



Testování lidské identity

Brno, 2009

J.M. Butler – Forensic DNA Typing workshop, 2006

Bryan Sykes – Sedm dcer Eviných, 2005

Využití testování lidské identity

- 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



DNA testování vyžaduje referenční vzorek

- Samotný DNA profil nemá žádnou hodnotu, neboť nenesení žádnou informaci o nositeli
- DNA analýza identity pracuje jen jeli porovnávána s jinou – tzn. že je nutný referenční vzorek

Např.:

- vzorky z místa činu X vzorky podezřelých z trestného činu (forensní analýza)
- Dítě X domnělý otec (paternitní analýza)
- Tělesné pozůstatky oběti neštěstí X biologický příbuzný (test identity)

Základy DNA profilování

- Genom každého člověka je unikátní (s výjimkou jednovaječných dvojčat) a je děděn od obou rodičů
- DNA typizace musí být provedena účelně a reprodukovatelně (soudní řízení)
- Standardní DNA testování nehledá informace v genech (nepřináší informace o rase, predispozicích k nemocem nebo informace o fenotypu nositele : barva očí a vlasů, výška postavy ...)
- Genetická variace testovaných úseků DNA musí být schopna odlišit jedince navzájem (statistická pravděpodobnost náhodného výběru)

CODIS loci

Combined DNA Index System.

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 namísto 13ti oblastí DNA. Proto genetické testy poskytují ještě vyšší míru spolehlivosti, než aktuální dohodnutý srovnávací standard.

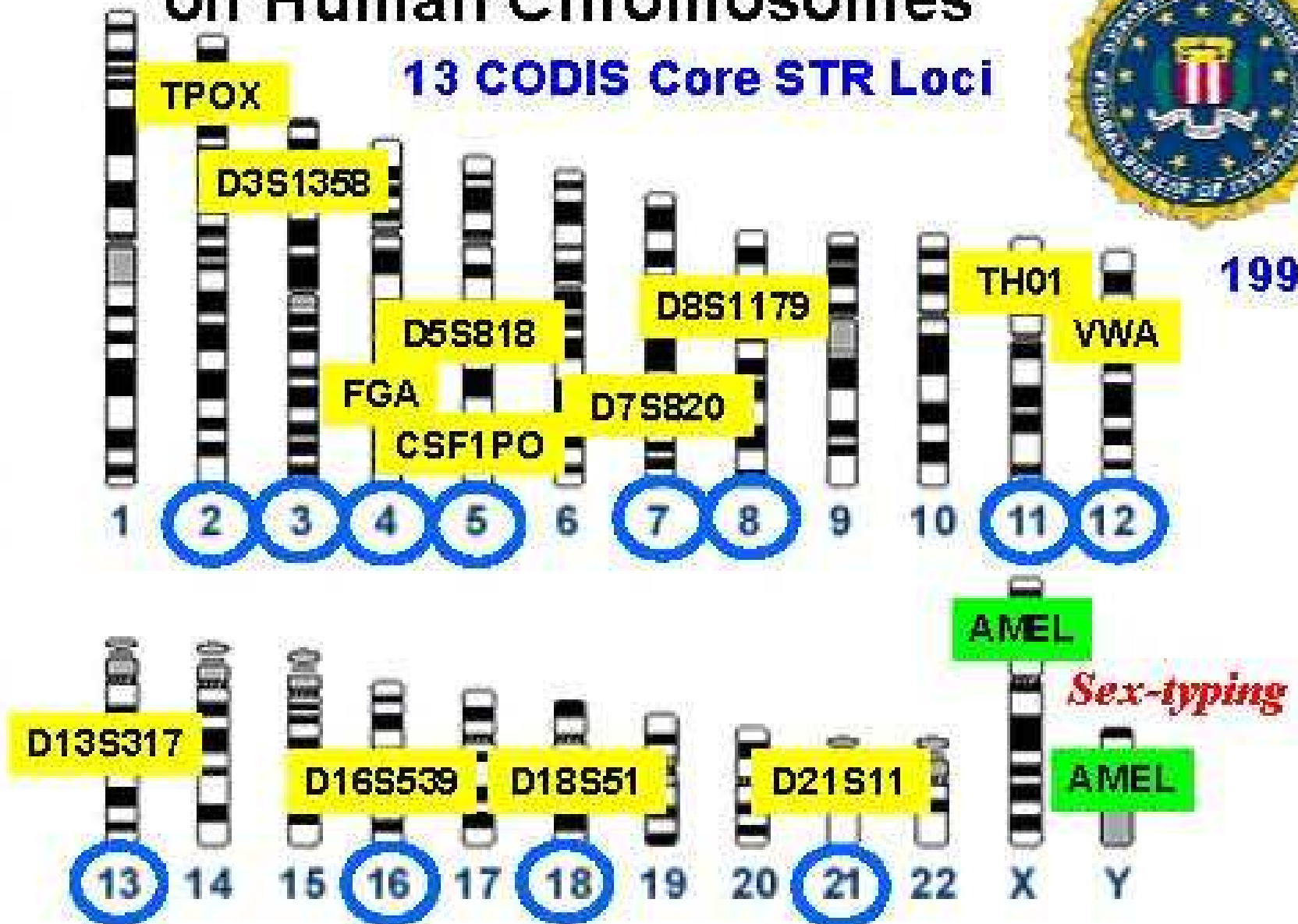
Position of Forensic STR Markers on Human Chromosomes



1997

13 CODIS Core STR Loci

Core STR Loci for the United States



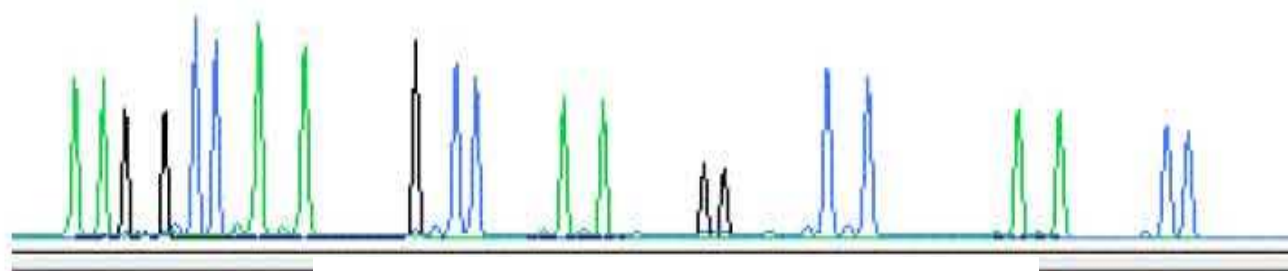
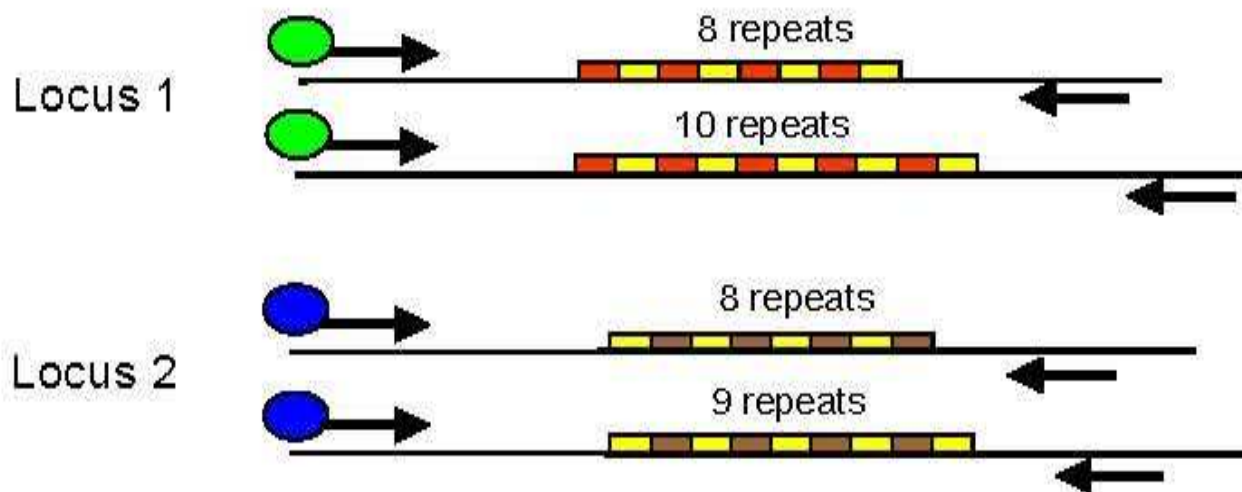
Sex-typing

CODIS: Combined DNA Index System: 13 STR + AMEL (pohlaví)

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

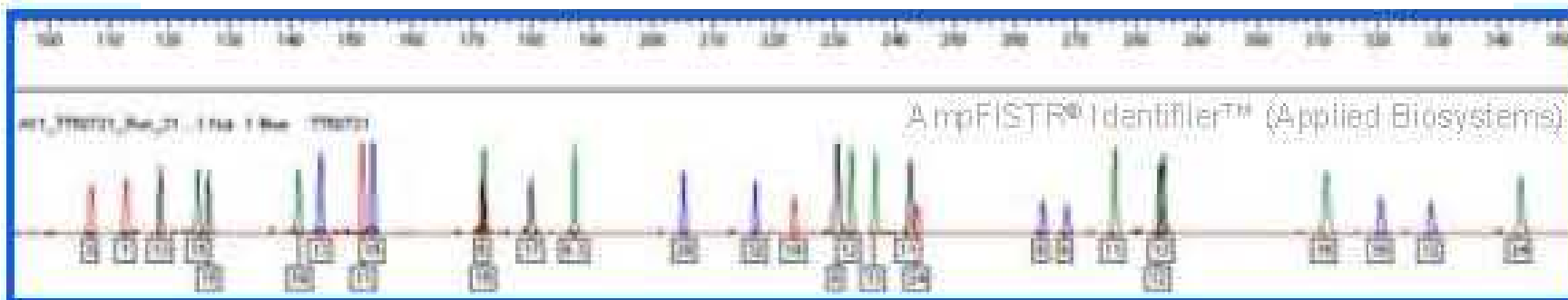


Scanned Gel Image

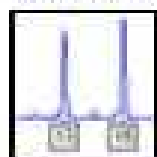


Kapilární elektroforetogram

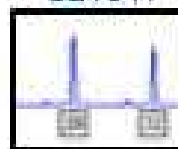
Multiplex PCR



D8S1179



D21S11



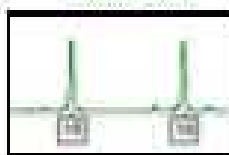
D7S820



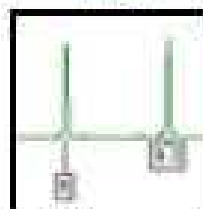
CSF1PO



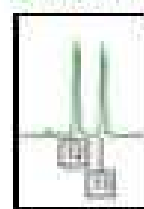
D3S1358



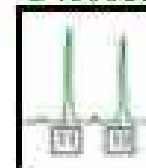
TH01



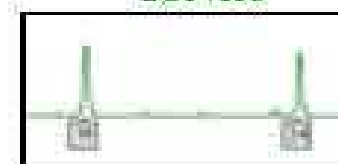
D13S317



D16S539



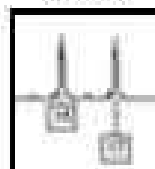
D2S1338



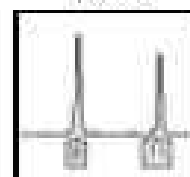
D19S433



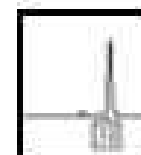
VWA



TPOX



D18S51



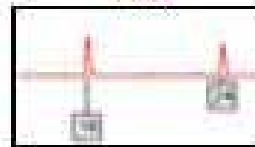
AMEL



D5S818



FGA



**16 jednotlivých
analýz**

Paternitní analýza

- Testování lidské identity na základě zjišťování genetických znaků (např. pro účely určování otcovství) s sebou přináší řadu etických faktorů souvisejících se spolehlivostí výsledků a zajištěním ochrany osobních údajů
 - nepřijímat typy vzorků, u kterých lze předpokládat, že byly odebrány bez vědomí dané osoby
 - u dospělých osob provádět testování pouze s jejich souhlasem
 - nezávisle testovat 2 vzorky odebrané od každé osoby
 - testovat 16 STR markerů (nikoli pouze 9 nebo 11)

Princip DNA testu otcovství

- Analýza DNA je dnes standardní metodou
 - Odběr krve stěr sliznice dutiny ústní
 - Izolace DNA
 - Multiplex PCR (CODIS STR lokusy)
 - Stanovení DNA profilu
 - Porovnání genetického profilu dítěte a domnělého otce
 - Interpretace výsledku popř. statistické výpočty pravděpodobnosti otcovství

Steps Involved

Collection

Specimen Storage

Extraction

Quantitation

Multiplex PCR

STR Typing

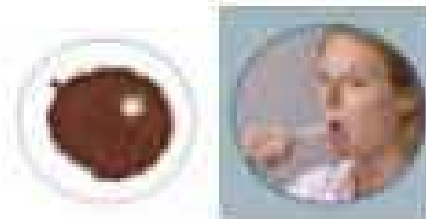
Interpretation
of Results

Database
Storage & Searching

Calculation of
Match Probability

Steps in DNA Analysis

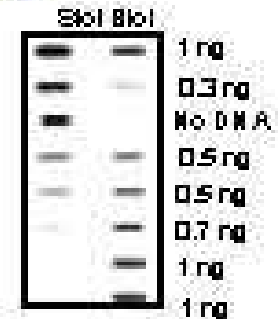
Usually 1-2 day process (a minimum of ~5 hours)



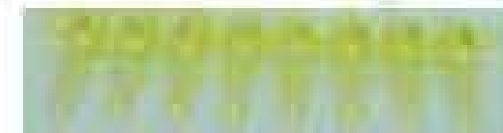
Blood Stain Buccal swab
Sample Collection
& Storage



DNA
Extraction

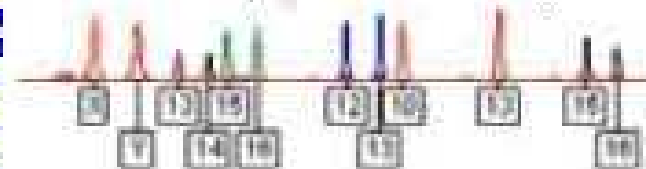


DNA
Quantitation



Multiplex PCR Amplification

DNA separation and sizing



STR Typing

Male: 13,14 15,16-12,13-10,13-15,16

Interpretation of Results

Genetics

If a match occurs, comparison of DNA profile to population allele frequencies to generate a case report with probability of a random match to an unrelated individual



DNA
Database
Search

Technology

Typical Instruments Used for STR Typing

Thermal Cycler for
PCR Amplification

GeneAmp 9700



Capillary electrophoresis instruments for separating and sizing PCR products

single capillary

ABI 310



16-capillary array

ABI 3100



Vyloučení otcovství

- při srovnání DNA profilů :
u dítěte nalezena kombinace markerů, kterou domnělý otec nemá, lze se 100% jistotou otcovství vyloučit

| Lokus | domnělý otec | dítě | Paternitní index |
|----------|--------------|----------|------------------|
| D2S1338 | 12, 13 | 8, 9 | 0.00 |
| D2S1358 | 8, 11 | 13, 14 | 0.00 |
| D8S1179 | 21.2, 32 | 19, 21.2 | 0.675 |
| D10S1008 | 7, 12 | 15, 18 | 0.00 |
| D14S1537 | 9, 14 | 11, 14 | 0.797 |
| D19S433 | 15, 18 | 12, 15 | 1.338 |

Potvrzení otcovství

- Pokud profily dítěte a domnělého rodiče vykazují shodu, lze otcovství potvrdit s jistotou, která je velmi blízká 100%.

| Lokus | Domnělý otec | dítě | Paternitní index |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| D2S1338 | 12, 13 | 10, 12 | 1.845 |
| D2S1358 | 8, 11 | 11 , 14 | 2.714 |
| D8S1179 | 21.2, 32 | 19, 21.2 | 3.675 |
| D19S433 | 15, 18 | 12, 15 | 8.338 |
| Celkový paternitní index (CPI): | | | 153.435 |
| Pravděpodobnost otcovství: | | | 99.348% |

Význam DNA biologické matky v paternitní analýze

- Paternitní analýza: srovnání DNA profilů otce a dítěte: **pravděpodobnost otcovství je 98.2896%**

| lokus | Biologická matka (netestována) | Domnělý otec | Dítě | Paternitní index |
|---------|--------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| D2S1338 | -- | 12, 13 | 10, 12 | 1.845 |
| D2S1358 | -- | 8, 11 | 11, 14 | 2.714 |
| D8S1179 | -- | 21.2, 32 | 19, 21.2 | 2.675 |
| D19S433 | -- | 15, 18 | 12, 15 | 7.338 |

Tatáž paternitní analýza: srovnání DNA profilů otce, dítěte
a biologické matky:

pravděpodobnost otcovství je **99.9541%**.

| Lokus | Biologická matka (Matka A) | Domnělý otec | dítě | Paternitní index |
|---------|-------------------------------|--------------|------------------|------------------|
| D2S1338 | 8, 10 | 12, 13 | 10 , 12 | 3.489 |
| D2S1358 | 14 , 17 | 8, 11 | 11, 14 | 5.114 |
| D8S1179 | 15, 19 | 21.2, 32 | 19 , 21.2 | 3.619 |
| D19S433 | 8, 12 | 15, 18 | 12 , 15 | 15.309 |

paternitní analýza: srovnání DNA profilů otce, dítěte a biologické matky B:

pravděpodobnost otcovství je 0%.

| Lokus | Biologická Matka (Matka B) | Domnělý otec | dítě | Paternitní index |
|---------|----------------------------|--------------|----------|------------------|
| D2S1338 | 8, 12 | 12, 13 | 10, 12 | 0.000 |
| D2S1358 | 14, 17 | 8, 11 | 11, 14 | 5.389 |
| D8S1179 | 21, 21.2 | 21.2, 32 | 19, 21.2 | 0.000 |
| D19S433 | 12, 15 | 15, 18 | 12, 15 | 0.786 |

Výpočet pravděpodobnosti otcovství

- V pravděpodobnostním výpočtu (*podle Bayesova teorému*) se bere u každého testovaného polymorfismu do úvahy frekvence alely ,která je společná otci a dítěti
- Pokud společná alela je v dané populaci hodně frekventní, pak je vyšší pravděpodobnost, že dítě i domnělý otec mají tutéž alelu náhodně

Genetická genealogie



Poodhalení pravdy o našem původu

Česká kotlina byla osídlena již před necelými dvěma miliony let. Za tu dobu až do dnešních dnů se na našem území vystřídalo mnoho různých kultur, etnik a národů.

K historicky nejznámějším patří Keltové, Germáni a samozřejmě Slované

Hlavní přínos genetické genealogie

- Informace o svém původu si nosí každý člověk ve své genetické výbavě - DNA
 - díky molekulární genetice je dnes možné v těchto genetických "záznamech" hledat a číst. Do minulosti tak lze nahlédnout hlouběji než prostřednictvím matrik, soupisů obyvatelstva, církevních záznamů nebo jiných historických pramenů.
- Zápisy v naší DNA hovoří jasně i po několika tisících let.

Jak pracuje genetická genealogie

- v genetické informaci - DNA - každého člověka jsou části, které se mění jen velmi vzácně a po mnoho generací zůstávají neměnné
 - *tuto téměř neměnnou část DNA, kterou nosíme všichni ve své genetické informaci, nosil již náš pra, pra, pra, prapředek.*
- V rámci DNA savců a tedy i člověka existují části, které se dědí pouze
 - v otcovské linii - Y chromozomální DNA, lze odhalit původ a historii otcovské linie každého člověka
 - v mateřské linii - DNA mitochondriální, nese záznamy o původu a historii předků v mateřské linii

Y chromozomální DNA

- různé typy populací nosí v Y-DNA sady znaků, které jsou charakteristické právě pro ně, (*např. germánské obývající Skandinávii, jihoslovanské obývající oblast okolo Jaderského moře*)
- porovnáním těchto charakteristických znaků lze zjistit, jakého jsou daný člověk nebo skupina lidí geograficky - genetického původu
- Y-chromozomální DNA však mají pouze muži, u žen se nenachází, a tak ze vzorků ženské DNA nelze původ jejich Y otcovské linie vyčíst



Mitochondriální DNA

- mitochondriální DNA nese informace starší než jakýkoliv psaný záznam vytvořený člověkem.
- každý člověk dědí svou mtDNA po matce, nikdy od otce
- veškeré mateřské linie se někde v minulosti navzájem spojují. Lidé, kteří nesou ve své mtDNA stejné údaje o stejném spojení své mateřské linie, lze zařadit do skupin, z nichž každá má svou dávnou „pramatku“, která dala vznik všem mateřským liniím lidí v příslušné skupině.

Sedm dcer Evinných

Seven daughters of Eve

- - označení pro sedm pramatek nejčastějších evropských mateřských klanů.

Označení poprvé použil a vymyslel autor populárně vědecké literatury Bryan Sykes: kniha věnující se původu a migracím lidských populací z pohledu mateřských mitochondriálních linií.

- Každá z mitochondriálních haploskupin vychází či začíná u nějaké hypotetické pramatky – ženy u níž se poprvé objevila příslušná variace v mitochondriální DNA.
- V rámci evropské populace je rozlišováno sedm velmi častých a tři méně časté mitochondriální haploskupiny/ klany jejichž pramatky nesou následující označení.
 - **Haploskupina H** – pramatka Helena, **U** – pramatka Uršula (označení Uršula může být také používáno někdy pouze pro matku nejrozšířenějšího evropského klanu U5), **T** – pramatka Tara, **K** – pramatka Kateřina, **J** – pramatka Jasmína, **V** – pramatka Velda a **X** – pramatka Xenie. Méně časté evropské klany jsou klan **Iris**, **W** a **N**.

Haploskupina / typ genetického profilu

- soubor Y chromozomálních nebo mitochondriálních linií, které vycházejí z jednoho společného předka a jsou charakterizovány unikátním genetickým znakem či "stopou", který je zapsán v DNA mužského pohlavního chromozomu nebo v mitochondriální DNA

Mitochondriální Eva

- uvedené pramatky jejichž linie byly doneseny přes tisíce let do současnosti, měly také své předky v mateřské linii.
- Dnes je znám i „rodokmen“ těchto pramatek, jejich mateřské linie směřují k jedné jediné pramatce, která žila přibližně před 150 – 200 tisíci lety v Africe, a je některými autory označována jako „**mitochondriální Eva**“.