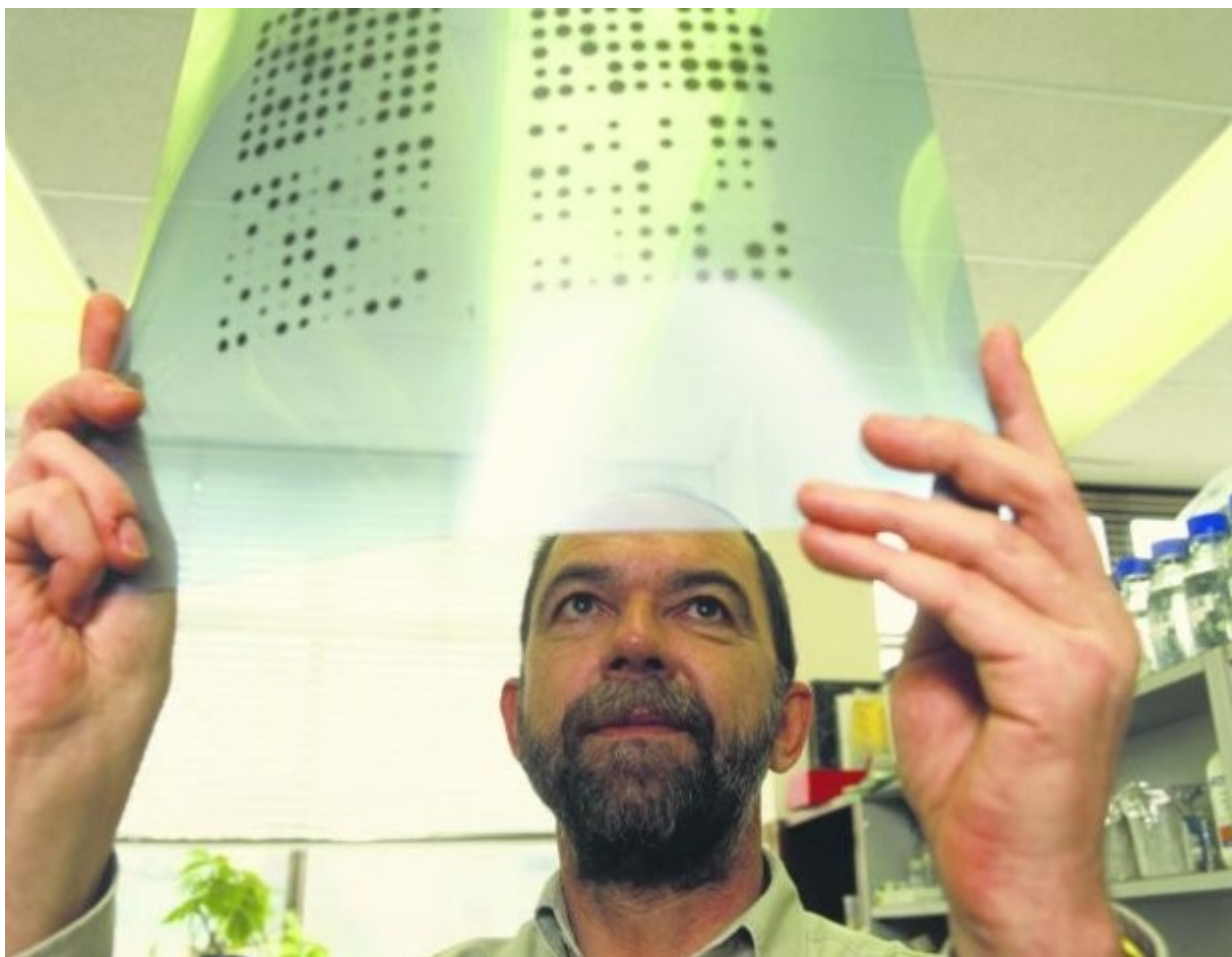
Tato situace se od základu změnila ráno 10. září roku 1984 v 9 hodin a 5 minut, kdy si britský genetik **Alec Jeffreys** pracující v laboratoři na univerzitě v anglickém Leicesteru povšiml zdánlivě nepatrných rozdílů v dědičné informaci různých členů rodiny jednoho laboranta.

Tak se zrodila technika „otisku DNA“ neboli „DNA fingerprintu“.

Do roku 1987, kdy byl celý postup komercializován, zůstal Jeffreys jediným člověkem na světě, který uměl „otisk DNA“ stanovit.

Metoda našla široké uplatnění v kriminalistice a dnes s její pomocí usvědčuje násilníky a zloděje i plejáda detektivů v televizních seriálech.

Už první případ, který Jeffreys rozlouskl s pomocí „DNA fingerprintu“, se však týkal důkazu rodičovství. Britští imigrační úředníci odmítli uvěřit tvrzení mladíka, že se vrací z návštěvy u příbuzných v Ghaně k rodičům, kteří dostali ve Velké Británii azyl. Cizinecká policie byla přesvědčená, že se s pasem mladíka snaží do země vloudit jeho vzdálený příbuzný. Jeffreys vyhověl žádosti mladíkovy matky a dokázal, že chlapec je její syn.



**Prof. Sir Alec Jeffreys**

**Jsem biodetekтив,  
jmenuji se DNA a usvědčím  
každého!**



# Jsem biodetektiv, jmenuji se DNA a usvědčím každého!

- Řešení trestních činů – shoda mezi podezřelým a stopou místa činu
- Oběti neštěstí – havárie letadla, zemětřesení....
- Vojáci ve válce – kdo je „neznámý“ voják....
- Paternitní testování – kdo je otcem....
- Příbuzenské vztahy – nárok na dědictví.....
- Hledání pohřešovaných osob – nález těla a identifikace
- Vytváření databáze usvědčených zločinců

*Ve všech případech se určují DNA profily pomocí STR markerů a následně je hledána shoda s referenčním vzorkem*

# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

délka základní repetice 2 – 6 bp

počet opakování repetice 2 – 100 bp

Rozptýlené rovnoměrně v lidské genomu

Vyskytují se běžně v populaci

Nejsou přepisovány do proteinu

leží v intronech

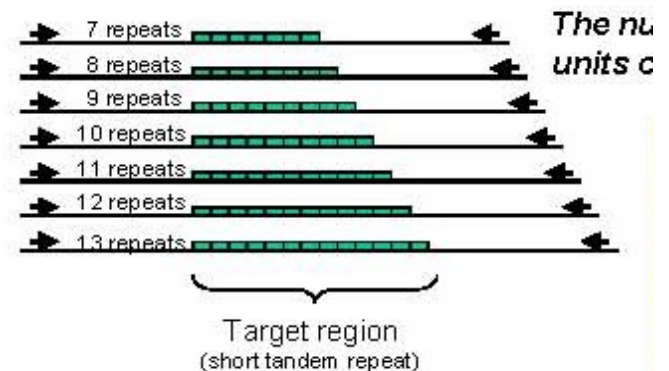
Nejsou příčinou choroby

Tvoří vzorce bez vztahu s fenotypem

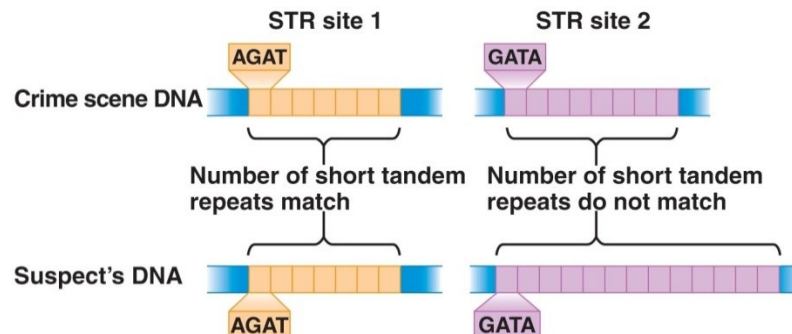
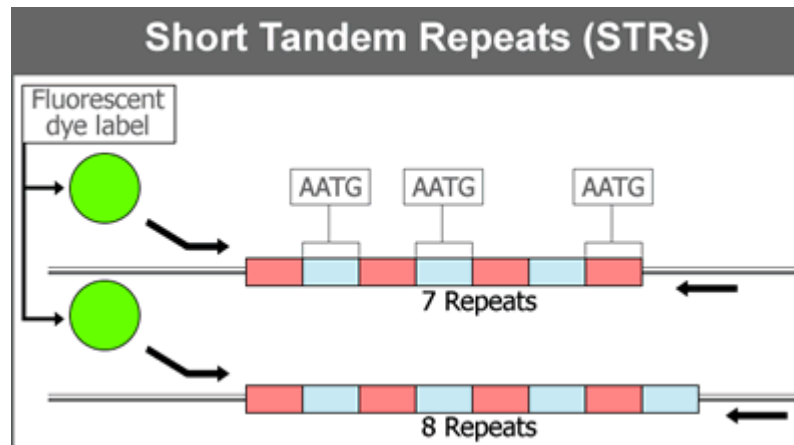
Mezi jednotlivci se velmi liší

Odlišují jednoho člověka od druhého

```
TCCCAAGCTCTTCTTCCCTAGATCAATACAGACAGAAGACA  
GGTGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA  
TAGATAGATATCATTGAAAGACAAAACAGAGATGGATGATAGAT  
ACATGCTTACAGATGCACAC
```

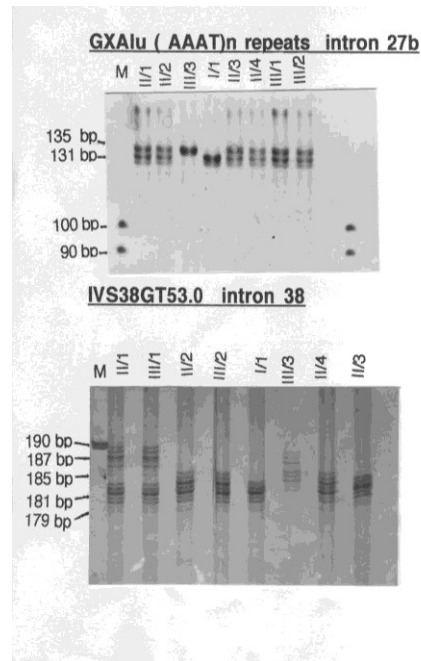


# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)



# Mikrosatelity - krátké tandemové repetice STR (Short Tandem Repeats)

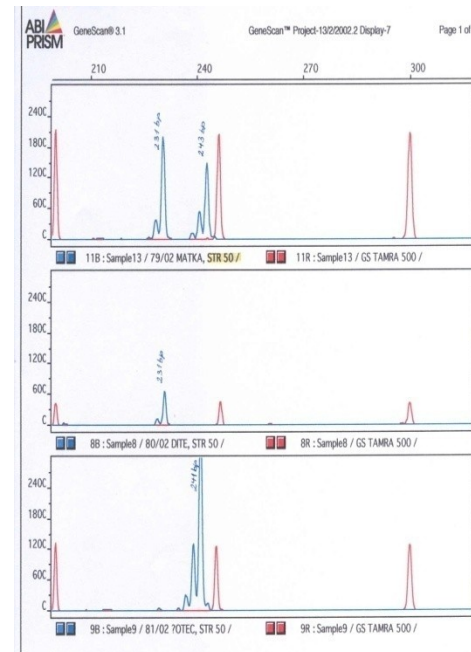
## gelová elektroforéza



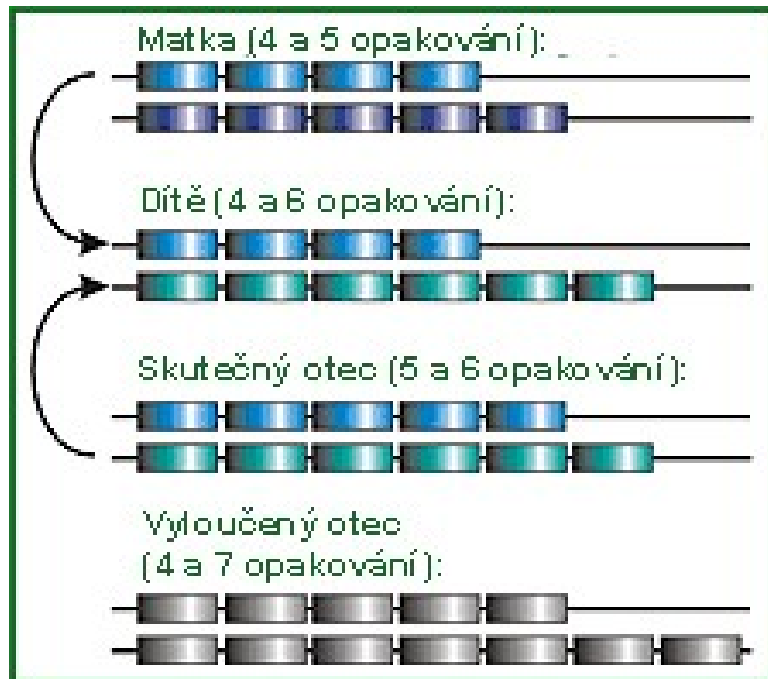
5% PAGE, 200V / 20°C / 2 h.  
barveno AgNO<sub>3</sub>

6,5% denurační PAGE,  
50W / 50°C / 2,5 h.

## kapilární elektroforéza



# STR - určení otcovství

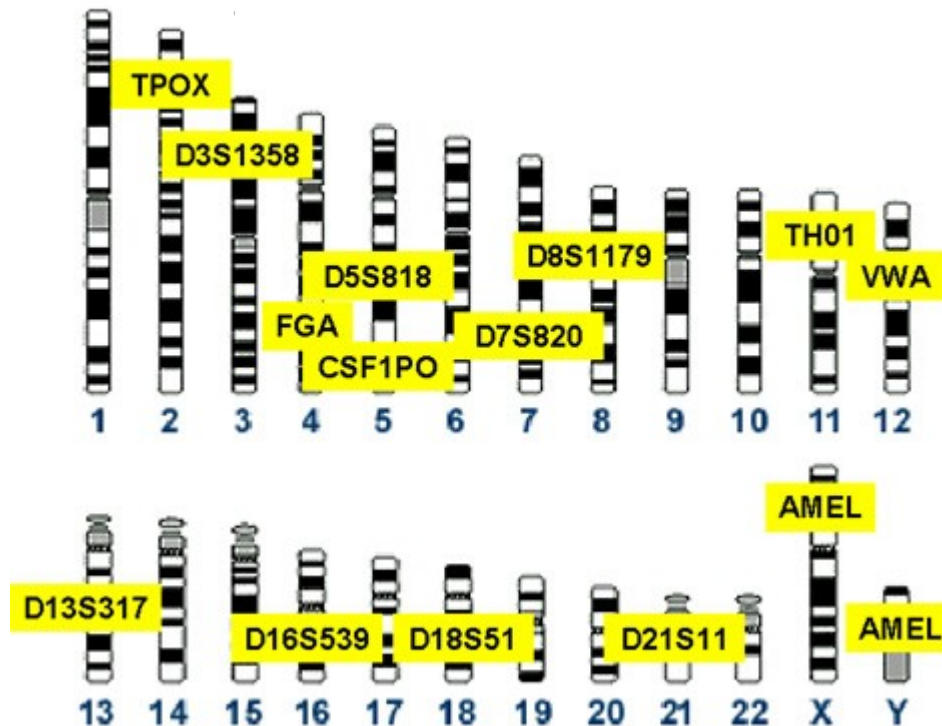


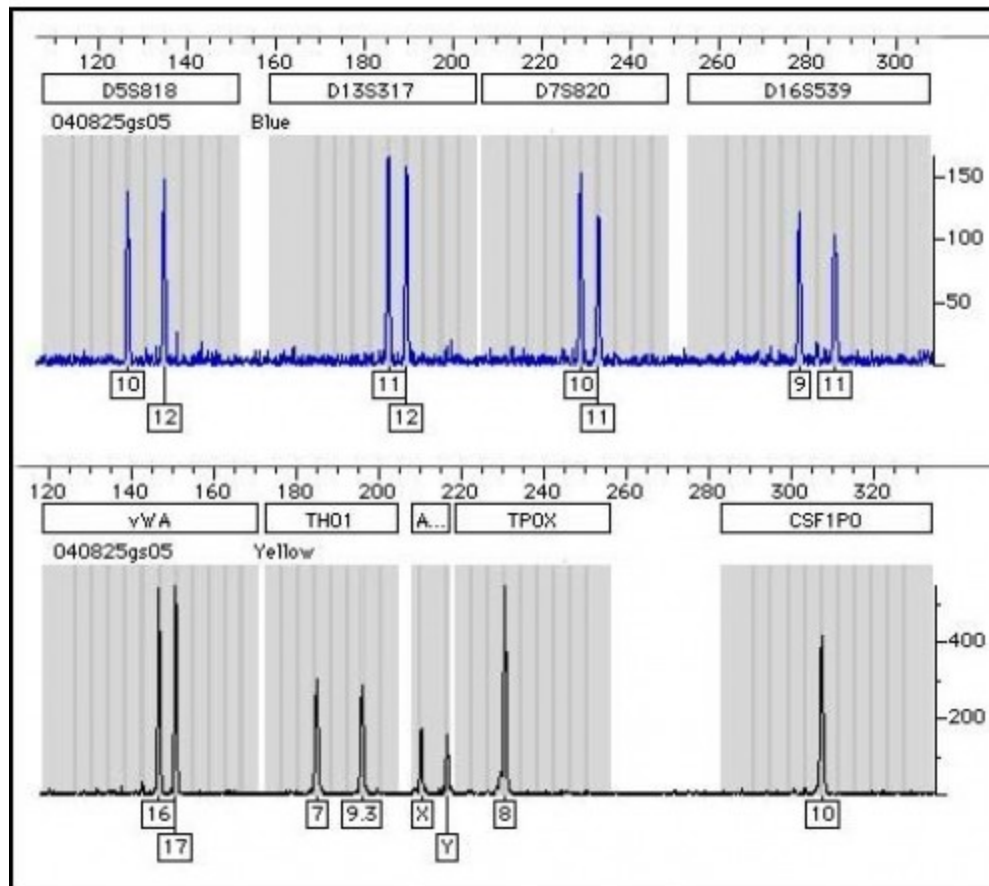


# CODIS loci

CODIS loci jsou DNA oblasti / znaky, které používá FBI a další světové agentury jako dohodnutý standard pro ukládání genetických profilů osob.

Ve vyhodnocení paternitních testů se v současné době používá 16 oblastí DNA.





	Loci	P48/16	P49/16
CODIS/ESS loci	D3S1358	shoda	
	D8S1179	shoda	
	D18S51	shoda	
	D21S11	shoda	
	FGA	shoda	
	TH01	shoda	
	vWA	shoda	
CODIS loci	D16S539	shoda	
ESS loci	D1S1656	shoda	
	D2S441	shoda	
	D2S1338	shoda	
	D10S1248	shoda	
	D12S391	shoda	
	D19S433	shoda	
	D22S1045	shoda	
Other loci	SE33	shoda	
	Amelogenin	XY	XY

# Pravděpodobnost

Měřítka pro stupeň důvěry v nějaké tvrzení nebo hypotézu, přičemž tato důvěra je založená na rozumové analýze dostupných informací

P apriorní (%)

P posteriorní (%)

$$P = \frac{P_{\text{výchozí}} \times LR}{P_{\text{výchozí}} \times LR + 1 - P_{\text{výchozí}}}$$

Při  $P_{\text{výchozí}} = 0,5$

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

# Hummelova slovní vyjádření a odpovídající hodnoty pravděpodobnosti otcovství (při 50% výchozí pravděpodobnosti otcovství, PO50 (W)) a paternitních indexů (PI)

PO50 (W)	PI	slovní vyjádření dle Hummela
70,00%-79,00%	2,33 – 3,76	pouze formálně svědčí pro otcovství
80,00%-89,00%	4,00 – 8,09	náznak otcovství
90,00%-94,90%	9,00 – 18,61	otcovství pravděpodobné
95,00%-98,90%	19,00 – 89,9	otcovství velmi pravděpodobné 99,00%-
99,00 %-99,74%	99,00 – 383,6	otcovství vysoce pravděpodobné 99,75%-
99,75% -	>399	otcovství prakticky prokázáno

# Věrohodnostní poměr

Likelihood ratio

Podíl dvou pravděpodobností stejného důkazu při různých hypotézách

Při určování otcovství se pro věrohodnostní poměr používá označení index paternity, paternitní index (PI)

Slovní vyjádření:

Atž jsou důkazy ve prospěch otcovství pana A vůči dítěti  
a ve srovnání s otcovstvím neznámého nepříbuzného muže  
(vyjádřené jako apriorní  $p_0$ )  
toto vyše:



# Věrohodnostní poměr

Odvozuje se z

Bayesova věta  
Hardy-Weinbergova rovnováha  
Mendelovská dědičnost



# Bayesova věta

se zabývá podmíněnými pravděpodobnostmi jevů.

Pro formální zápis podmíněné pravděpodobnosti jevu **A** za předpokladu výskytu jevu **B** používáme zápis  **$P(A/B)$** .

Anglický duchovní Thomas Bayes (1702–1761) objevil,

že podmíněná pravděpodobnost  **$P(A/B)$**  souvisí s opačně podmíněnou pravděpodobností  **$P(B/A)$**  takto (jednoduchá forma Bayesovy věty):

Máme-li dva náhodné jevy **A** a **B**, jejichž pravděpodobnosti jsou  **$P(A)$**  a  **$P(B)$** , a pokud  **$P(B) > 0$** , potom platí

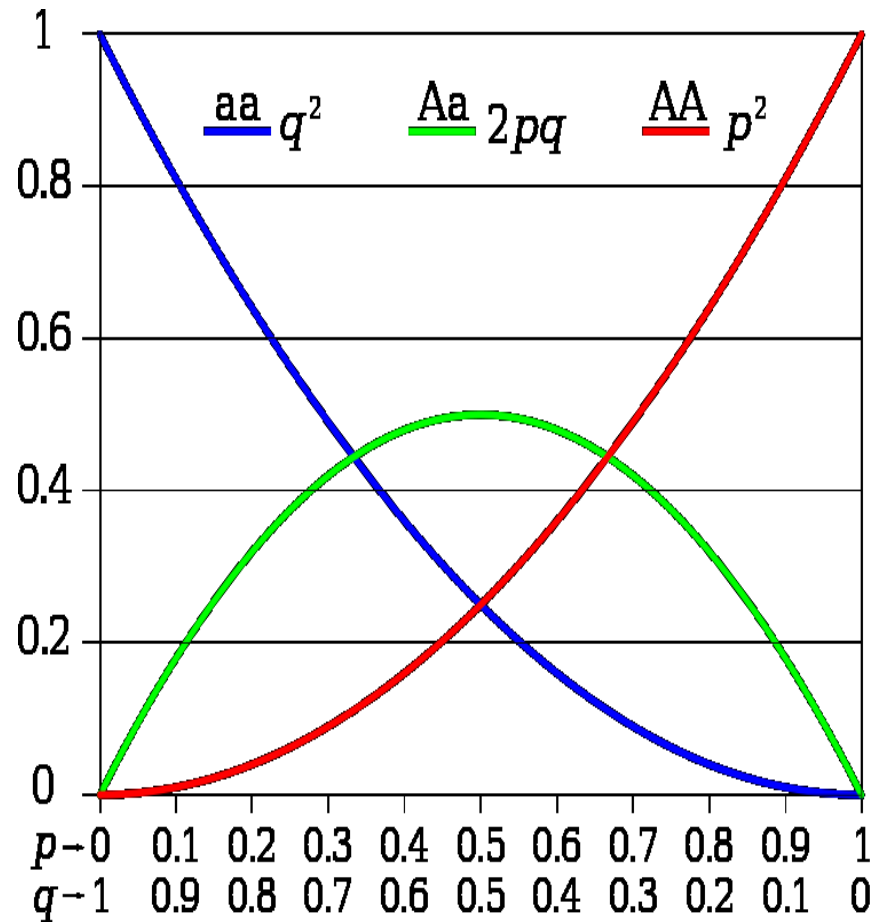
$$P(A/B) = \frac{P(B/A) P(A)}{P(B)}$$

*(jednoduchý Bayesův vzorec)*





# Hardy-Weinbergova rovnováha



je teoretické rovnovážné rozložení alel v populaci, které odvodil Godfrey Harold Hardy, britský matematik a přítel genetika Reginalda Punetta, a nezávisle na něm německý lékař Wilhelm Weinberg v roce 1908.

# Hardy-Weinbergova rovnováha

- Popisuje frekvenci genotypů v idealizované populaci. Model byl formulován za nákladě několika předpokladů:
- Populace je dostatečně velká, takže lze při sestavování modelu předpokládat se zjednodušujícím předpokladem nekonečně velké populace. V praxi postačuje, aby byla populace tak velká, že lze zanedbat genový drift
- V populaci neprobíhá selekce.
- V populaci neprobíhají mutace.
- Neprobíhá ani emigrace ani imigrace.
- Areál obývaný populací je takový, že se může jakýkoliv jedinec křížit s jakýmkoliv jiným jedincem.
- Jedinci jsou oboupohlavní.

# Hardy-Weinbergova rovnováha

- Předpokládejme nyní, že jsou v populaci jen dvě alely sledovaného genu označené  $A$  (dominantní) a  $a$  (recesivní). Frekvenci (relativní četnost) alely  $A$  označíme  $p$ , frekvenci alely  $a$  označíme  $q$ . Protože předpokládáme, že jsou v populaci jen tyto dvě alely, musí platit:

$$p + q = 1$$

- Pravděpodobnost, že vznikne jedinec s genotypem  $AA$ , znamená, že v obou případech byla vylosována alela  $A$ , nebo přesněji, že byla "matčina" alela  $A$  a současně byla "otcova" alela  $A$ . Pravděpodobnost vylosování alely  $A$  je její frekvence  $p$ , tedy:

$$P(AA) = p \times p = p^2$$

- Pravděpodobnost, že vznikne jedinec s genotypem  $aa$ , lze odvodit zcela analogickou úvahou:

$$P(aa) = q \times q = q^2$$

- Pravděpodobnost, že vznikne jedinec s genotypem  $Aa$

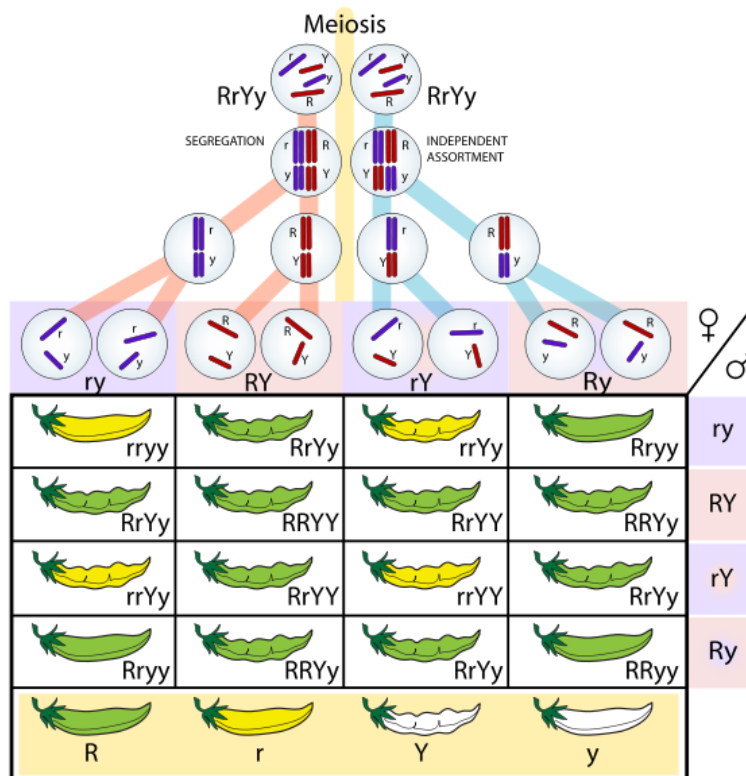
$$P(Aa) = pq + qp = 2pq$$

**Rovnice popisující Hardy-Weinbergovu rovnováhu** není pak ničím jiným než vyjádřením faktu, že jiné kombinace se v populaci nevyskytují:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

# Mendelovská dědičnost

- Zákon dominance
- Zákon segregace
- Zákon o volné kombinovatelnosti vloh



# Věrohodnostní poměr

Tabulka 4: Hodnoty koeficientů příbuznosti k

Příbuzenský vztah	$k_0$	$2k_1$	$k_2$
Rodič-dítě	0	1	0
Úplní sourozenci	0,25	0,5	0,25
Poloviční („nevlastní“) sourozenci	0,5	0,5	0
Prarodič-vnuk	0,5	0,5	0
Strýc/Teta-neteř/synovec	0,5	0,5	0
Bratrancei/Sestřenice 1.stupně	0,75	0,25	0
Bratrancei/Sestřenice 2.stupně	0,9375	0,0625	0
Nepříbuzní	1	0	0

Pravděpodobnosti kombinací genotypů E a F (Tabulka 5) lze odvodit s využitím indikátorové a Kroneckerovy delta funkce, což jde za rámec této publikace (Fung, 2008)

Tabulka 5: Pravděpodobnosti  $P(E, F)$  a věrohodnostní poměry pro  $H_p$ :  $(E, F) \sim (k_0, 2k_1, k_2)$  a  $H_d$ :  $(E, F) \sim (1, 0, 0)$  pro všechny kombinace genotypů E a F za H-W rovnováh

E	F	$P(E, F   H_p)$	$P(E, F)$
AA	AA	$k_0 p_A^4 + 2k_1 p_A^3 + k_2 p_A^2$	$p_A^4$
AA	AB	$2k_0 p_A^3 p_B + 2k_1 p_A^2 p_B$	$2p_A^3 p_B$
AA	BB	$k_0 p_A^2 p_B^2$	$p_A^2 p_B^2$
AA	BC	$2k_0 p_A^2 p_B p_C$	$2p_A^2 p_B p_C$
AB	AB	$4k_0 p_A^2 p_B^2 + 2k_1 p_A^2 p_B + 2k_2 p_A p_B$	$4p_A^2 p_B^2$
AB	AC	$4k_0 p_A^2 p_B p_C + 2k_1 p_A p_B p_C$	$4p_A^2 p_B p_C$
AB	CD	$4k_0 p_A p_B p_C p_D$	$4p_A p_B p_C$



# Pravděpodobnost

Měřítka pro stupeň důvěry v nějaké tvrzení nebo hypotézu, přičemž tato důvěra je založená na rozumové analýze dostupných informací

P apriorní (%)

P posteriorní (%)

$$P = \frac{P_{\text{výchozí}} \times LR}{P_{\text{výchozí}} \times LR + 1 - P_{\text{výchozí}}}$$

Při  $P_{\text{výchozí}} = 0,5$

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

**Tabulka vysvětlující rozdíly ve výsledcích analýzy určování otcovství:**

99% 1 ze 100 osob

**99,9% 1 z 1 000 osob (přibližně 2000 možných otců v ČR)**

99,99% 1 z 10 000 osob (přibližně 200 možných otců v ČR)

99,999% 1 ze 100 000 osob (přibližně 20 možných otců v ČR)

99,9999% 1 z 1 000 000 osob (přibližně 2 možní otcové v ČR)

99,99999% 1 z 10 000 000 osob

99,999999% 1 ze 100 000 000 osob



Pro DNA analýzy používáme celosvětově uznávané kity, které jsou doporučeny pro identifikaci lidské DNA. Jsou analyzovány specifické úseky v DNA, které zahrnuje tzv. systém CODIS (Combined DNA Index System, standart FBI) a ESS (European Standart Set).

## kit PowerPlex ESI/ESX 17

vyšetřeny nezávislé genetické znaky bez vazby, typu mikrosatelitů, které zahrnuje

tzv. **systém CODIS (standart FBI) a ESS (European Standart Set)**

D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA,

**systém CODIS (standart FBI)**

D16S539,

**ESS (European Standart Set)**

D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D22S1045

a **ostatní lokusy**

SE33 a gen pro amelogenin



# Dodržujeme tato pravidla

- Analýzy provádíme ve vlastní laboratoři, vzorky nikdy nikam neposíláme.
- Je zaručena maximální diskrétnost v průběhu celého procesu analýzy. S osobními údaji ani s výsledky analýz nepřicházejí do styku jiné osoby.
- DNA ze vzorků nejsou archivovány a nejsou poskytnuty třetím osobám.
- DNA je použita výlučně na provedení analýzy určení otcovství nebo příbuzenství.
- Provádíme testování pouze s písemným souhlasem testované osoby nebo jejího zákonného zástupce.
- Analyzujeme pouze námi odebrané vzorky, abychom zamezili odběrům bez vědomí testované osoby
- Nikdy neprovádíme analýzy z plodové vody nebo volné fetální DNA z krve matky, aby se zamezilo rozhodování o pokračování těhotenství ovlivněné výsledkem testu.

# Bioquest Diagnostics DNA Center



Volná fetální cfDNA (DNA plodu)

K potvrzení otcovství je nutná shoda v pěti SNP lokusech.

C T A **A** G T A

Version 1

C T A **G** G T A

Version 2

u domělého otce analyzovat kromě krve a slin i další biologické vzorky, například sperma, nehty, zubní kartáček, nedopalek cigarety a podobně.

	Loci	P65/16		P66/16		vzorec	PI*
	D3S1358	17	18	16	18	1/4P <sub>18</sub>	1.610824742
	D8S1179	8	11	8	12	1/4P <sub>8</sub>	21.367521370
	D18S51	16	20	14	16	1/4P <sub>16</sub>	1.629726206
	D21S11	29	32.2	29	31.2	1/4P <sub>29</sub>	1.281394157
	FGA	20	21	20	21	P <sub>20</sub> +P <sub>21</sub> /4P <sub>20</sub> P <sub>21</sub>	3.110059890
	TH01	6	9	6	9	P <sub>6</sub> +P <sub>9</sub> /4P <sub>6</sub> P <sub>9</sub>	2.457368516
CODIS/ESS loci	vWA	18	19	17	18	1/4P <sub>18</sub>	1.092179991
CODIS loci	D16S539	9	13	9	10	1/4P <sub>9</sub>	2.458210423
	D1S1656	12	15.3	15.3	18.3	1/4P <sub>15.3</sub>	4.258943782
	D2S441	11	14	14	14	1/2P <sub>14</sub>	1.982553529
	D2S1338	17	20	17	17	1/2P <sub>17</sub>	2.763957988
	D10S1248	9	15	9	13	1/4P <sub>9</sub>	2500.0000000 000
	D12S391	19	26	17	19	1/4P <sub>19</sub>	2.017756255
	D19S433	13	15	15	16	1/4P <sub>15</sub>	1.453488372
ESS loci	D22S1045	15	15	11	15	1/2P <sub>15</sub>	1.559089492
	SE33	20	26.2	20	23.2	1/4P <sub>20</sub>	4.604051565
Other loci	Amelogenin	X	Y	X	X		
Celkový paternitní index							1811514872.0

\*PI – paternitní index - srovnává pravděpodobnost, že alelu předal dítěti domnělý otec s pravděpodobností u náhodně vybraných nepříbuzných mužů ze stejné etnické skupiny

\*\*CPI – celkový (kombinovaný) paternitní index – vypočte se vynásobením všech PI - udává, kolikrát je pravděpodobnější, že domnělý otec je biologickým otcem dítěte oproti náhodně vybranému muži z populace

	Loci	Společná alela otec/dítě	Aleická frekvence
CODIS/ESS loci	D3S1358	18	0,1552
	D8S1179	8	0,0117
	D18S51	16	0,1534
	D21S11	29	0,1951
	FGA	20;21	0,1436;0,1826
	TH01	6;9	0,2250;0,1857
	vWA	18	0,2289
CODIS loci	D16S539	9	0,1017
ESS loci	D1S1656*	15.3	0,0587
	D2S441*	14	0,2522
	D2S1338	17	0,1809
	D10S1248*	9	0,0001
	D12S391*	19	0,1239
	D19S433	15	0,172
	D22S1045*	15	0,3207
Other loci	SE33*	20	0,0543
	Amelogenin	X	

\*\* populační frekvence jednotlivých alel, jejich procentuální zastoupení v populaci  
Loci označené \* - populační frekvence alel „nových lokusů“ v europoidní populaci USA  
Loci bez označení – populační frekvence alel v české europoidní populaci

	Loci	P55/16		P56/16		vzorec	PI*
	D3S1358	17	17	15	16		0
	D8S1179	13	13	11	13	1/2P <sub>13</sub>	1,52532031726
	D18S51	14	14	14	16	1/2P <sub>14</sub>	3,30469266358
	D21S11	28	29	29	33.2	1/4P <sub>29</sub>	1,28139415684
	FGA	23	24	22	27		0
	TH01	8	9	6	7		0
CODIS/ESS loci	vWA	17	18	14	17	1/4P <sub>17</sub>	0,92833271444
CODIS loci	D16S539	11	12	9	12	1/4P <sub>12</sub>	0,78222778473
	D1S1656	11	17.3	17.3	18.3	1/4P <sub>17.3</sub>	1,93348801237
	D2S441	14	14	14	15	1/2P <sub>14</sub>	1,98255352894
	D2S1338	17	17	17	19	1/2P <sub>17</sub>	2,76395798783
	D10S1248	12	15	14	16		0
	D12S391	22	23	17	23	1/4P <sub>23</sub>	3,70919881305
	D19S433	13	13	13	14	1/2P <sub>13</sub>	2,01450443190
ESS loci	D22S1045	11	15	15	16	1/4P <sub>15</sub>	0,77954474586
	SE33	27.2	34	19	29.2		0
Other loci	Amelogenin	X	Y	X	Y		
Celkový paternitní index							0

\*PI – paternitní index - srovnává pravděpodobnost, že alelu předal dítěti domnělý otec s pravděpodobností u náhodně vybraných nepříbuzných mužů ze stejné etnické skupiny

\*\*CPI – celkový (kombinovaný) paternitní index – vypočte se vynásobením všech PI - udává, kolikrát je pravděpodobnější, že domnělý otec je biologickým otcem dítěte oproti náhodně vybranému muži z populace

	Loci	Společná alela otec/dítě	Alelická frekvence
CODIS/ESS loci	D3S1358		
	D8S1179	13	0,3278
	D18S51	14	0,1513
	D21S11	29	0,1951
	FGA		
	TH01		
	vWA	17	0,2693
CODIS loci	D16S539	12	0,3196
ESS loci	D1S1656*	17.3	0,1293
	D2S441*	14	0,2522
	D2S1338	17	0,1809
	D10S1248*		
	D12S391*	23	0,0674
	D19S433	13	0,2482
	D22S1045*	15	0,3207
Other loci	SE33*		
	Amelogenin	Y	

\*\* populační frekvence jednotlivých alel, jejich procentuální zastoupení v populaci  
Loci označené \* - populační frekvence alel „nových lokusů“ v europoidní populaci USA  
Loci bez označení – populační frekvence alel v české europoidní populaci

## Neshodné alely

	Loci	Společná alela otec P40/dítěP41	Alelická frekvence **
CODIS/ESS loci	D3S1358	17	0,2197
	D8S1179	13	0,3278
	D18S51	16 (-1)	0,1534
	D21S11	30	0,2274
	FGA	24	0,1411
	TH01	6	0,2250
	vWA	17	0,2693
CODIS loci	D16S539	13(+1)	0,2052
ESS loci	D1S1656*	14	0,0783
	D2S441*	11	0,3337
	D2S1338	20	0,1294
	D10S1248*	13;14	0,2913;0,3076
	D12S391*	20	0,1109
	D19S433	14;14.2	0,3617;0,023
	D22S1045*	15	0,1720
Other loci	SE33*	17	0,0620
	Amelogenin	Y	

Frekvence mutací STR lokusů

D18S51  $\mu = 0,0022$

D16S539  $\mu = 0,0011$

	Loci	P40/16		P41/16		vzorec	PI*
CODIS/ESS loci	D3S1358	17	17	16	17	$1/2P_{17}$	2,3288309
	D8S1179	13	13	10	13	$1/2P_{13}$	1,5253203
	D18S51	12	15	16	17	$\mu/4p_{16}$	0,0035854
	D21S11	30	30	30	30.2	$1/2P_{30}$	2,1987687
	FGA	22	24	24	24	$1/2P_{24}$	3,5435861
	TH01	6	7	6	7.3	$1/4P_6$	1,1111111
	vWA	17	17	17	18	$1/2P_{17}$	1,8566654
CODIS loci	D16S539	9	14	11	13	$\mu/4p_{13}$	0,0013567
ESS loci	D1S1656	14	18.3	14	16.3	$1/4P_{14}$	3,1928480
	D2S441	11	11	11	11	$1/P_{11}$	2,9967036
	D2S1338	19	20	18	20	$1/4P_{20}$	1,9319938
	D10S124 8	13	14	13	14	$P_{13}+P_{14}/4P_{13}P_{14}$	1,6709656
	D12S391	17	20	20	20	$1/2P_{20}$	4,5085663
	D19S433	14	14.2	14	14.2	$P_{14}+P_{14.2}/4P_{14}P_{14.2}$	11,560745 8
	D22S104 5	11	15	15	16	$1/4P_{15}$	1,4534884
Other loci	SE33	17	25.2	17	17	$1/2P_{17}$	8,0645161
	Ameloge nin	X	Y	X	Y		
Celkový paternitní index							5,2413550 649



## Určení příbuzenského vztahu – poloviční („nevlastní“) sourozenci

	Loci	P1/14		P2/14		LR*
CODIS/ESS loci	D3S1358	15	16	16	17	1,01503914
	D8S1179	13	15	12	15	1,71241513
	D18551	14	15	13,2	15	1,24096028
	D21S11	27	28	28	31,2	1,25987842
	FGA	19	22,2	22,2	25,2	10,8305785
	TH01	6	9	7	10	0,5
	vWA	17	17	17	18	1,42833271
CODIS loci	D16S539	11	13	11	13	1,56603314
ESS loci	D1S1656	15	17	15,3	17	2,51612903
	D2S441	14	15	14	14	1,49127676
	D2S1338	19	23	20	25	0,5
	D10S1248	14	14	14	14	2,12548765
	D12S391	15	17	15	17	9,68390805
	D19S433	11	14	11	15	36,2142857
	D22S1045	13	15	15	16	0,88977
Other loci	SE33	18,3	18,3	18,3	22,2	227,772727
	Amelogenin	X	Y	X	X	1
Celkový věrohodnostní poměr						9329538,51

P* apriorní (%)	1	5	10	25	50	75
P* aposteriorní (%)	99,998938865525	99,999796346183	99,999903532230	99,999967844408	99,999989281357	99,999996427110