

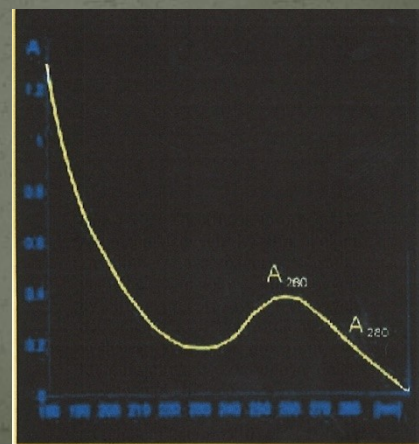
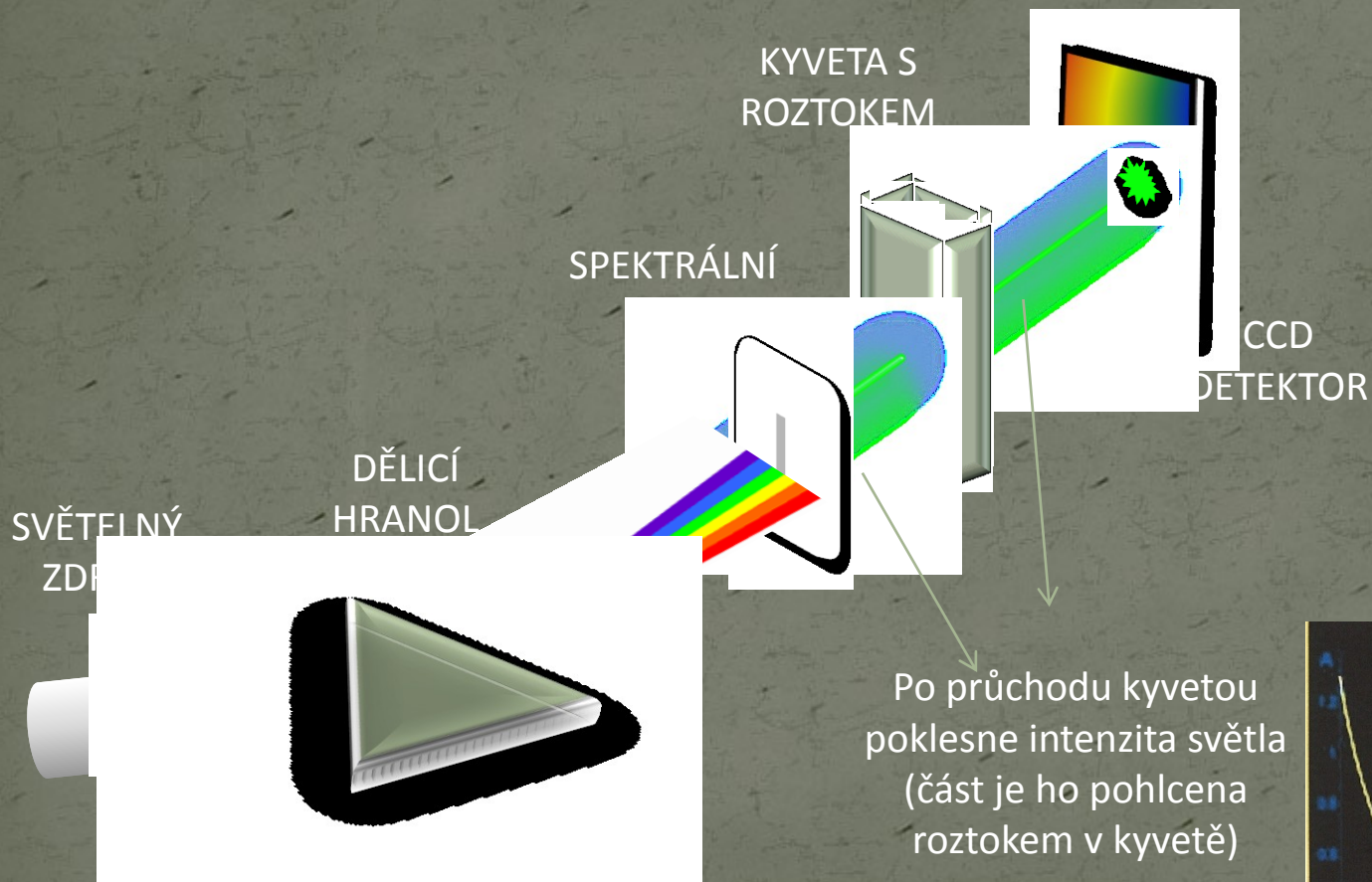
# Kvantifikace a amplifikace DNA

---

# Kvantifikace DNA

- cíl: stanovit množství DNA
- Spektrofotometrická kvantifikace DNA
  - určení množství veškeré DNA ve vzorku bez ohledu na to, z jakého zdroje tato DNA pochází
  - molekuly DNA silně absorbují elektromagnetické záření vlnové délky 260 nm (tj. ultrafialové záření)
  - paprsek o 260 nm se nechá procházet roztokem DNA (např. izolátem) a změří se pokles intenzity záření – tím větší, čím je roztok DNA koncentrovanější

# Spektrofotometrická reakce



# Kvantifikace DNA

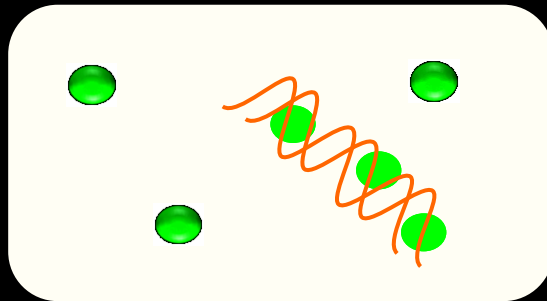
- Cíl: stanovit množství DNA?
- Spektrofotometrická kvantifikace DNA
  - určení množství veškeré DNA ve vzorku bez ohledu na to, z jakého zdroje tato DNA pochází.
  - molekuly DNA silně absorbují elektromagnetické záření vlnové délky 260 nm (tj. ultrafialové záření)
  - paprsek o 260 nm se nechá procházet roztokem DNA (např. izolátem) a změří se pokles intenzity záření – tím větší, čím je roztok DNA koncentrovanější

 NESPECIFICKÁ A PRO FORENZNÍ ÚČELY NEVHODNÁ

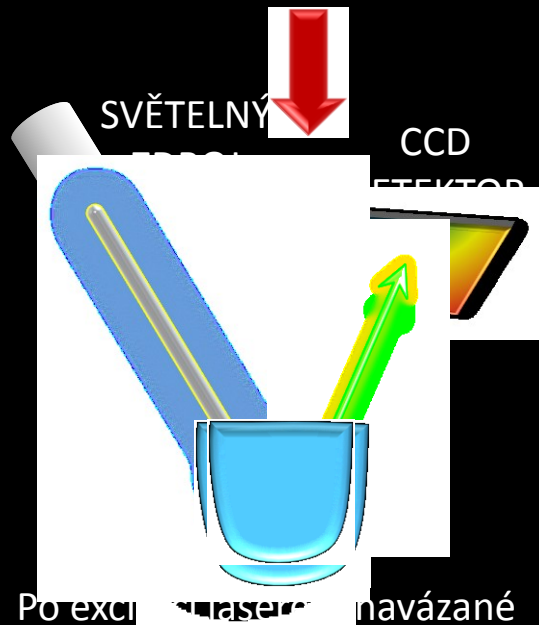
# Detekce nespecificky inkorporovaného fluorescenčního barviva

- chemické sloučeniny - barviva (např. EtBr, PicoGreen, OligoGreen) – vazba na/do DNA - změna jejich prostorového uspořádání; při dopadu světla určité vlnové délky fluorescenčně aktivní – vyzařování světla, jehož množství je měřeno fluorimetrem
- „Množství vyzářeného světla je přímo úměrné množství navázaného barviva, a to je zase přímo úměrné množství DNA přítomné ve vzorku.“

# Detekce nespecificky inkorporovaného fluorescenčního barviva

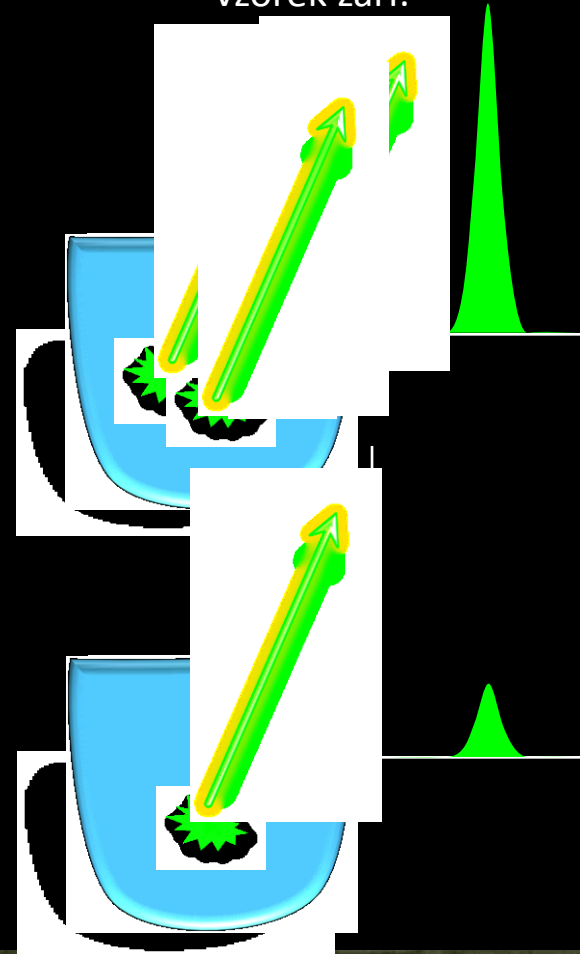


Na/do DNA se naváže fluorescenční barvivo



Po excitaci laserem navázané fluorescenční barvivo září

Čím více je DNA ve vzorku, tím více barviva se naváže a tím více vzorek září:



# Detekce nespecificky inkorporovaného fluorescenčního barviva

- chemické sloučeniny - barviva (např. EtBr, PicoGreen, OligoGreen) – vazba na/do DNA - změna jejich prostorového uspořádání; při dopadu světla určité vlnové délky fluorescenčně aktivní – vyzařování světla, jehož množství je měřeno fluorimetrem
- „Množství vyzářeného světla je přímo úměrné množství navázaného barviva, a to je zase přímo úměrné množství DNA přítomné ve vzorku.“
- relativně vysoká citlivost a přesnost měření, malé nároky na spotřebu vzorku, možnost měření automatizovat, nízká cena analýzy
- nespecifita měření



PRO FORENZNÍ ÚČELY NEVHODNÁ

# ALUQUANT™ HUMAN DNA QUANTITATION SYSTEM

- testovací sondy nasedají na Alu sekvence
- Alu sekvence – specifické pro lidskou DNA a vyšších primátů
- hybridizace sondy - cíl iniciuje sérii enzymů - reakce, které končí oxidací luciferinu a produkcí světla
- intenzita světla se odečítá pomocí luminometru a je úměrná množství DNA přítomnou ve vzorku
- množství DNA ve vzorku se stanoví porovnáním na standardní křivku
- rozsah 0,1 až 50 ng

? VHODNÝ PARAMETR (délka cca 300 bp x degr. DNA, vypočítací hodnota o kvalitě, resp. kvantitě DNA)



# Nedostatečnost předchozích metod

- nepracuji se známým vzorkem x biologie potvrdila přítomnost lidského biol. materiálu (vyjma AluQuant kitu)
- neznám přesnou historii vzniku stopy
- čas vzniku stopy a doba uplynulá před zajištěním
- neznám klimatické podmínky
- nevím kolik osob se mi na vytvoření stopy podílelo
- neznám strukturu podkladu/kontaminace, inhibitory

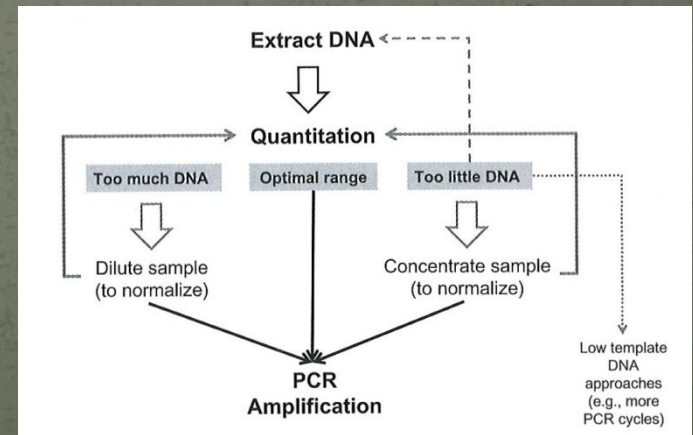
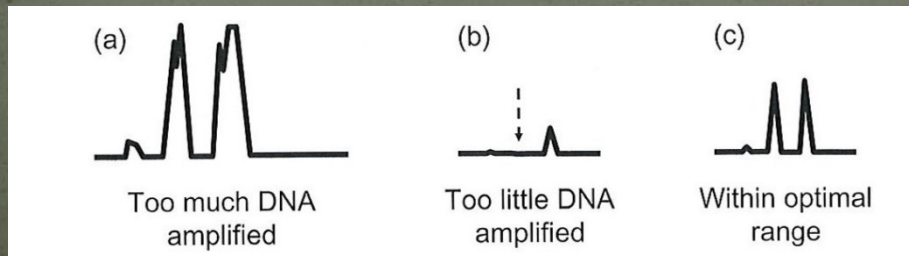
# Kvantifikace (a případná charakterizace) DNA

Kvantifikace – stanovení množství DNA ve vzorku, resp. určit množství "amplifikovatelné" DNA

- důležité pro vyladění PCR

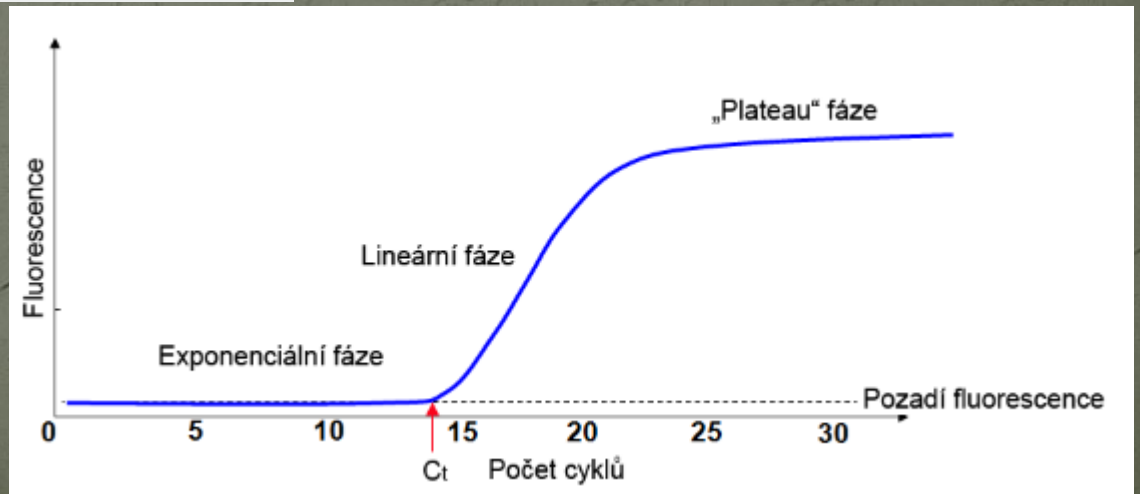
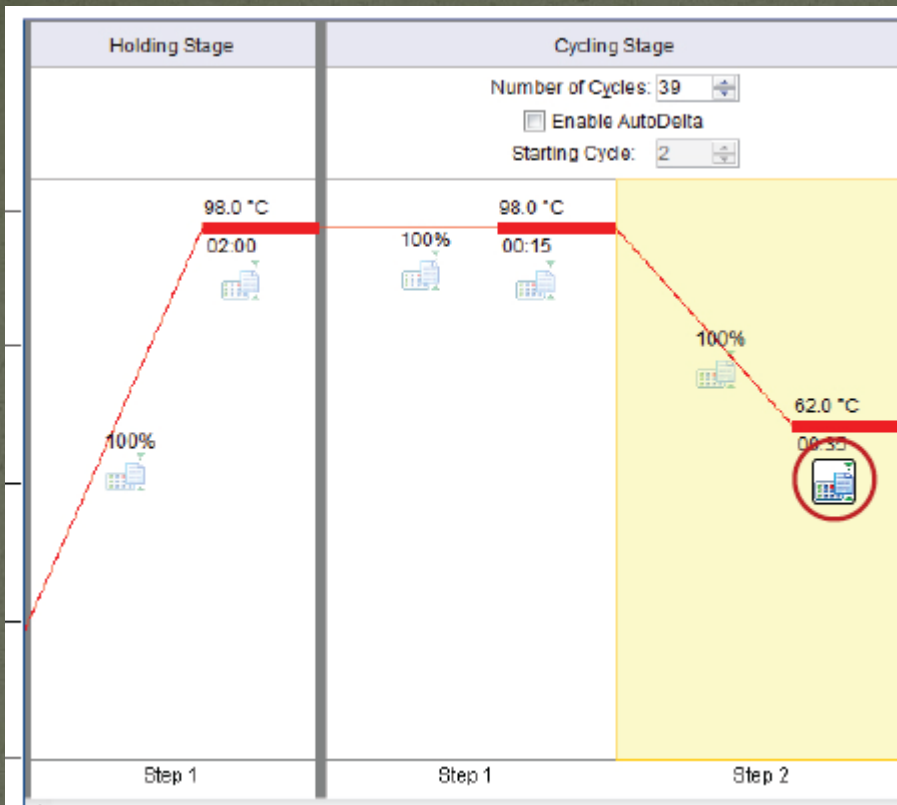
Potřebuji znát více parametrů:

- množství lidské DNA
- poměry XX a XY
- degradaci
- inhibici



# Kvantitativní PCR (qPCR) = real time PCR

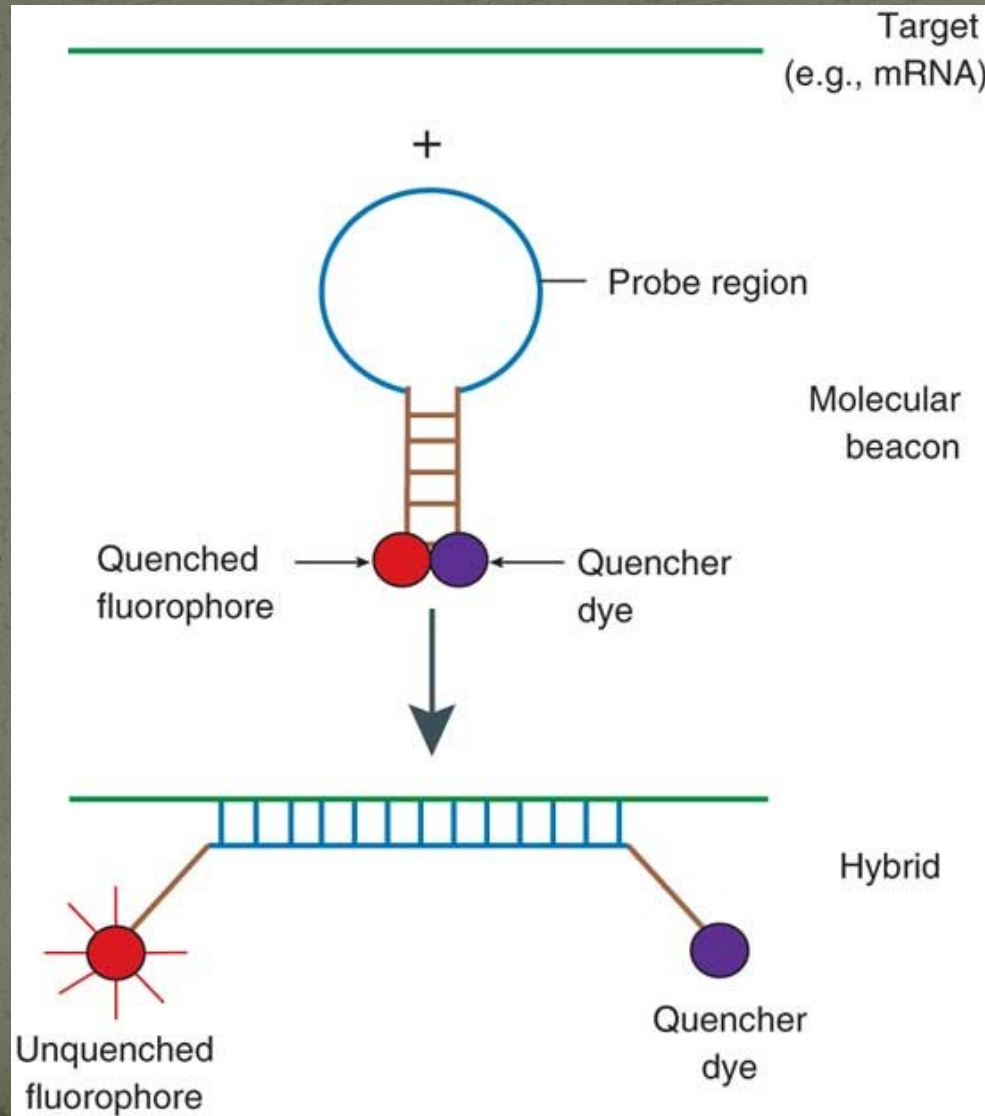
- PCR a současně průběžně měřeno množství PCR produktů
  - podle toho, jakým způsobem během PCR toto množství rostlo, lze zpětně dovodit původní vstupní množství DNA ve vzorku (kalibrace pomocí vzorků známé koncentrace)
- vysoce přesná, vysoce citlivá, přísně specifická (poskytuje pozitivní výsledek prakticky pouze u daného druhu respektive velmi blízce příbuzných druhů)
- detekce případné přítomnosti PCR inhibitorů a rozsah DNA fragmentace
- detekce pomocí SYBR Green
- FRET sondy („fluorescent resonance energy transfer“) – TaqMan, „molecular beacon“ („molekulární maják“)



# Kvantitativní PCR (qPCR) = real time PCR

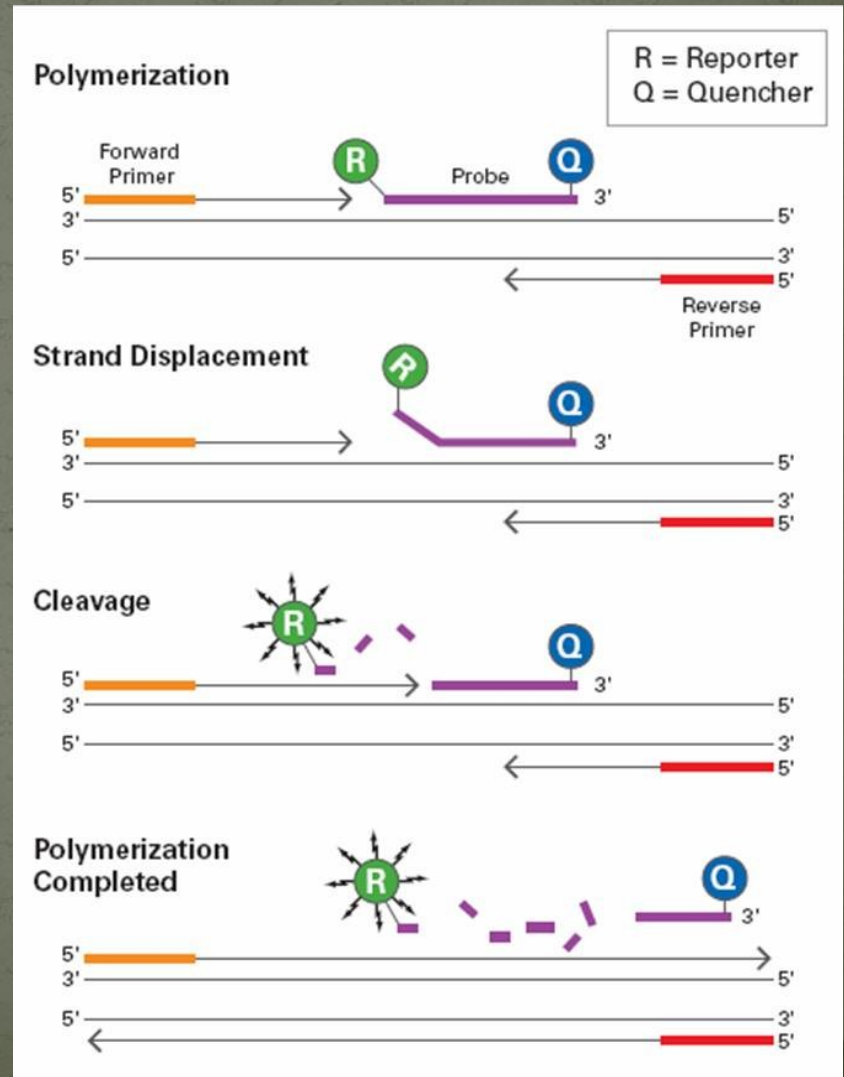
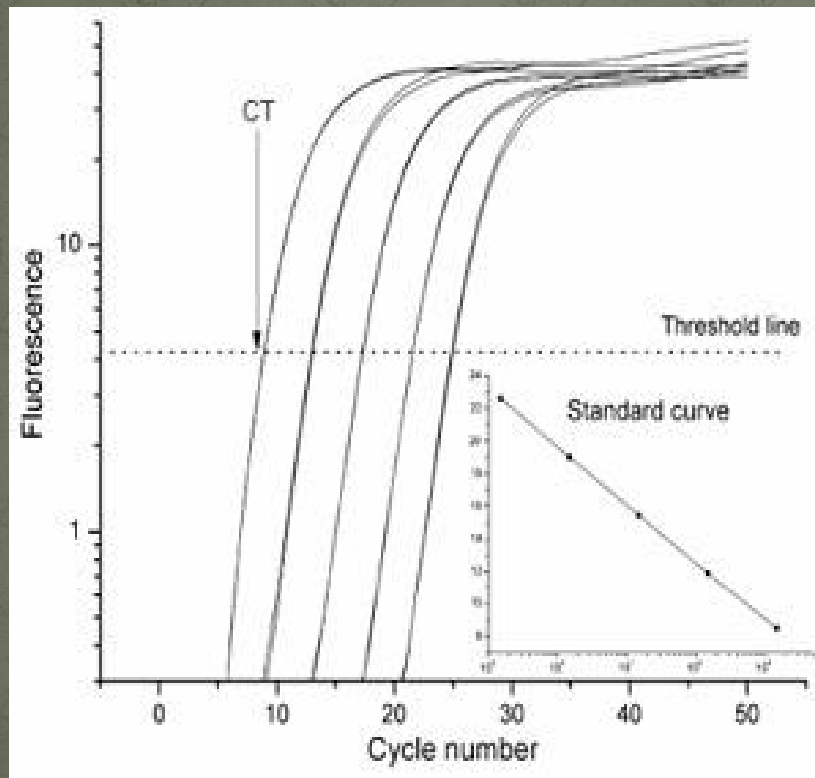
- PCR a současně průběžně měřeno množství PCR produktů
  - podle toho, jakým způsobem během PCR toto množství rostlo, lze zpětně dovodit původní vstupní množství DNA ve vzorku (kalibrace pomocí vzorků známé koncentrace)
- vysoce přesná, vysoce citlivá, přísně specifická (poskytuje pozitivní výsledek prakticky pouze u daného druhu respektive velmi blízce příbuzných druhů)
- detekce případné přítomnosti PCR inhibitorů a rozsah DNA fragmentace
- detekce pomocí SYBR Green
- FRET sondy („fluorescent resonance energy transfer“) – TaqMan, „molecular beacon“ („molekulární maják“)

# Molekulární maják

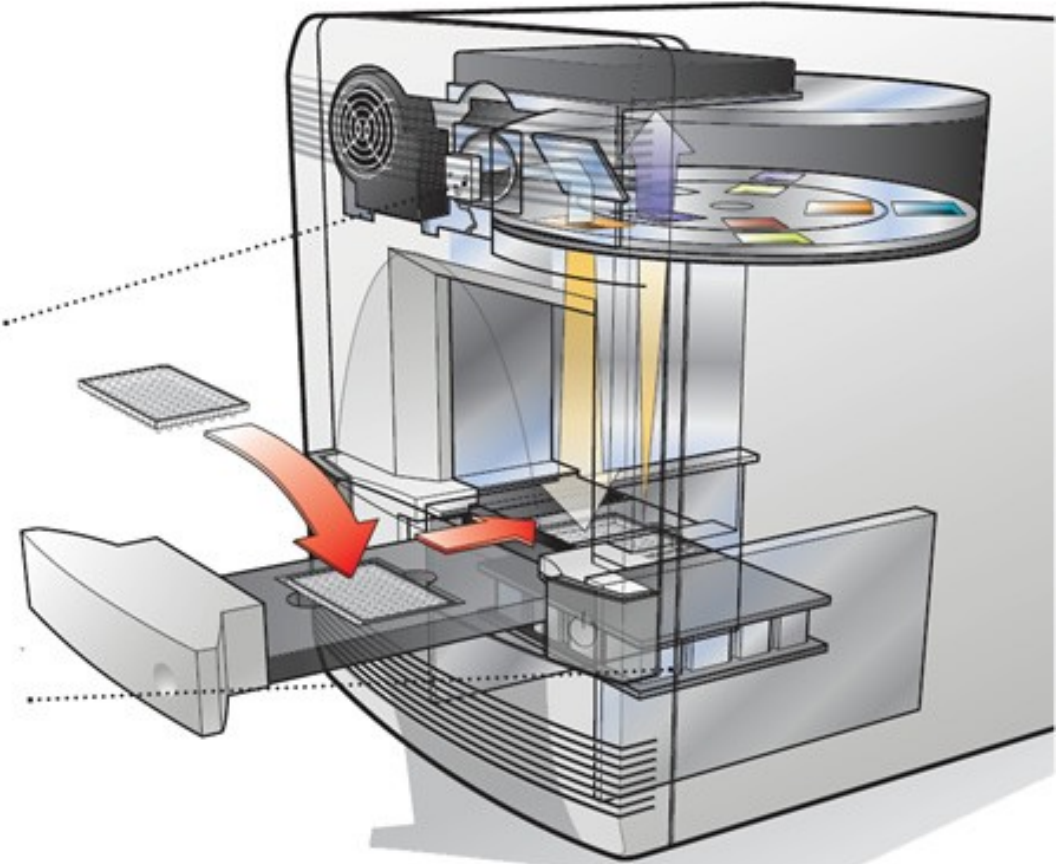
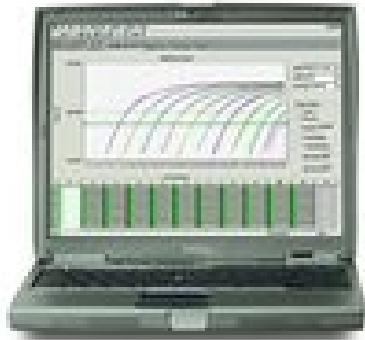


# Specifická kvantifikace - Multiplex RT PCR

- Taq Man sondy



# přístroje

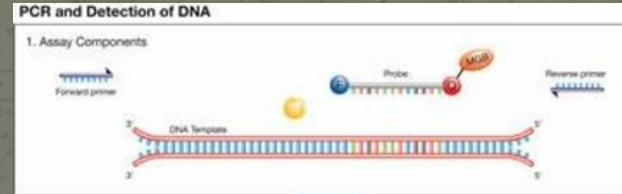


<https://www.youtube.com/watch?v=LgrfCKp6vBo>



# Quantifiler / Q Duo / Q Trio

Q - 1 target o délce 63 bp

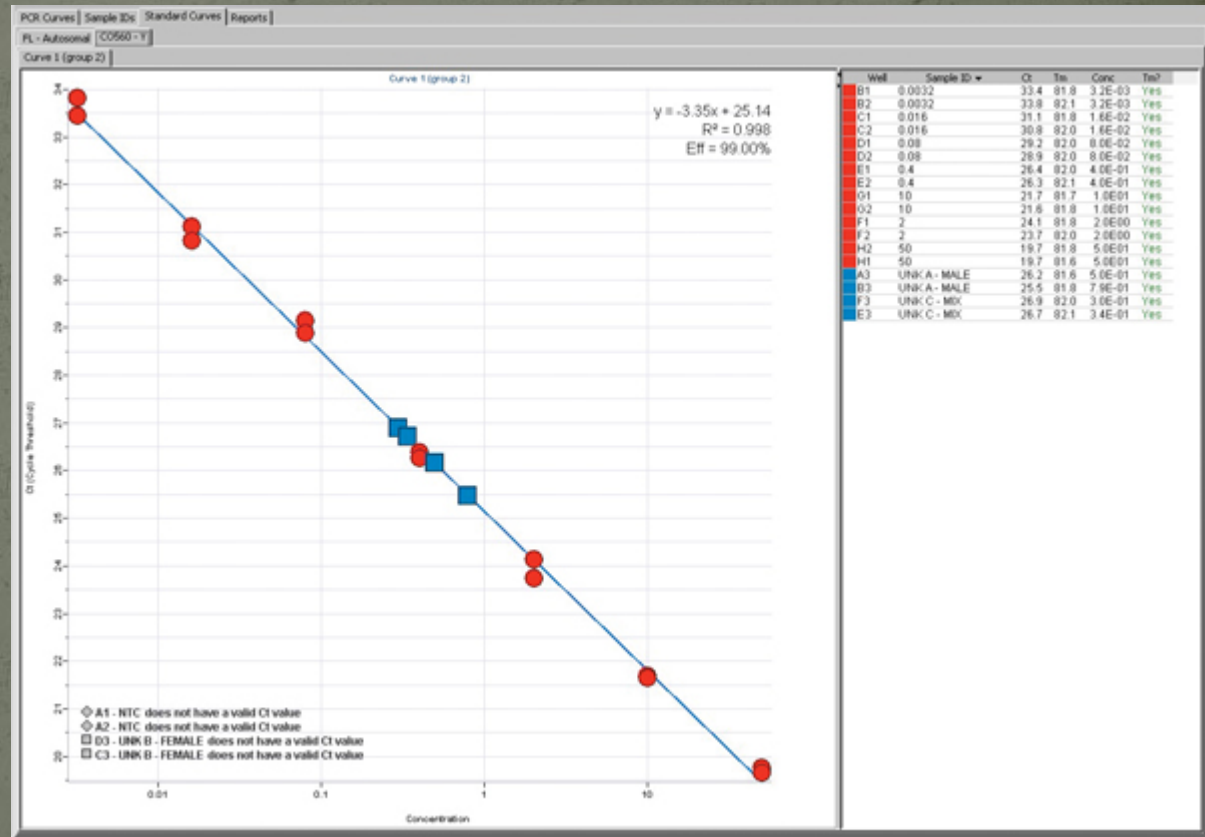
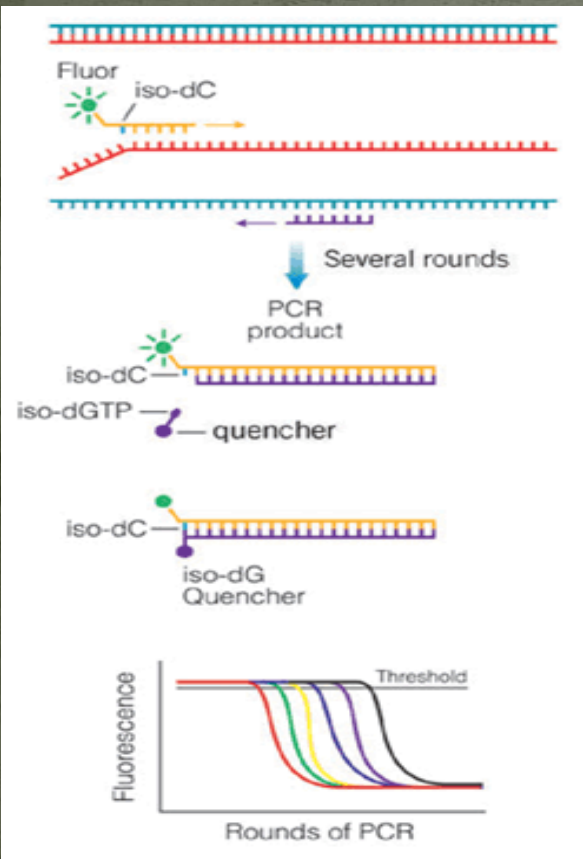


Q Duo -

Target	Gene Target	Location	Amplicon Length	Gene ID	Ploidy
Human Target	Ribonuclease P RNA Component H1 (RPPH1)	14q11.2	140 bases	85495	Diploid

Target	Amplicon length	Ploidy	Copy Number	Dye/Quencher
Human Target, small autosomal	80 bases	Diploid	multicopy	VIC™ dye with MGB quencher
Human Target, large autosomal	214 bases	Diploid	multicopy	ABY™ dye with QSY™ quencher
Human Male Target†	75 bases	Haploid	multicopy	FAM™ dye with MGB quencher
Internal PCR Control	130 bases	NA	Synthetic IPC template is included in the primer mix	JUN™ dye with QSY™ quencher

# Plexor HY



- délka a inhibice
- Y chromozom
- degradace
- IPC: 43

Settings																
IPC Shift Threshold	M/F mixture	Deg Threshold		Autosomal	Degradation	IPC	Y									
0.35	2	2		Autosomal	Degradation	IPC	Y									

Well	Sample Name	Task	[Auto]	[Deg]	[Y]	Auto Cq	IPC Cq	Y Cq	Deg Cq	Closest IPC	IPC Shift	IPC Threshold	[Auto]/[Y]	[Auto]/[Y] Threshold	[Auto]/[D]	[Auto]/[D] Threshold
A1	PQ_50ng/ul	STANDARD	50.0000	50.0000	50.0000	21.03	20.48	20.96	21.12	20.39	0.09	Below	1.00	Below	1.00	Below
A2																
A3																
A4	Unknown 1	UNKNOWN	0.1385	0.1254	0.1190	29.58	20.08	29.79	29.99	20.01	0.07	Below	1.16	Below	1.10	Below
A5	Unknown 1	UNKNOWN	0.1464	0.1275	0.1216	29.49	19.77	29.76	29.96	20.01	-0.24	Below	1.20	Below	1.15	Below
A6	Unknown 1	UNKNOWN	0.1385	0.1254	0.1190	29.58	20.08	29.79	29.99	20.01	0.07	Below	1.16	Below	1.10	Below

PowerQuant Autosomal Normalization Utility					DNA Target Mass (ng)	Min Pipetting Volume (µl)	Max Sample Volume (µl)	Max Dilution Warning (µl)								
					0.5	1	15	200								
LEGEND:					Above Max Dilution Warning	Below Min Volume Warning	Below DNA Target Mass Warning									
					A	*	I									
Well	Sample Name	Sample Concentration (ng/µl)	Sample to Add to Reaction (µl)	Diluent to Add to Reaction (µl)	Diluent to Add per 1 µl Sample (µl)	Max / Min Dilution Warning	Diluted Sample to Add to Reaction (µl)	Filler Diluent to Add to Reaction (µl)	DNA template (ng)	Below DNA Target Mass Warning						
A4	Unknown 1	0.1385	3.6	11.4					0.500							
A5	Unknown 1	0.1464	3.4	11.6					0.500							
Average	Unknown 1	0.1424	3.5	11.5					0.500							
E6	Unknown 10	205.9642			410.9	^	1.0	14.0	0.500							
F6	Unknown 10	218.2691			435.5	^	1.0	14.0	0.500							
Average	Unknown 10	212.1166			423.2	^	1.0	14.0	0.500							
G6	Unknown 11	134.4298			267.9	^	1.0	14.0	0.500							
H6	Unknown 11	136.8869			272.8	^	1.0	14.0	0.500							
Average	Unknown 11	135.6583			270.3	^	1.0	14.0	0.500							
A7	Unknown 12	0.1773	2.8	12.2					0.500							
B7	Unknown 12	0.1985	2.5	12.5					0.500							
C7	Unknown 12	0.2014	2.5	12.5					0.500							
D7	Unknown 12	0.1857	2.7	12.3					0.500							
Average	Unknown 12	0.1907	2.6	12.4					0.500							
E7	Unknown 13	0.0188	15.0	0.0					0.282	!						
F7	Unknown 13	0.0188	15.0	0.0					0.282	!						
G7	Unknown 13	0.0214	15.0	0.0					0.321	!						
H7	Unknown 13	0.0173	15.0	0.0					0.259	!						
Average	Unknown 13	0.0191	15.0	0.0					0.286	!						
A8	Unknown 14	0.0018	15.0	0.0					0.027	!						
B8	Unknown 14	0.0031	15.0	0.0					0.047	!						
C8	Unknown 14	0.0018	15.0	0.0					0.028	!						
D8	Unknown 14	0.0020	15.0	0.0					0.029	!						
Average	Unknown 14	0.0022	15.0	0.0					0.032	!						
A9	Unknown 15	0.1911	2.6	12.4					0.500							
B9	Unknown 15	0.2277	2.2	12.8					0.500							
C9	Unknown 15	0.2056	2.4	12.6					0.500							
D9	Unknown 15	0.1929	2.6	12.4					0.500							
Average	Unknown 15	0.2043	2.4	12.6					0.500							
E9	Unknown 16	0.0272	15.0	0.0					0.408	!						



# Investigator Quantiplex Pro RQO Kit (Qiagen)

- detekce : TaqMan probes - QuantiNova DNA Polymerase
- koncentrace DNA: 200 ng/ $\mu$ l až 0.5 pg/ $\mu$ l, s citlivostí menší než 0.1 pg/ $\mu$ l
- citlivost zachycení mužské DNA ve vzorku s výrazně vyšší koncentrací ženské DNA (400,000 : 1)
- DNA Degradation Control (DC) - detekce degradace jak „male“ DNA tak i „total human“ DNA
- IC (internal control) je citlivější k inhibitorům

# Investigator Quantiplex Pro RGO Kit (Qiagen)

## Targets detected

Target	Amplicon length	Channel	Ploidy	Copy number
Human target, small autosomal	91 bp	Yellow	Diploid	Multi-copy
Human target, large autosomal	353 bp	Red	Diploid	Multi-copy
Human male target, small gonosomal	81 bp	Green	Haploid	Multi-copy
Human male target, large gonosomal	359 bp	Orange	Haploid	Multi-copy
Internal PCR control	434 bp	Crimson	–	Synthetic fragment

# Investigator Quantiplex Pro RGO Kit (Qiagen)

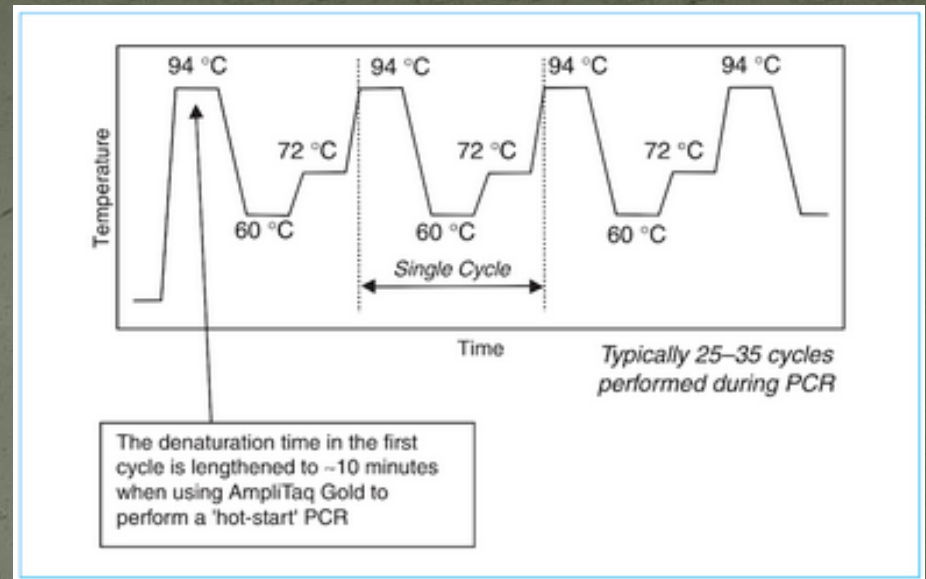
## Soupiska č. 2022\_03\_04B

Tuto soupisku nemůžeš upravovat. Vlastníkem této soupisky je: ib278820

Č.	TYP	IDENTIFIKÁTOR	A[NG/UL]	ŘEDĚNÍ	DNA	VODA	POZICE	Y[NG/UL]	A/Y	DI_A	DI_Y
1	ESS_QS	JA22-00332-FU02	0,1298		7.5	7.5	A1	0,1407	0,92	1,83	1,52
2	ESS_QS	JA22-00332-FU05	0,1627		5	10	B1	0,1965	0,83	1,46	1,57
3	ESS_QS	JA22-00396-FU01	0,2020		2.5	12.5	C1	0,1953	1,03	1,90	1,81
4	ESS_QS	JA22-00440-FU01	0,0099		15	0	D1	0,0088	1,13	2,83	2,48
5	ESS_QS	JA22-00339-FU01	0,0604		10	5	E1	0,0491	1,23	6,04	5,03
6	ESS_QS	JA22-00288-FU01	0,0151		15	0	F1	0,0138	1,09	1,92	1,47
7	ESS_QS	JA22-00288-FU03	0,0161		15	0	G1	0,0166	0,97	3,67	2,27
8	ESS_QS	JA22-00429-FU01	0,3005		2.5	12.5	H1	0,3061	0,98	1,67	1,70
9	ESS_QS	JA22-00429-FU02	0,1416		5	10	A2	0,1456	0,97	1,68	1,80
10	ESS_QS	JA22-00429-FU03	0,0385		15	0	B2	0,0379	1,02	2,32	1,69
11	ESS_QS	JA22-00407-FU04	0,0250		15	0	C2	0,0240	1,04	2,49	2,25
12	ESS_QS	JA22-00407-FU05	0,0457		15	0	D2	0,0422	1,08	2,85	2,34
13	ESS_QS	JA22-00407-FU06	0,0162		15	0	E2	0,0159	1,02	3,26	2,14

# PCR

- Polymerázová řetězová reakce
- Princip obou metod/kroků stejný



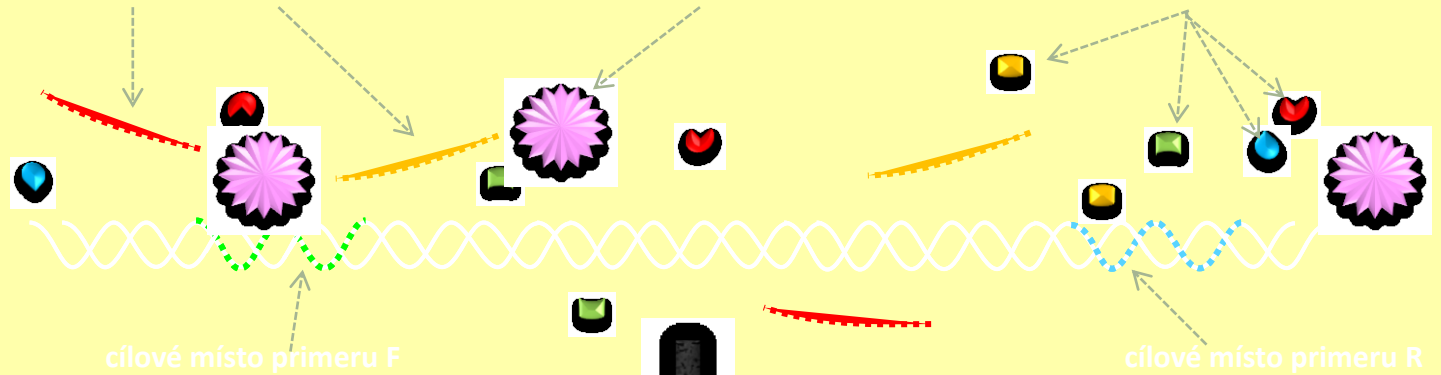
- **Denaturace** - DNA se po dobu 20–30 sekund zahřívá na teplotu 94–98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
- **Nasednutí primerů** – teplota se sníží na 50–65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA–primer se váže DNA polymeráza.
- **Syntéza DNA** - teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity na 75–80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.

hlavní komponenty PCR směsi

primerový pár  
F R

enzym polymeráza

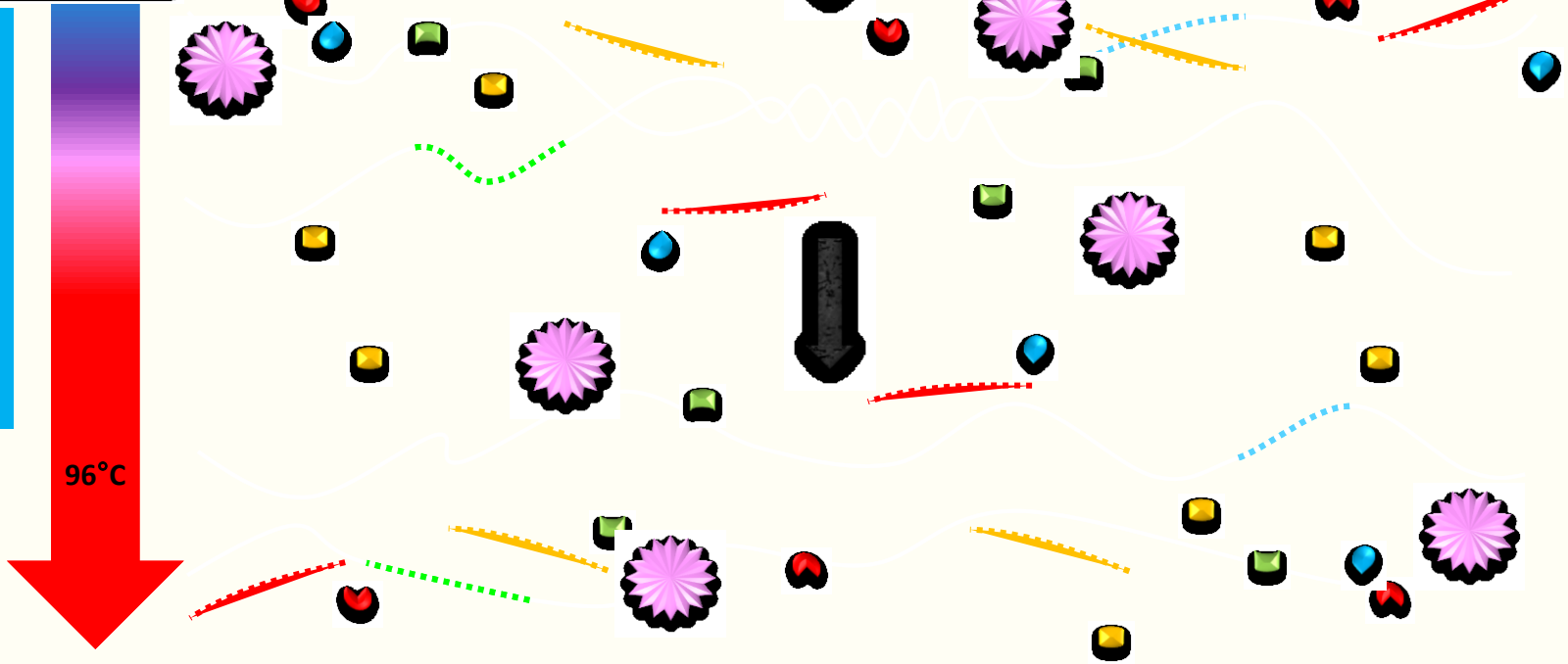
volné nukleotidy



start PCR

fáze denaturace

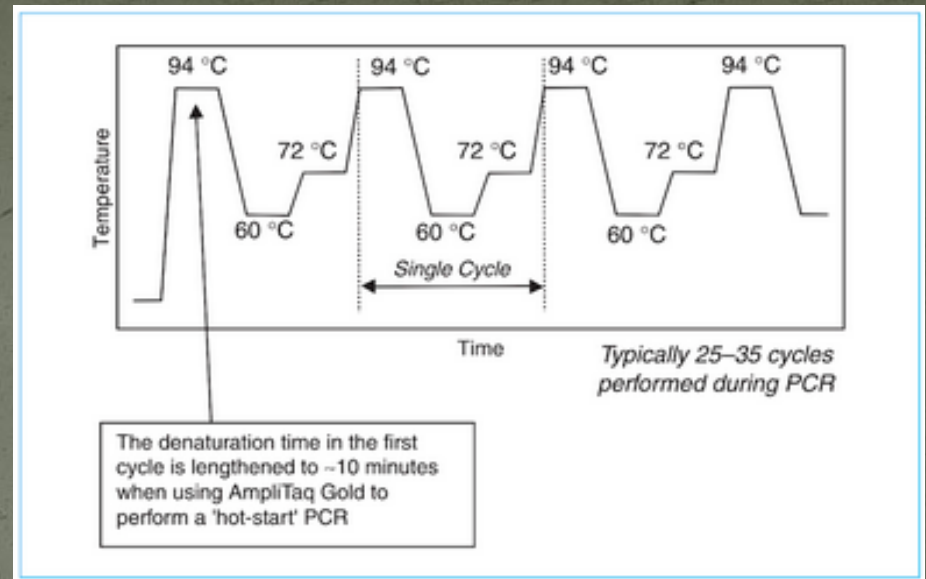
96°C



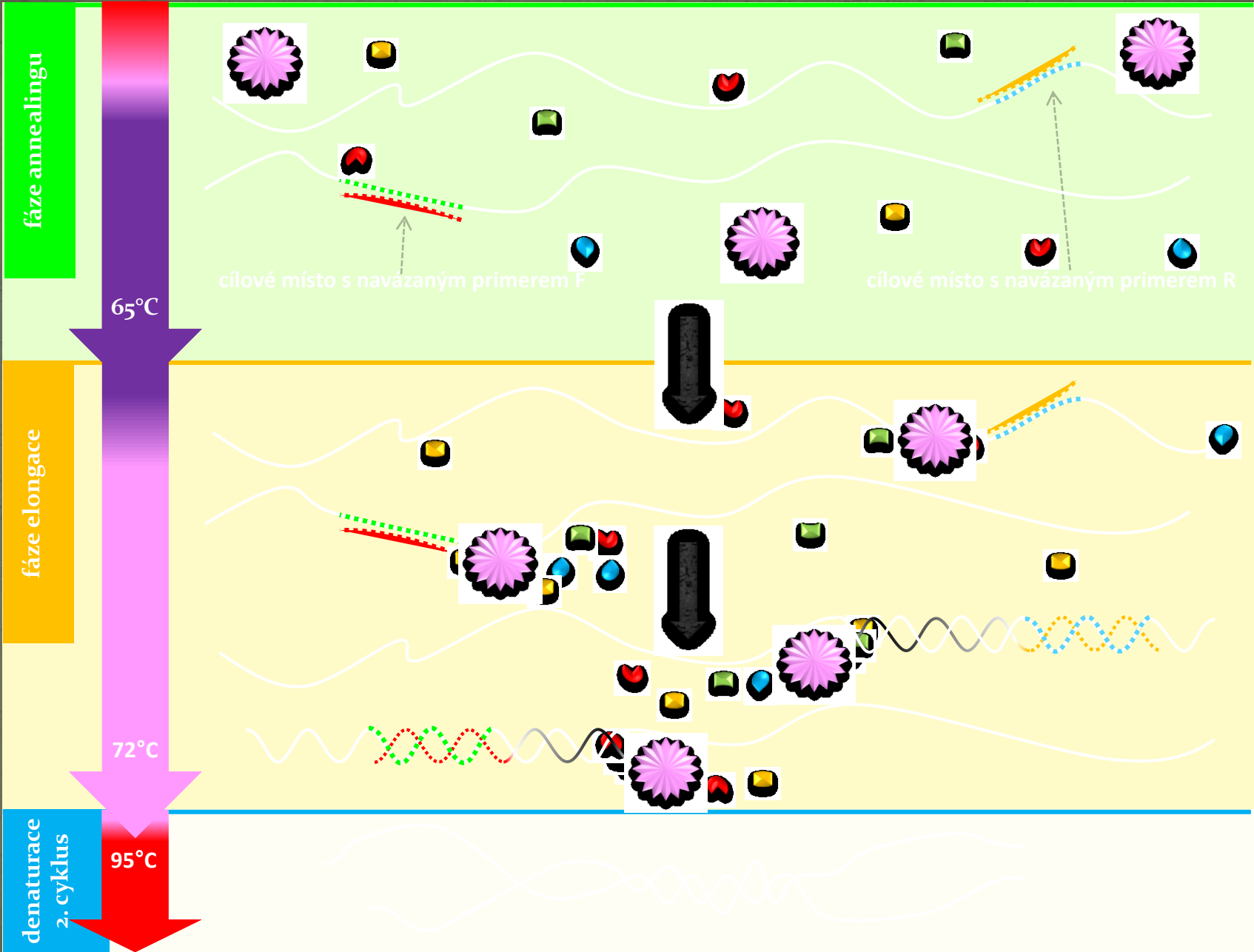


# PCR

- Polymerázová řetězová reakce
- Princip obou metod/kroků stejný

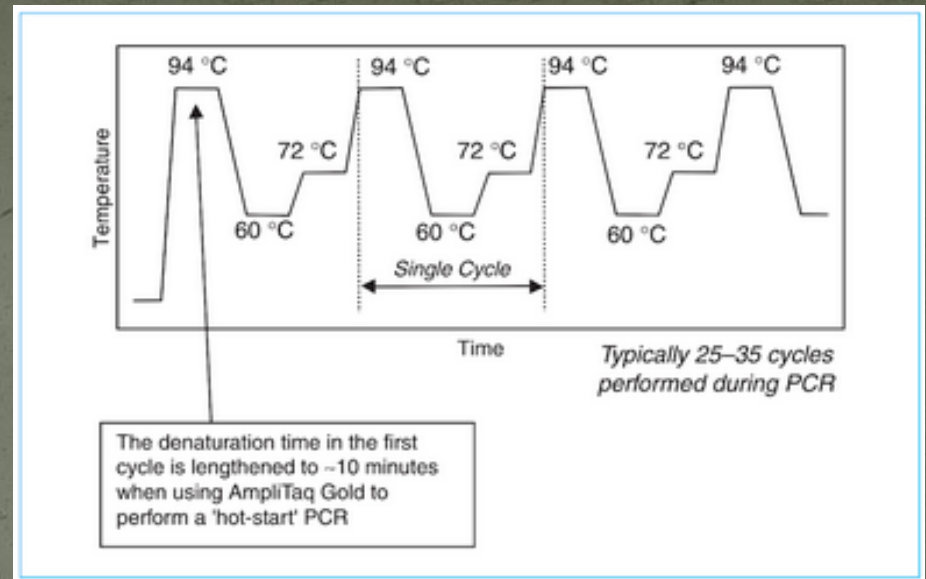


- **Denaturace** - DNA se po dobu 20–30 sekund zahřívá na teplotu 94–98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
- **Nasednutí primerů** – teplota se sníží na 50–65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.
- **Syntéza DNA** - teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity na 75–80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.

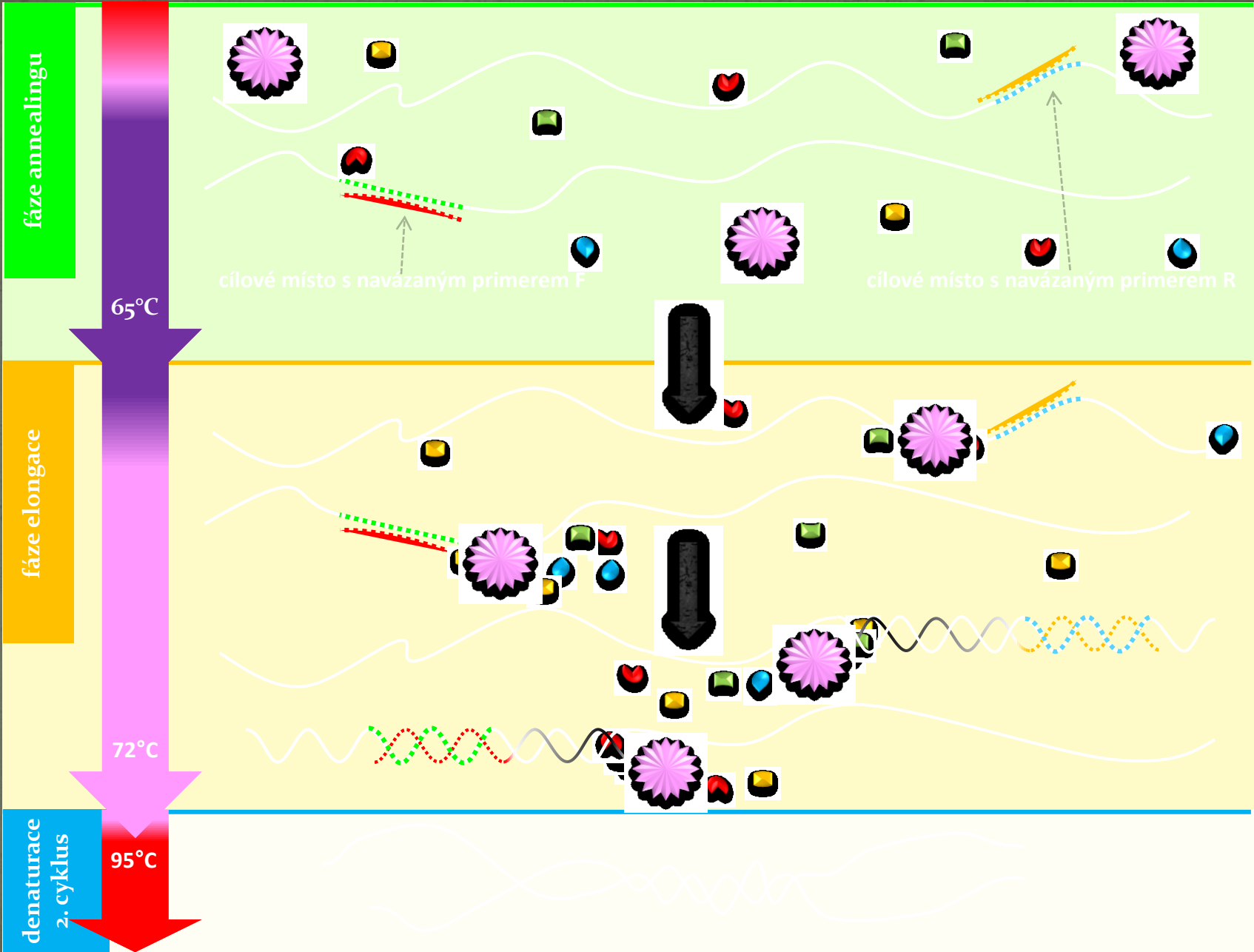


# PCR

- Polymerázová řetězová reakce
- Princip obou metod/kroků stejný



- **Denaturace** - DNA se po dobu 20–30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou mohou v dalším kroku nasednout primery.
- **Nasednutí primerů** – teplota se sníží na 50-65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.
- **Syntéza DNA** - teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymerázy. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity na 75-80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.



# Ingredience pro PCR

Reagent	Optimal Concentration
Tris-HCl, pH 8.3 (25°C)	10–50 mM
Magnesium chloride	1.2–2.5 mM
Potassium chloride	50 mM
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	200 μM each dATP, dTTP, dCTP, dGTP
DNA polymerase, thermal stable*	0.5–5 U
Bovine serum albumin (BSA)	100 μg/mL
Primers	0.1–1.0 μM
Template DNA	1–10 ng genomic DNA

Table 4.2

*Typical components for PCR amplification.*

\*Taq and TaqGold are the two most common thermal stable polymerase used for PCR.



# Vlivy na účinnost amplifikace

- ✓ PCR inhibitory
- ✓ nesprávné složení PCR reakční směsi – nedostatečná koncentrace dNTPs,  $Mg^{2+}$ , primerů či DNA polymerázy; příliš vysoká koncentrace  $Mg^{2+}$
- ✓ vyšší než optimální hybridizační teplota – ani specifické primery se „neudrží“
- ✓ vstupní množství templátové DNA
- ✓ nesprávné nasednutí primerů, nesprávné složení PCR reakční směsi, příliš nízká anelační teplota - snížení specifity reakce
- ✓ chyby při činnosti polymerázy – zařazení nesprávného nukleotidu, prokluz polymerázy („stutter“)

# PCR

- ✓ namnožení zájmových lokusů před provedením dalších analýz (SNP lokusů, HVR mtDNA apod.)
- ✓ jeden z více kroků nějaké analýzy (mono- či multiplexová PCR jako součást analýzy STR lokusů, asymetrická PCR jako součást sekvenace HVR mtDNA apod.)
- ✓ monoplexová PCR – amplifikace pouze jediného lokusu v jedné reakci s použitím jednoho páru primerů
- ✓ multiplexová PCR - amplifikace více lokusů v jedné reakci s použitím většího počtu páru primerů (duplexová, triplexová PCR apod.)
- ✓ symetrická PCR – oba primery v rámci primerového páru přidány do reakce ve stejném množství
- ✓ nesymetrická PCR – preference kopírování v jednom směru přidání jednoho primeru ve větším množství

Step in Protocol	AmpF/STR® kits (Applied Biosystems)	GenePrint® STR kits (Promega Corporation)
Initial Incubation	95°C for 11 minutes	95°C for 11 minutes
Thermal Cycling	28 cycles	30 cycles <sup>a</sup>
Denature	94°C for 1 minute	94°C for 30 seconds (cycle 1–10) 90°C for 30 seconds (cycle 11–30)
Anneal	59°C for 1 minute	60°C for 30 seconds
Extend	72°C for 1 minute	70°C for 45 seconds
Final Extension	60°C for 45 minutes	60°C for 30 minutes
Final Soak	25°C (until samples removed)	4°C (until samples removed)



### Thermal Cycling Protocol

96°C for 1 minute, then:

96°C for 5 seconds

60°C for 35 seconds

72°C for 5 seconds

for 30 cycles, then:

60°C for 2 minutes

4°C soak





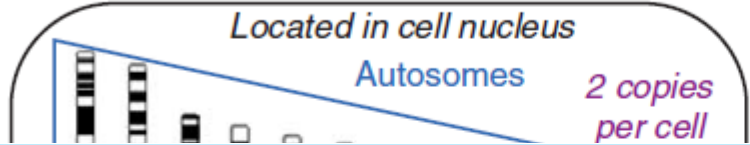
CO detekují a ČÍM

# Opakování

- DNA: struktura a funkce
- marker /znak– lokace
- autozóm x gonozóm
- struktura
- mitózoou a meiózoou
- rozdíl mezi sekven

**Human Genome**  
23 Pairs of Chromosomes + mtDNA

*Located in cell nucleus*




Autosomes  
*2 copies per cell*

*Located in mitochondria*

**Chromosome 12**

telomere →

p  
(short arm)



Band 3

12p3

(a) Sequence polymorphism

-----AGACTAGACATT-----

-----AGATTAGGCATT-----


(b) Length polymorphism

-----(AATG)(AATG)(AATG)-----

*3 repeats*

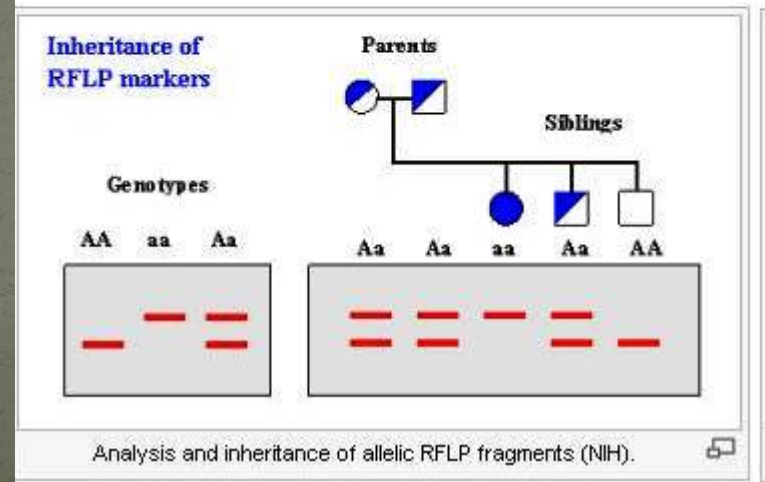
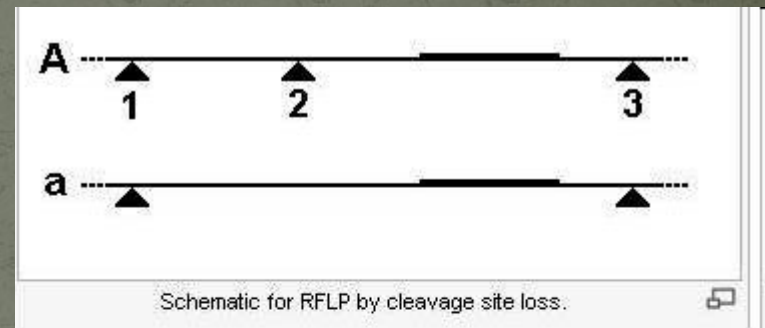
-----(AATG)(AATG)-----

*2 repeats*

telomere → 

# RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

- polymorfismus délky restričních fragmentů
- štěpení restriční endonukleázou EcoRI
- pokud místo obsahuje rozpoznávací sekvenci dojde ke vzniku fragmentu

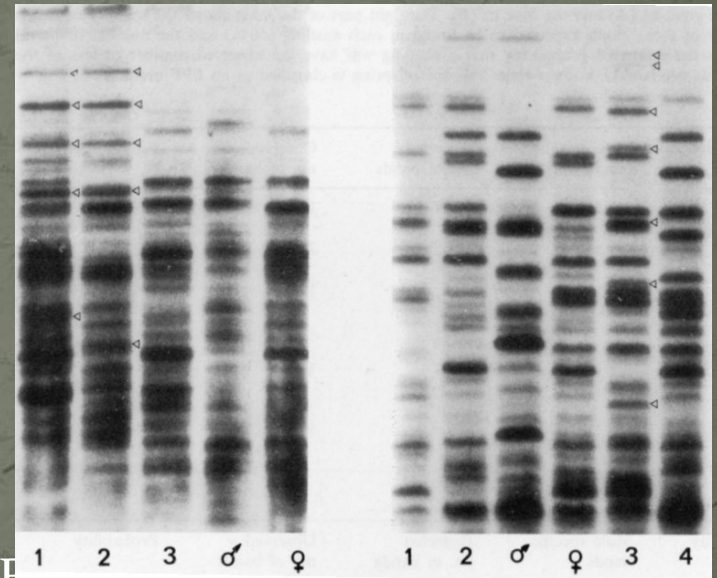




# VNTR (variable number tandem repeats)

- použity v původní Jeffreysově metodě
- jedna sonda se váže k mnoha lokusům obsahující VNTR polymorfizmy
- vzniká obraz připomínající čárkový kód
- umožnění personální identifikace, ale v případě směsných vzorků velmi špatná interpretace
- minisatelity: 10 - 100 bp
- marker D1S80
  - délka 16 bp opakování 16 -41 x

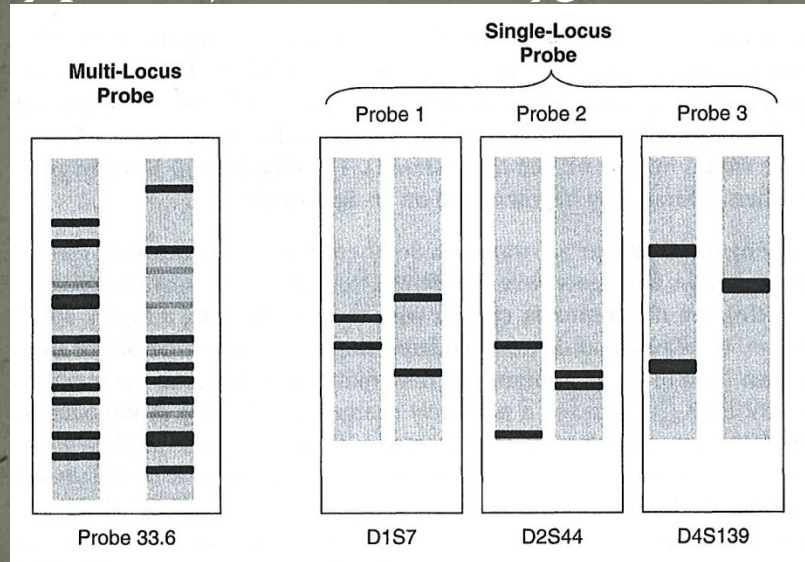
!!!Ne každý minisatelit je VNTR!!!



- [https://www.youtube.com/watch?v=5S\\_GBixvym](https://www.youtube.com/watch?v=5S_GBixvym)

# VNTR (variable number tandem repeats)

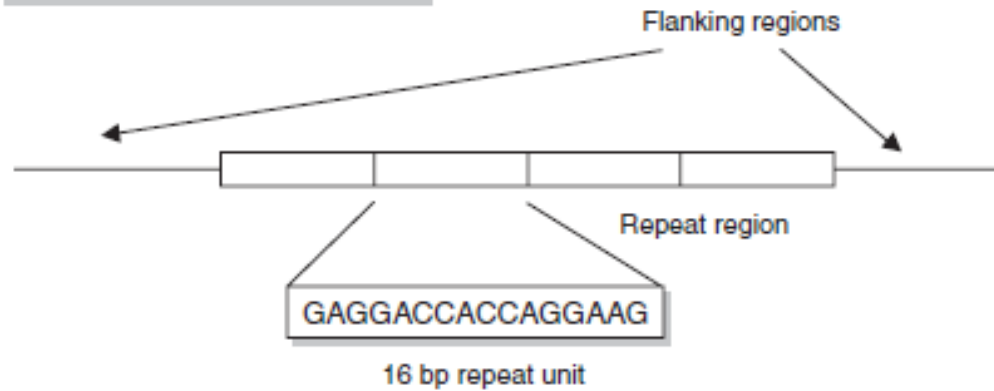
- detekovány pouze jedna (homozygot) nebo dvě (heterozygot) alely



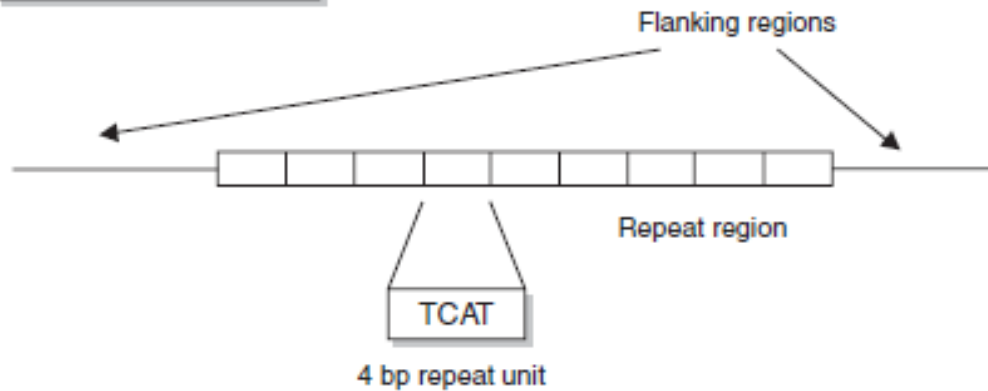
**Table 3.2** Characteristics of single-locus VNTR probes and RFLP markers widely used in North America during the late 1980s and 1990s.

Chromosome Designation	VNTR Probe	Number of Bins	Heterozygosity	<i>HaeIII</i> Fragment Size (kb)	Repeat Unit Length (bp)
D1S7	MS1	28	0.945	0.5–12	9
D2S44	yNH24	26	0.926	0.7–8.5	31
D4S139	pH30	19	0.899	2–12	31
D10S28	pTBQ7	24	0.943	0.4–10	33
D14S13	pCMM101	30	0.899	0.7–12	15
D17S79	V1	19	0.799	0.5–3	38

Minisatellite Marker (D1S80)

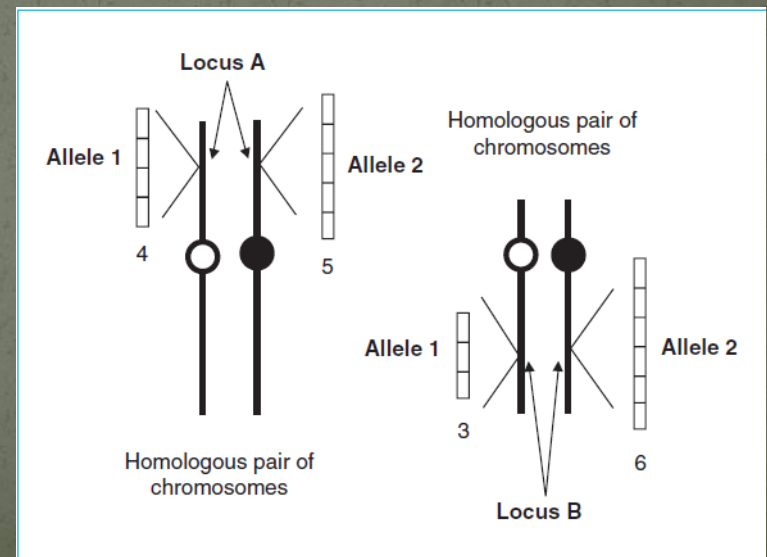


STR Marker (TH01)



# STR (Short tandem repeats)

- <https://www.youtube.com/watch?v=9bEAJYnVVBA>
- mikrosatelity: 2 – 10 bp dlouhé úseky
- opakování: 5 – 50 x
- nekódující oblasti DNA nebo v intronech, 3 % genomu  
– každých 10.000 nukleotidů 1 STR





- D<sub>16</sub>S<sub>539</sub>
- D: DNA
- 16: chromosome 16
- S: single copy sequence
- 539: 539th locus described on chromosome 16

Locus Name	Reference
CSF1PO	Hammond, H.A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C.T. and Chakraborty, R. (1994) Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. <i>American Journal of Human Genetics</i> , 55, 175–189.
FGA	Mills, K.A., Even, D. and Murray, J.C. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). <i>Human Molecular Genetics</i> , 1, 779.
TH01	Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S. and Merrill, C.R. (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). <i>Nucleic Acids Research</i> , 19, 3753.
TPOX	Anker, R., Steinbrueck, T. and Donis-Keller, H. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. <i>Human Molecular Genetics</i> , 1, 137.
VWA	Kimpton, C.P., Walton, A. and Gill, P. (1992) A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. <i>Human Molecular Genetics</i> , 1, 287.
D3S1358	Li, H., Schmidt, L., Wei, M.-H., Hustad, T., Lerman, M.I., Zbar, B. and Tory, K. (1993) Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359. <i>Human Molecular Genetics</i> , 2, 1327.
D5S818	Cooperative Human Linkage Center GATA3F03.512
D7S820	Cooperative Human Linkage Center GATA3F01.511
D8S1179	Cooperative Human Linkage Center GATA7G07.37564
D13S317	Cooperative Human Linkage Center GATA7G10.415
D16S539	Cooperative Human Linkage Center GATA11C06.715
D18S51	Staub, R.E., Speer, M.C., Luo, Y., Rojas, K., Overhauser, J., Otto, L. and Gilliam, T.C. (1993) A microsatellite genetic linkage map of human chromosome 18. <i>Genomics</i> , 15, 48–56.
D21S11	Sharma, V. and Litt, M. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. <i>Human Molecular Genetics</i> , 1, 67.
Amelogenin	Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, C.P. and Gill, P. (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. <i>BioTechniques</i> , 15, 637–641.

Table 3.1

Original reference describing each of the 13 CODIS STR loci and the gender identification marker amelogenin.

Locus Name	Chromosomal Location	Physical Position <sup>a</sup>	Repeat Motif ISFG Format <sup>b</sup>	GenBank Accession <sup>c</sup>	GenBank Allele	Allele Range <sup>d</sup>	Number of Alleles Seen <sup>e</sup>
CSF1PO	5q33.1 c-fms proto-oncogene, 6 <sup>th</sup> intron	Chr 5 149.484 Mb	TAGA	X14720	12	5–16	20
FGA	4q31.3 alpha fibrinogen, 3 <sup>rd</sup> intron	Chr 4 156.086 Mb	CTTT	M64982	21	12.2–51.2	80
TH01	11p15.5 tyrosine hydroxylase, 1 <sup>st</sup> intron	Chr 11 2.156 Mb	TCAT	D00269	9	3–14	20
TPOX	2p25.3 thyroid peroxidase, 10 <sup>th</sup> intron	Chr 2 1.436 Mb	GAAT	M68651	11	4–16	15
VWA	12p13.31 von Willebrand Factor, 40 <sup>th</sup> intron	Chr 12 19.826 Mb	[TCTG][TCTA]	M25858	18	10–25	28
D3S1358	3p21.31	Chr 3 45.543 Mb	[TCTG][TCTA]	NT_005997	18	8–21	24
D5S818	5q23.2	Chr 5 123.187 Mb	AGAT	G08446	11	7–18	15
D7S820	7q21.11	Chr 7 83.401 Mb	GATA	G08616	12	5–16	30
D8S1179	8q24.13	Chr 8 125.863 Mb	[TCTA][TCTG]	G08710	12	7–20	17
D13S317	13q31.1	Chr 13 80.52 Mb	TATC	G09017	13	5–16	17
D16S539	16q24.1	Chr 16 86.168 Mb	GATA	G07925	11	5–16	19
D18S51	18q21.33	Chr 18 59.098 Mb	AGAA	L18333	13	7–39.2	51
D21S11	21q21.1	Chr 21 19.476 Mb	Complex [TCTA][TCTG]	AP000433	29	12–41.2	82

Locus Name	Chromosomal Location	GenBank Accession	Repeat ISFG format	Allele Range	Amplicon Size Range	Reference
ARA	Xcen-q13	M21748	CAG	14-32	255-315 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
APOA1	11q23-qter	J00048	AAAG	Complex	263-291 bp	Dupuy and Olaisen (1997)
ACTBP2	6	V00481	AAAG	4.2-37	198-325 bp	Dupuy and Olaisen (1997)
CD4	12p12-pter	M86525	TTTTTC	6-16	125-175 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
CYAR04	15q21.1	M30798	AAAT	5-12	173-201 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
F13A01	6p24.3-25.1	M21986	GAAA	3.2-16	281-331 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
F13B	1q31-q32.1	M64554	TTTA	6-12	169-193 bp	Promega
FABP	4q28-31	M18079	ATT	10-15	199-220 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
FES/FPS	15q25-qter	X06292	ATTT	7-14	222-250 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
HPRTB	Xq26.1	M26434	TCTA	6-17	259-303 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
LPL	8p22	D83550	TTTA	7-14	105-133 bp	Promega
Penta D	21q	AP001752	AAAGA	2.2-17	376-449 bp	<b>PowerPlex 16</b>
Penta E	15q	AC027004	AAAGA	5-24	379-474 bp	<b>PowerPlex 16</b>
PLA2A1	12q23-qter	M22970	AAT		118-139 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
RENA4	1q32	M10151	ACAG		255-275 bp	Hammond <i>et al.</i> (1994)
D1S1656	1pter-qter	G07820	(TAGA) (TAGG)	9-19.3	125-168 bp	Wiegand <i>et al.</i> (1999)
D2S1242	2pter-qter	L17825	(GAAA) (GAAG)	10-18	141-175 bp	Reichenpfader <i>et al.</i> (1999)
D2S1338	2q35-37.1	G08202	(TGCC) (TTCC)	15-28	289-341 bp	<b>SGM Plus, Identifiler</b>
D3S1359	3p	AA306290	TCTA	11-25.3	196-255 bp	Potl <i>et al.</i> (1998)
D3S1744	3q24	G08246	GATA	14-22	150-182 bp	Lifecodes

Locus Name	Chromosomal Location	GenBank Accession	Repeat ISFG format	Allele Range	Amplicon Size Range	Reference
D6S477	6pter-qter	G08543	TCTA	13.2-22	206-240 bp	Carracedo and Lareu (1998)
D7S809	7pter-qter	X73290	(AGGA) (AGGC)	9 alleles	241-289 bp	Tamaki <i>et al.</i> (1996)
D8S347	8q22.3-24.3	L12268	AGAT	16-28	340-388 bp	Polti <i>et al.</i> (1997)
D8S639	8p21-p11	L24797	(AGAT) (AGGT)	20-33.3	316-371 bp	Seidl <i>et al.</i> (1999)
D9S302	9q31-33	G08746	ATCT	17 alleles	255-353 bp	Carracedo and Lareu (1998)
D10S2325	10pter-qter	G08790	TCTTA	6-17	113-168 bp	Wiegand <i>et al.</i> (1999)
D11S488	11q24.1-25	L04732	(AAAG) (GAAG)	26-41	242-302 bp	Seidl <i>et al.</i> (1999)
D11S554	11p11.2-12	M87277	AAAG	Complex	176-286 bp	Dupuy and Olaisen (1997)
D12S391	12	G08921	(AGAT) (AGAC)	15-26	209-253 bp	Lareu <i>et al.</i> (1996)
D12S1090	12q12	Not found	GATA	9-33	212-306 bp	Lifecodes
D18S535	18pter-qter	G07985	GATA	9-16	130-158 bp	Wiegand <i>et al.</i> (1999)
D18S849	18q12-q21	G07992	GATA	9-20	93-133 bp	Lifecodes
<b>D19S433</b>	19q12-13.1	G08036	AAGG	9-17.2	106-140 bp	<b>SGM Plus, Identifiler</b>
D20S161	20pter-qter	L16405	TAGA	14-22	156-187 bp	Hou <i>et al.</i> (1999)
D22S683	22pter-qter	G08086	(TA) (TATC)	12-21.2	168-206 bp	Carracedo and Lareu (1998)
DXS6807	Xpter-p22.2	G09662	GATA	11-17	251-275 bp	Edelmann and Szibor (1999)

Loci/Kit	Promega Corporation STR Kits								Applied Biosystems AmpFISTR Kits									
	PP1.1 Alleles	#	PP2.1 Alleles	#	PP16 Alleles	#	PP ES Alleles	#	ProfilerPlus Alleles	#	COfiler Alleles	#	SGM Plus Alleles	#	Identifiler Alleles	#	SEfiler Alleles	#
CSF1PO	6-15	10			6-15	10					6-15	10			6-15	10		
FGA			17-46.2	19	16-46.2	28	16-46.2	28	17-30	14			17-51.2	28	17-51.2	28	17-51.2	28
TH01	5-11	7	4-13.3	10	4-13.3	10	4-13.3	10			5-9.3,10	7	4-13.3	10	4-13.3	10	4-13.3	10
TPOX	6-13	8	6-13	8	6-13	8					6-13	8			6-13	8		
VWA	10-22	13	10-22	13	10-22	13	10-22	13	11-21	11			11-24	14	11-24	14	11-24	14
D3S1358			12-20	9	12-20	9	12-20	9	12-19	8	12-19	8	12-19	8	12-19	8	12-19	8
D5S818	7-15	9			7-16	10			7-16	10					7-16	10		
D7S820	6-14	9			6-14	9			6-15	10	6-15	10			6-15	10		
D8S1179			7-18	12	7-18	12	7-18	12	8-19	12			8-19	12	8-19	12	8-19	12
D13S317	7-15	9			7-15	9			8-15	8					8-15	8		
D16S539	5,8-15	9			5,8-15	9					5,8-15	9	5,8-15	9	5,8-15	9	5,8-15	9
D18S51			8-27	22	8-27	22	8-27	22	9-26	21			7,9-27	23	7,9-27	23	7,9-27	23
D21S11			24-38	24	24-38	24	24-38	24	24.2-38	22			24-38	24	24-38	24	24-38	24
D2S1338													15-28	14	15-28	14	15-28	14
D19S433													9-17.2	15	9-17.2	15	9-17.2	15
Penta D					2.2-17	14												
Penta E			5-24	20	5-24	20												
SE33							4.2-37	35									4.2-37	35
Amelogenin	X,Y	2			X,Y	2	X,Y	2	X,Y	2	X,Y	2	X,Y	2	X,Y	2	X,Y	2
Total Alleles		76		137		209		155		118		54		159		205		194

# PCR amplification kits for forensic DNA profiling

Locus guide—loci amplified by kit, approximate size ranges (bp), dye set, and probability of identity.

Locus	Chromosome location	Identifiler™, Identifiler™ Plus, and Identifiler™ Direct kits	MiniFiler™ kit	NGM SElect™ and NGM SElect™ Express kits	NGM Detect™ kit	GlobalFiler™ IQC kit	GlobalFiler™ and GlobalFiler™ Express kits	VeriFiler™ Express kit	VeriFiler™ Plus kit
CSF1PO	5p33.3-34	302-349	84-133			277-325	277-325	277-325	277-325
D5S818	5q21-31	128-160				133-190	133-190	133-190	360-420
D7S820	7q11.21-22	251-299	141-194			258-305	258-305	258-305	255-302
D13S317	13q22-31	205-250	90-139			197-249	197-249	197-249	199-253
TPOX	2p23-2per	216-261				332-385	332-385	332-385	358-415
D3S1358	3p	98-148		114-169	105-162	90-147	90-147	90-147	82-142
D8S1179	8q24.13	118-184		117-175	85-160	108-177	108-177	108-177	113-177
D16S539	16q24-qter	235-302	70-122	223-276	65-119	221-274	221-274	221-274	221-274
D18S51	18q21.3	264-350	122-211	259-348	121-215	255-348	255-348	255-348	255-348
D21S11	21p11.2-q21	184-248	180-251	178-250	191-260	179-247	179-247	179-247	179-247
FGA	4q28	206-360	136-297	221-372	163-330	221-380	221-380	221-380	204-366
TH01	11p15.5	159-205		176-222	218-268	174-220	174-220	174-220	164-211
VWA	12p12-pter	151-215		149-215	119-188	151-215	151-215	151-215	145-215
D2S1338	2q35-37.1	304-370	111-180	261-356	80-170	275-356	275-356	275-356	275-356
D19S433	19q12	101-148		122-167	166-235	115-174	115-174	115-174	130-202
D1S1656	1q42.2			170-224	262-323	154-210	154-210	154-210	140-197
D2S441	2p14			74-114	328-380	75-114	75-114	75-114	80-125
D10S1248	10q26.3			72-127	296-355	80-132	80-132	80-132	367-423
D12S391	12p13.2			225-267	273-342	211-271	211-271	211-271	213-273
D22S1045	22q12.3			76-120	239-291	83-127	83-127	83-127	83-127
SE33	6q14			295-440	180-351	306-444	306-444		
D6S1043	6q16.1							306-384	327-415
Amelogenin	X; p22.1-22.3, Y; p11.2	106-114	99-110	100-108	105-117	97-108	97-108	97-108	100-111
Y-Indel	Yq11.221				87-100	79-88	79-88	79-88	79-88
DYS391	Yq11.21					359-395	359-395		
IQCS	NA				64-73	64-73			64-72
IQCL	NA				445-453	445-453			445-453
Penta D	21q							370-455	78-162
Penta E	15q							349-465	304-425
Dye set†		G5	G5	G5	J6-T	J6	J6	J6	J6-T
Probability of Identity*									
African American		1.31 x 10 <sup>-8</sup>	6.52 x 10 <sup>-11</sup>	8.12 x 10 <sup>-8</sup>	8.12 x 10 <sup>-8</sup> **	6.18 x 10 <sup>-8</sup>	6.18 x 10 <sup>-8</sup>	2.55 x 10 <sup>-8</sup>	2.13 x 10 <sup>-8</sup>
US Caucasian		5.01 x 10 <sup>-8</sup>	8.21 x 10 <sup>-11</sup>	2.35 x 10 <sup>-8</sup>	2.35 x 10 <sup>-8</sup> **	3.71 x 10 <sup>-8</sup>	3.71 x 10 <sup>-8</sup>	1.09 x 10 <sup>-8</sup>	1.24 x 10 <sup>-8</sup>
US Hispanic		7.65 x 10 <sup>-8</sup>	1.05 x 10 <sup>-10</sup>	3.16 x 10 <sup>-8</sup>	3.16 x 10 <sup>-8</sup> **	3.09 x 10 <sup>-8</sup>	3.09 x 10 <sup>-8</sup>	2.95 x 10 <sup>-8</sup>	2.29 x 10 <sup>-8</sup>
Native American		3.82 x 10 <sup>-17</sup>	2.06 x 10 <sup>-10</sup>						
Asian						3.34 x 10 <sup>-8</sup>	3.34 x 10 <sup>-8</sup>	4.69 x 10 <sup>-8</sup>	

† Individual dye labels associated with the colors in this chart are given in the user manuals.

\* Refer to appropriate user manual for additional population information.

\*\* Based on NGM SElect kit, since loci are common. To be updated after publication of developmental validation in the user manual.

# Y-STR PCR amplification kits for forensic DNA profiling

Locus guide—loci amplified by kit, approximate size ranges (bp), and dye set.

Locus	Yfiler™ kit	Yfiler™ Plus kit
DYS627		319–394
DYS389I	134–178	142–184
DYS635	241–274	187–257
DYS389II	246–302	260–314
DYS576		68–138
DYS391	146–181	348–403
DYS448	273–332	271–345
Y-GATA-H4	114–150	231–269
DYS19	167–219	179–229
DYS456	100–127	
DYS458	133–165	115–177
DYS460		75–113
DYS518		327–406
DYS392	286–335	270–326
DYS437	174–210	
DYS438	215–257	201–264
DYS390	185–245	139–197
DYS456		71–135
DYS449		320–403
DYS385 a/b	235–323	220–318
DYS437		173–215
DYS570		93–168
DYS533		334–384
DYS387S1 a/b		259–325
DYS481		203–256
DYS439	192–236	145–200
DYS393	104–144	85–139
<b>Dye set</b>	G5	J6



- **PowerPlex<sup>®</sup> ESX 17 System**

- The PowerPlex<sup>®</sup> ESX 17 System amplifies the loci recommended by the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and European DNA Profiling Group (EDNAP) as mini-STRs (<125bp; D2S441, D10S1248 and D22S1045) or midi-STRs (125–185bp; D1S1656 and D12S391).

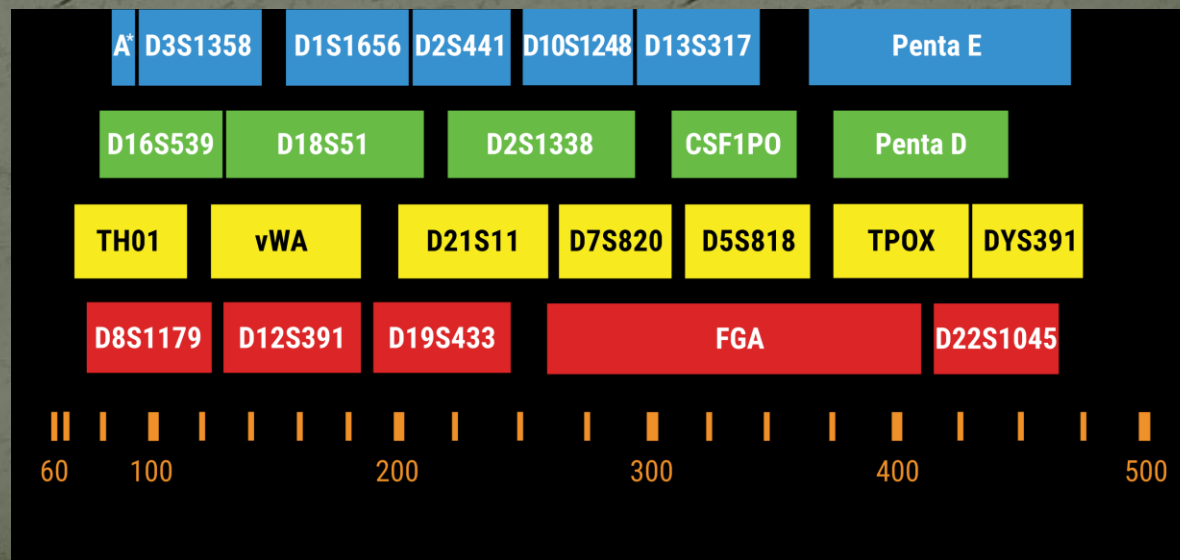
- **PowerPlex<sup>®</sup> ESI 17 Pro System**

- The PowerPlex<sup>®</sup> ESI 17 Pro System is designed to amplify six of the original seven European Standard Set (ESS) loci (D3S1358, D18S51, TH01, vWA, D8S1179 and the more common FGA alleles) along with D16S539 and D19S433 as smaller amplicons (<250bp), while the loci recommended by the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and European DNA Profiling Group (EDNAP) (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391 and D22S1045) are present as larger amplicons.

## ESI 17 (Promega)



## PowerPlex® Fusion Systém 24 lokusový kit



STR Kit	Number of Loci	PI* (N = 1036)
GlobalFiler™ STR Kit	23	$1.63 \times 10^{-27}$
Investigator® 24plex Kit	23	$1.63 \times 10^{-27}$
PowerPlex® Fusion System	24	$1.38 \times 10^{-28}$
PowerPlex® Fusion 6C System	27	$9.09 \times 10^{-31}$

# PowerPlex® ESI 17 Fast System

A\* D3S1358 D19S433 D2S1338 D22S1045

D16S539 D18S51 D1S1656 D10S1248 D2S441

TH01 vWA D21S11 D12S391

D8S1179 FGA SE33



\*Amelogenin

# Investigator ESSplex SE QS Kit (Qiagen)

- The Investigator ESSplex SE QS Kit uses QIAGEN's fast-cycling PCR technology for the simultaneous amplification of 16 STR markers and Amelogenin, as recommended by the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the European DNA Profiling Group (EDNAP) as the European Standard Set of loci (ESS).

The Investigator ESSplex SE QS Kit Primer Mix contains the new innovative performance control Quality Sensor (QS<sub>1</sub> and QS<sub>2</sub>). It provides additional information on sample quality and PCR success. The Quality Sensor, being simultaneously amplified with the STR markers, shows you if you are dealing with:

- Successful PCR amplification
- Failed PCR amplification
- Absence of DNA
- Degraded DNA
- Inhibitors

Dye	Marker						
6-FAM	QS1	Amelogenin	TH01	D3S1358	vWA	D21S11	QS2
BTG	D16S539	D1S1656	D19S433	SE33			
BTY	D10S1248	D22S1045	D12S391	D8S1179	D2S1338		
BTR	D2S441	D18S51	FGA				

The additional information obtained with the Quality Sensor will help you streamline your sample analysis by showing you where to focus your analytical efforts, and save you time and money by eliminating the need for unnecessary PCR re-runs.

- The Investigator ESSplex SE QS Kit is designed specifically for rapid and reliable generation of DNA profiles from blood, buccal swabs, and forensic stains. The kit utilizes QIAGEN's fast-cycling PCR technology, allowing amplification in approximately 60 minutes. It provides highly robust results with inhibitor-resistant chemistry.

Locus	GenBank® accession number	Repeat motif of the reference allele	Chromosomal mapping
Amelogenin X	M55418	–	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	M55419	–	Yp11.2
D1S1656	NC_000001.9	[TAGA] <sub>16</sub> [TGA][TAGA][TAGG] <sub>1</sub> [TG] <sub>5</sub>	1q42
D2S441	AL079112	[TCTA] <sub>12</sub>	2p14
D2S1338	G08202	[TGCC] <sub>6</sub> [TTCC] <sub>11</sub>	2q35
D3S1358	11449919	TCTA [TCTG] <sub>2</sub> [TCTA] <sub>15</sub>	3p25.3
D8S1179	G08710	[TCTA] <sub>12</sub>	8q23.1-23.2
D10S1248	AL391869	[GGAA] <sub>13</sub>	10q26.3
D12S391	G08921	[AGAT] <sub>5</sub> GAT [AGAT] <sub>7</sub> [AGAC] <sub>6</sub> AGAT	12p13.2
D16S539	G07925	[GATA] <sub>11</sub>	16q24.1
D18S51	L18333	[AGAA] <sub>13</sub>	18q21.3
D19S433	G08036	AAGG [AAAG] AAGG TAGG [AAGG] <sub>11</sub>	19q12
D21S11	AP000433	[TCTA] <sub>4</sub> [TCTG] <sub>6</sub> [TCTA] <sub>3</sub> TA [TCTA] <sub>3</sub> TCA [TCTA] <sub>2</sub> TCCATA [TCTA] <sub>11</sub>	21q21.1
D22S1045	AL022314	[ATT] <sub>14</sub> ACT [ATT] <sub>2</sub>	22q12.3
FGA (FIBRA)	M64982	[TTTC] <sub>3</sub> TTTTCT [CTTT] <sub>13</sub> CTCC [TTCC] <sub>2</sub>	4q28.2
SE33 (ACTBP2)	NG000840	[AAAG] <sub>9</sub> AA [AAAG] <sub>16</sub>	6q14.2
TH01 (TC11)	D00269	[TCAT] <sub>9</sub>	11p15.5
vWA	M25858	TCTA [TCTG] <sub>4</sub> [TCTA] <sub>13</sub>	12p13.31

# Investigator 24plex QS Kit (Qiagen)

- ESS lokusy, SE<sub>33</sub>, DYS<sub>391</sub> a Amelogenin, s Quality Sensor

## Maximum Discriminatory Power

STR Typing Kits (Locus Combinations)	Total (n = 1036)
<b>CODIS 13 Loci</b>	$5.02 \times 10^{-16}$
AmpF/STR® Identifiler® Kit	$6.17 \times 10^{-19}$
PowerPlex® 16 System	$2.82 \times 10^{-19}$
PowerPlex® 18D System	$3.47 \times 10^{-22}$
<b>ESS 12 Loci</b>	$3.04 \times 10^{-16}$
PowerPlex® ESI 16 and ESX 16 Systems, AmpF/STR® NGM™ Kit	$2.80 \times 10^{-20}$
PowerPlex® ESI 17 and ESX 17 Systems, AmpF/STR® NGM SElect™ Kit	$1.85 \times 10^{-22}$
PowerPlex® 21 System	$6.71 \times 10^{-27}$
<b>CODIS 20 Loci (-DYS391)</b>	$9.35 \times 10^{-24}$
GlobalFiler® Kit	$7.73 \times 10^{-25}$
PowerPlex® Fusion System	$6.58 \times 10^{-29}$



# SNP (single nucleotide polymorfism)

- bodové mutace s výskytem v populaci max. 95% stejné varianty
- teoreticky 4 varianty, reálně 2
- s výskytem 1 SNP na 1000 bází v kódující i nekódující sekvencích
- + v genomu velmi početné, méně podléhají mutacím než mikrosatelity, relativně rovnoměrná distribuce po genomu, relativně snadná detekce
- - poměrně nákladné získávání, polymorfismus omezený