

CSI: crime scene investigation

10. CSI. A molekuláris biológiai technikák alkalmazásai



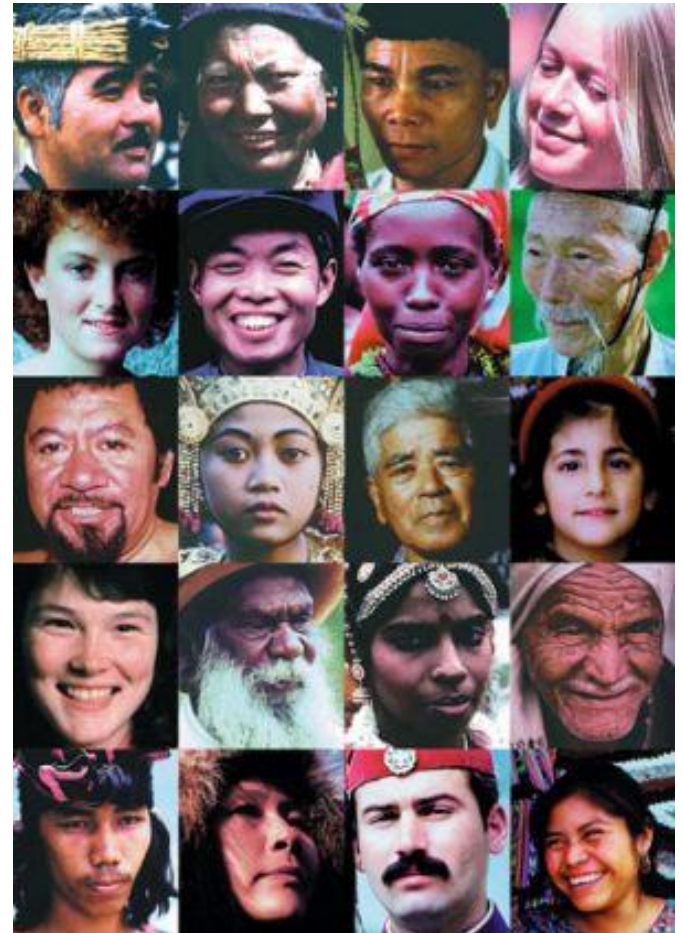
A DNS mint azonosító

- 3 milliárd bázispár az emberi DNS-ben (99.9%-ban azonos)
- 0.1%-nyi különbség elegendő az egyedek megkülönböztetéséhez
- **Genetikai polimorfizmus:** a DNS adott helyén található variációk a populáción belül (min. kettő, különben nem polimorf).



A DNS mint azonosító

- A DNS-sel történő azonosítás alapja a **genetikai polimorfizmus**
- Egyedek **azonosítására a polimorf helyek** alkalmasak, azaz az adott helyen többféle szekvencia-változat létezik a populációban
- Az azonosításra alkalmas helyek akár népcsoportonként is változhatnak



Genetikai alapfogalmak

- **Gén:** a DNS kódoló szakasza (fehérje v RNS)
- **Lókuszt:** a DNS egy adott szakasza, helye, a szekvencia helye, egy gén helye
- **Allél:** génvariáció (adott lókuszon elhelyezkedő gén változata)
- **Mutáció:** a szekvencia megváltozása.

Genetikai alapfogalmak

- **Genotípus:** az egyed génkészlete. Gyakran azonban csak a vizsgált tulajdonság genetikai hátterét értjük alatta
- **Kariotípus:** egy egyed kromoszómáinak összessége, azok száma, alak és nagyságrendi jellemzése
- **Homológ kromoszómák:** ugyanazon géneket (de nem feltétlenül azonos allélokat) hordozó kromoszómák

Genetikai alapfogalmak

- **Ploidia:** a homológ kromoszómák száma
- **Diploid:** kétszeres kromoszóma-kópia / készlet (apai és anyai)
- **Haploid:** egyszeres kromoszóma-kópia/készlet
- **Homozigóta:** az adott lókuszon ugyanazon allélok találhatóak (az apai és anyai géntípus azonos)
- **Heterozigóta:** az adott lókuszon különböző allélok találhatóak (az apai és anyai géntípus különböző)

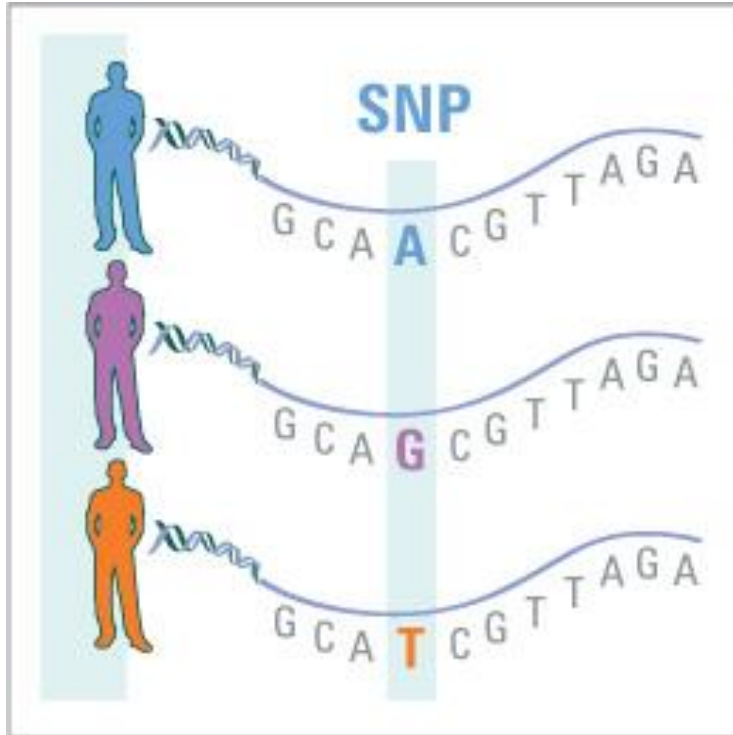
Genetikai polimorfizmus fajtái, okai

- **SNP** (*single nucleotide polymorphism*): egy pontos nukleotid polimorfizmus egyetlen nukleotid különbözik az egyes változatokban
- **Ismétlődések** – genetikai markerek
 - STR, (*short tandem repeats*): 2-4 bázispárnyi ismétlődések, pl. GTGTGTGTGTGTGTGTGTGT STR: GT, n=10
 - VNTR (*variable number of tandem repeats*): változó számú tandem ismétlődések hosszabb, akár 16 elemből is állhat

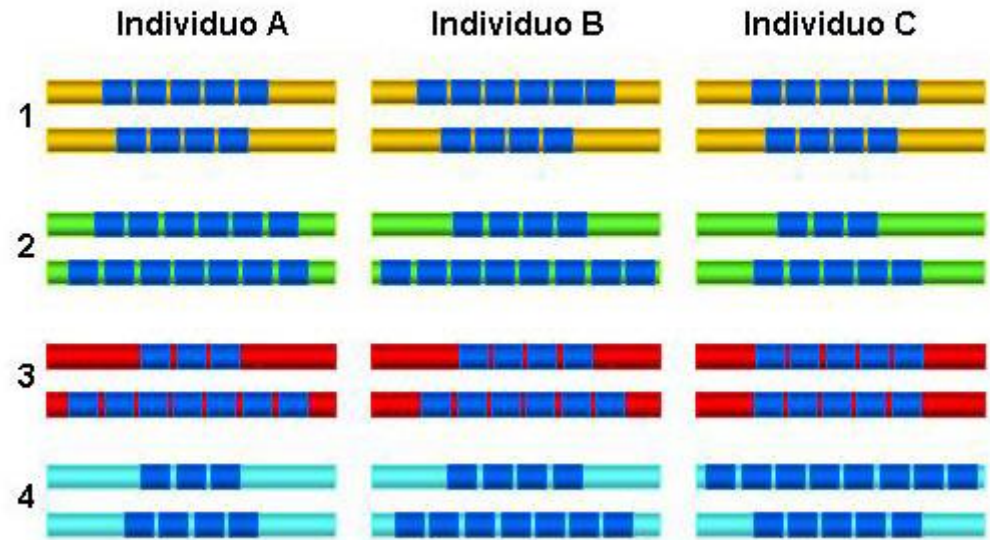


VNTR 4 allélon

Genetikai polimorfizmus fajtái, okai

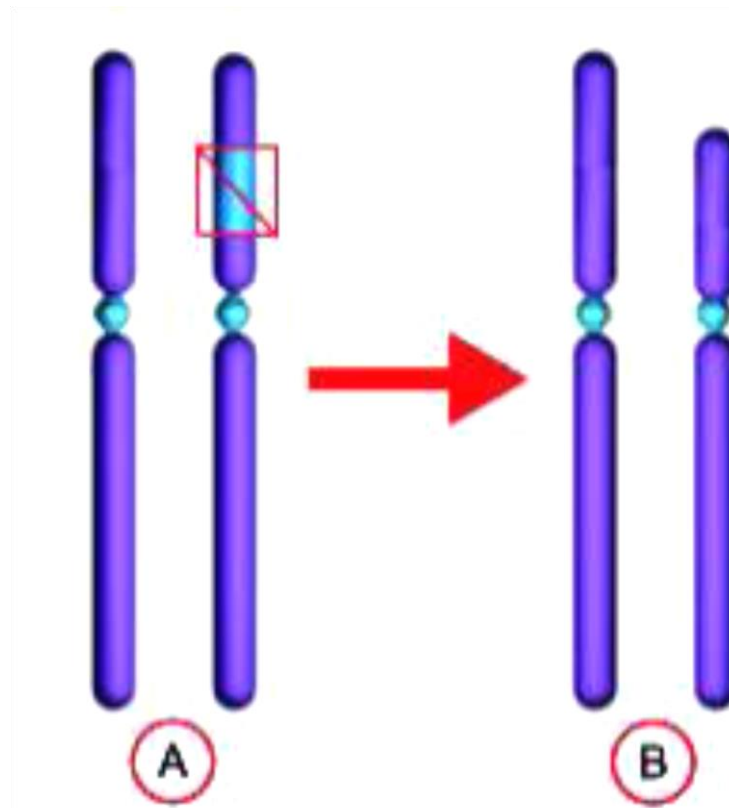


VNTRs: 4 pares de cromosomas homólogos en tres personas



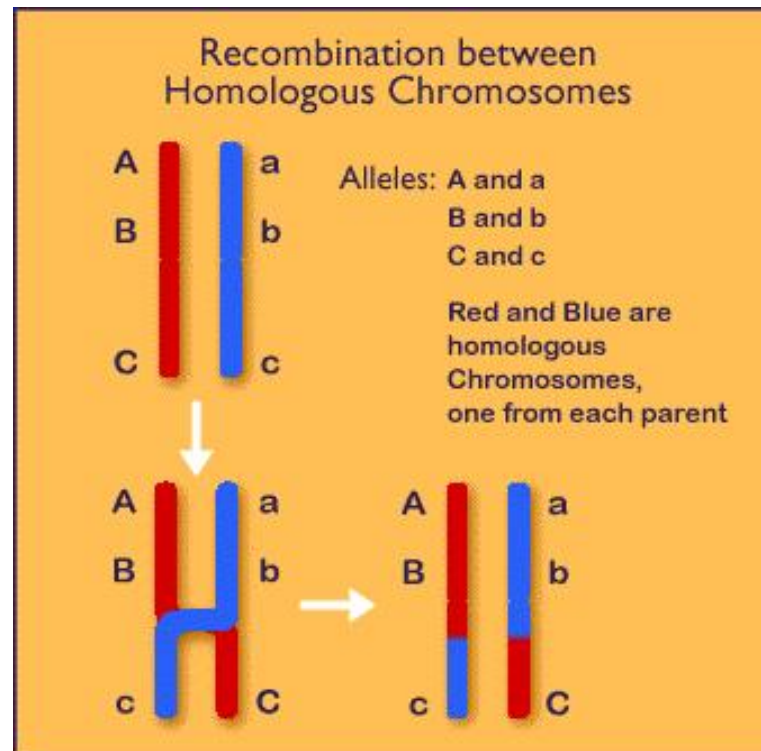
Genetikai polimorfizmus fajtái, okai

- **Inzerció, deléció:** egy bázis, vagy akár egy egész DNS szakasz kiesik a DNS láncból vagy beékelődik



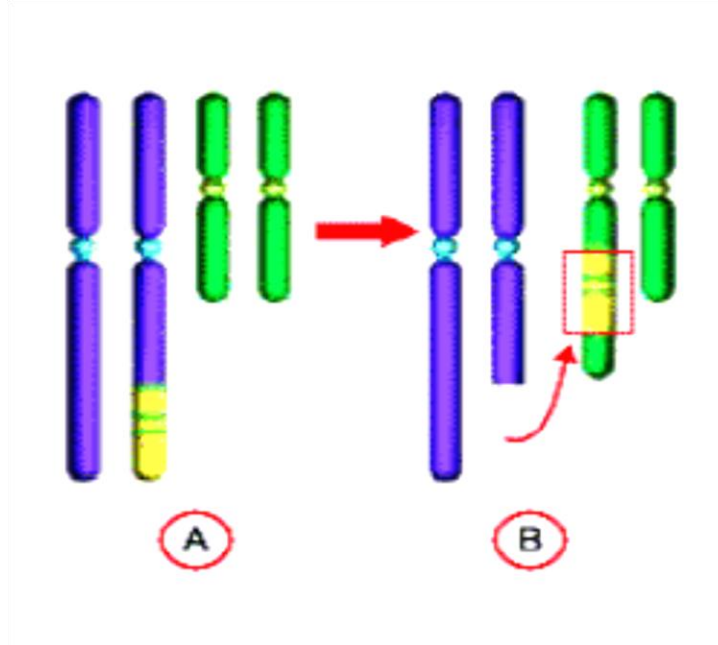
Genetikai polimorfizmus fajtái, okai

- **Rekombináció:** a homológ kromoszómák egyes szakaszainak kicserélődése (crossing over, meiózisban)
- Lehetőséget ad a szülői kromoszómák újrakombinálására, jelentősen növeli az utódok genetikai változatosságát



Genetikai polimorfizmus fajtái, okai

- **Transzpozíció:** gének sorrendjének megváltozása egy kromoszómán
- **Transzlokáció:** két, nem homológ kromoszóma közötti részek (kölcsonös) áthelyeződése, vagy kicserélődése
- **Inverzió:** egy adott kromoszómaszakasz 180°-os átfordulása

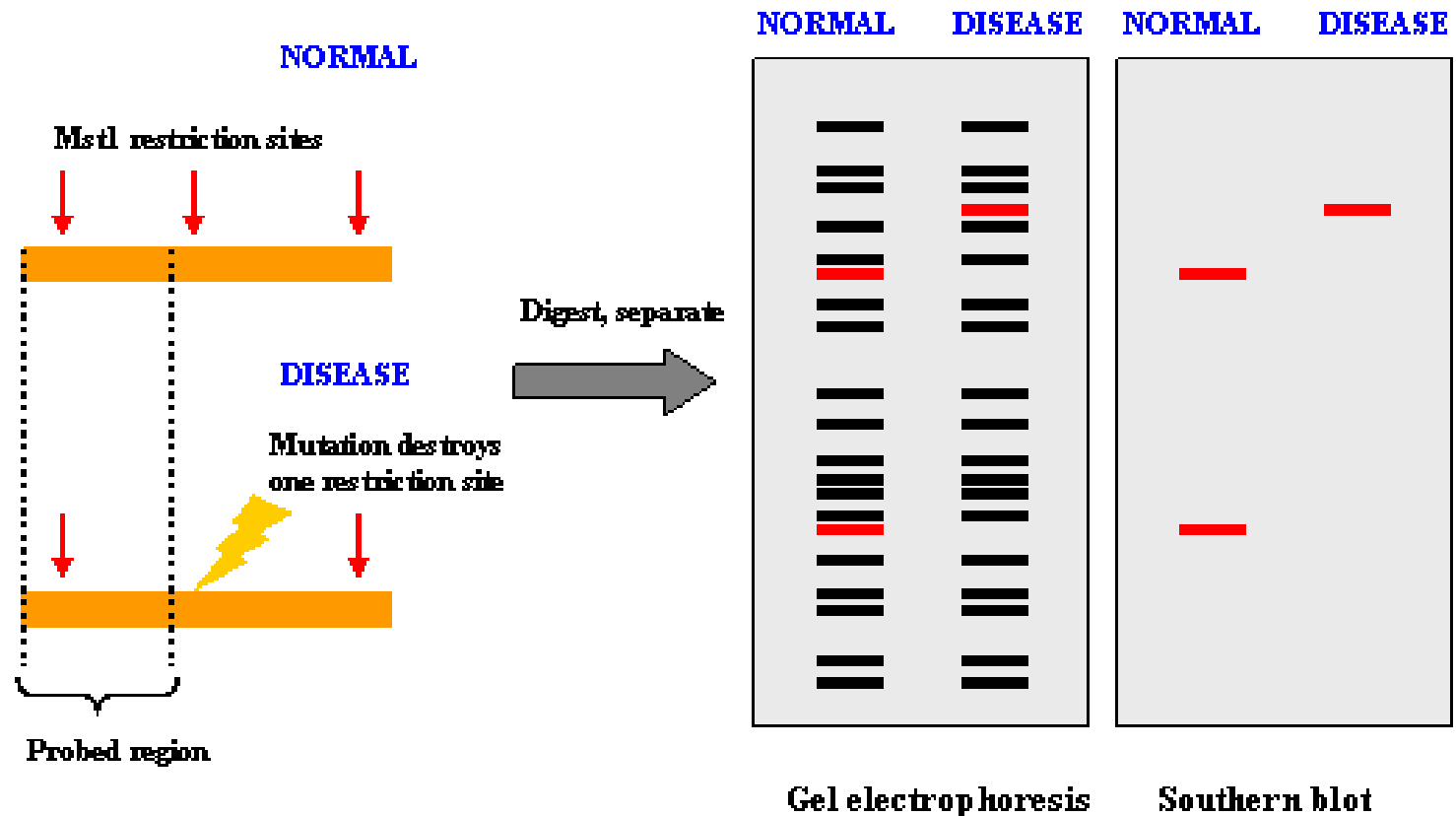


Polimorfizmusok azonosítása, RFLP

- **RFLP**: restriktációs fragmens hosszúság polimorfizmus (*restriction fragment length polymorphism*)
- Az egyes szekvenciaváltozatok létrehozhatnak vagy eltörölnek egy restriktációs endonukleáz hasító helyet, így különböző hosszúságú fragmensek keletkeznek hasítás után
- Leginkább betegségek nyomon követésére használják (pl. sarlósejtes vérszegénység)
- Relatív nagy mennyiségű DNS mintát igényel nagy tisztaságban

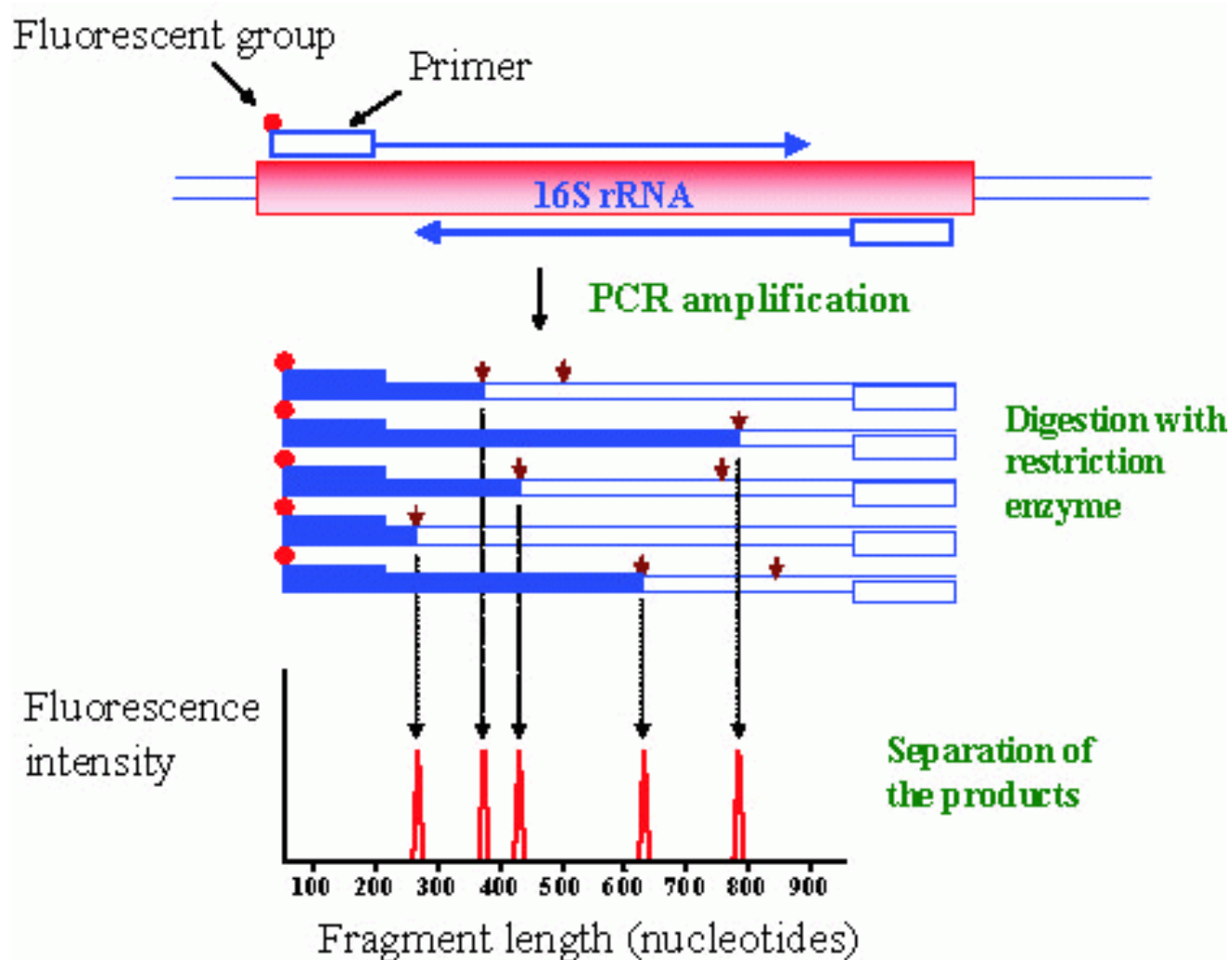
Polimorfizmusok azonosítása, RFLP

1. Kimutatás: Southern blot: próba szükséges, fragmentek röntgenfilmen / fluoreszcensen láthatóak



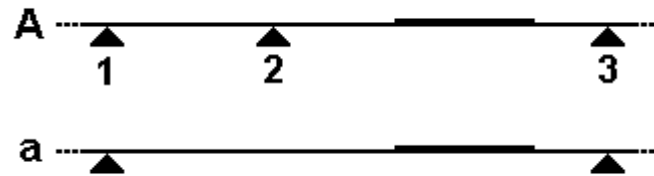
Polimorfizmusok azonosítása, RFLP

2. Kimutatás: PCR, fluoreszcensen jelzett PCR primerrel

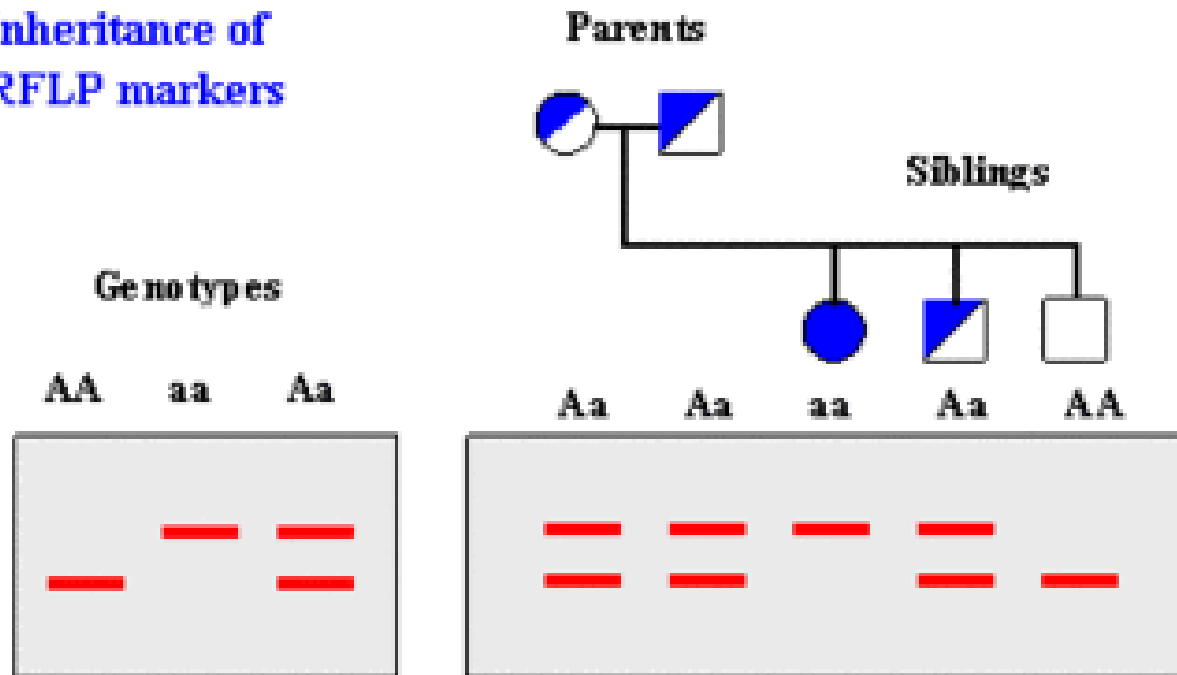


Polimorfizmusok azonosítása, RFLP

RFLP markerek alkalmazása pl. betegség-kapcsolt allélek azonosításában



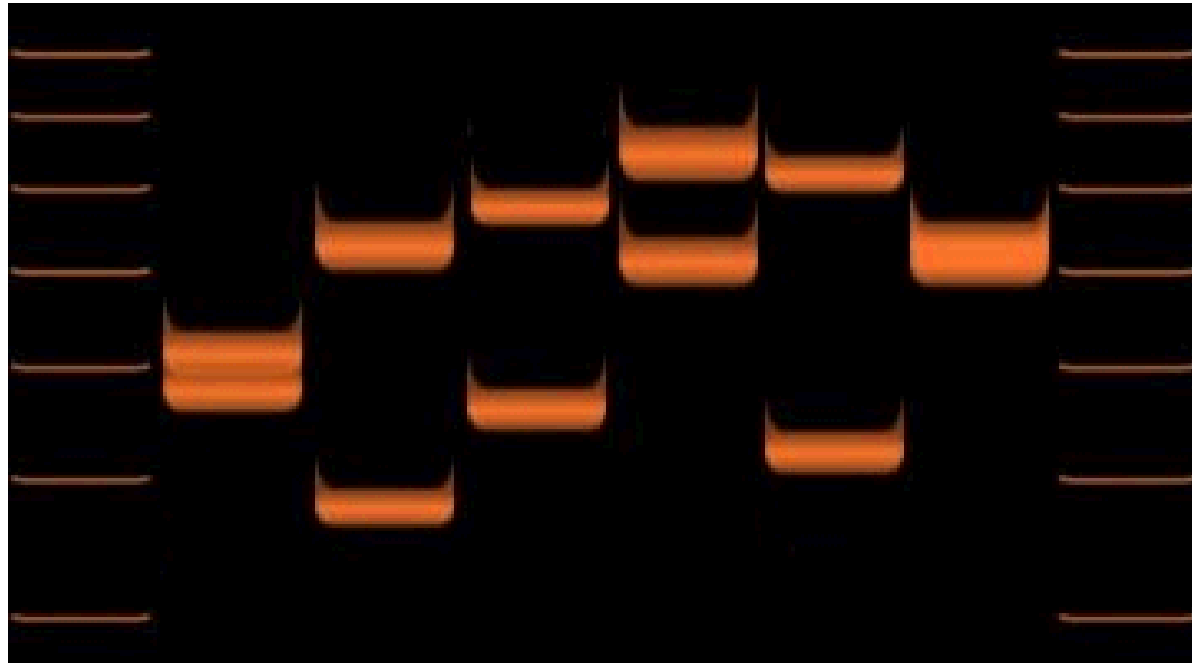
Inheritance of RFLP markers



Polimorfizmusok azonosítása, VNTR/STR

- Egyének azonosítására olyan kromoszómarégiók alkalmasak, melyek hiperpolimorfak (a populációban sok variációja előfordul)
- Az ismétlődések (VNTR/STR) száma polimorf. Az ismétlődések eltérő száma sok eltérő hosszúságú allélt eredményez két hasítóhely, vagy primerek által kijelölt rész között
- Mivel az ismétlődések száma sokkal változatosabb lehet (n tetszőleges), mint RFLP-nél (van hasítóhely vagy nincs), ezért sokkal alkalmasabb a személyazonításra

Polimorfizmusok azonosítása VNTR/STR



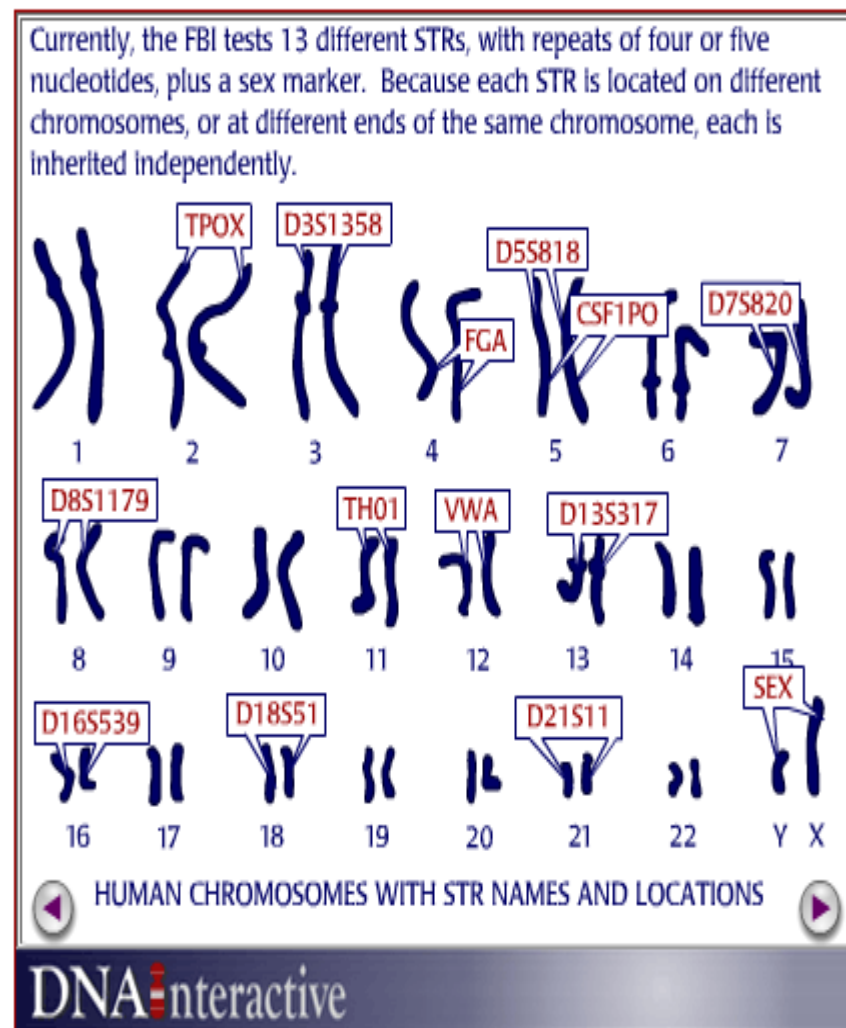
VNTR variációk 6 emberből vett mintában (1 markerre)

Polimorfizmusok azonosítása, VNTR/STR

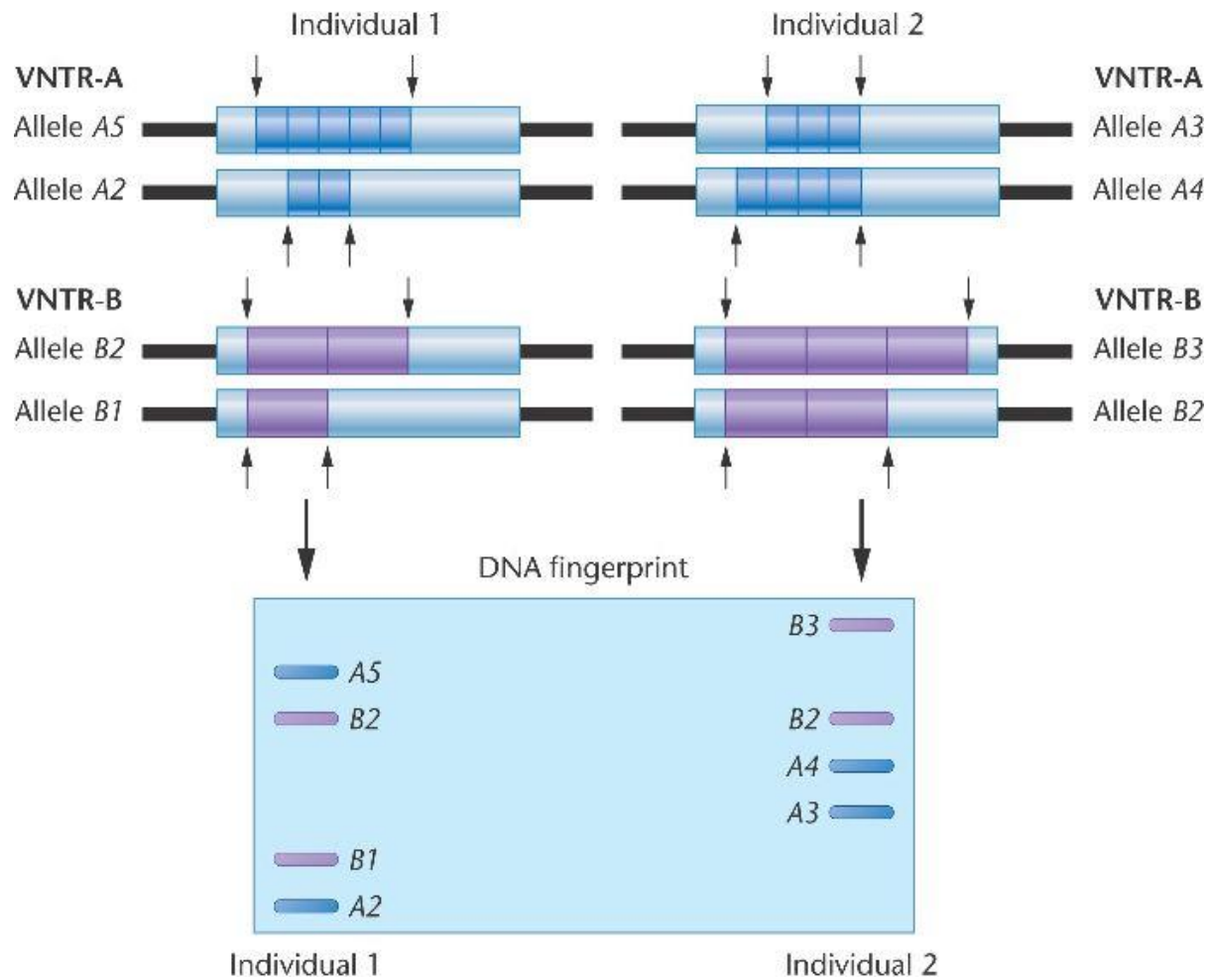
- Több VNTR/STR együttes vizsgálatával egy egyén kiléte 99%-os valószínűséggel megmondható
- Több marker együttes vizsgálata: több restrikciós enzimmel, több PCR primerrel
- STR előnye, hogy rövid ismétlődés miatt PCR-rel jobban amplifikálható a szakasz - kevés vagy roncsolt DNS-ből is nagyobb valószínűséggel lehet eredményt elérni
- VNTR-nél gyakran hasítást alkalmaznak a hosszabb ismétlődő elemek miatt, előnye, hogy stabilabb, azaz kevésbé valószínű, hogy hirtelen megváltozik

Polimorfizmusok azonosítása, VNTR/STR

- Sokkal gyorsabb, olcsóbb, megbízhatóbb, mint a RFLP
- Kis mennyiségű minta is elegendő
- Nem igényel nagy tisztaságot sem
- Ma már szinte kizárólag ezt alkalmazzák személyek azonosítására
- A vizsgált markerek száma országonként változhat



Polimorfizmusok azonosítása, VNTR/STR



Kimutatása akár restrikciós nukleázzal való hasítással / Southern blottal, akár PCR-rel, CE, MS

DNS profil / DNS ujjlenyomat

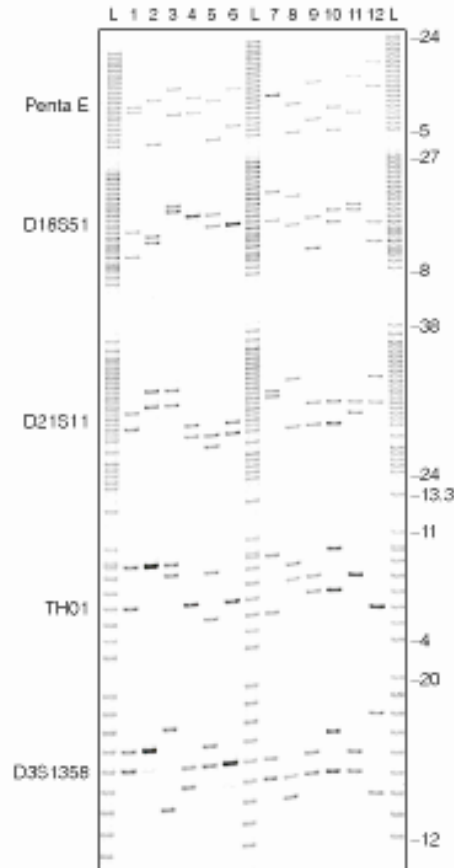
- VNTR\STR adott hipervariábilis régiókban
- Multiplex PCR: az ujjlenyomat összes régióját egyidejűleg amplifikálják
- Többféle panel van, Magyarországon az USA-ban is alkalmazott CODIS-t használják, ami **13 lókuszon található STR-eket vizsgálja** (UK SGR+, 10 lókusz)
- Bár az elvi statisztikai valószínűség akár 10^{18} is lehet, a valóságban ez jóval kisebb - a DNS ujjlenyomat önmagában nem megdönthetetlen bizonyíték, mindig csak egyéb bizonyítékokkal, egyéb körülményekkel összevetve fogadható el.

DNS profil / DNS ujjlenyomat

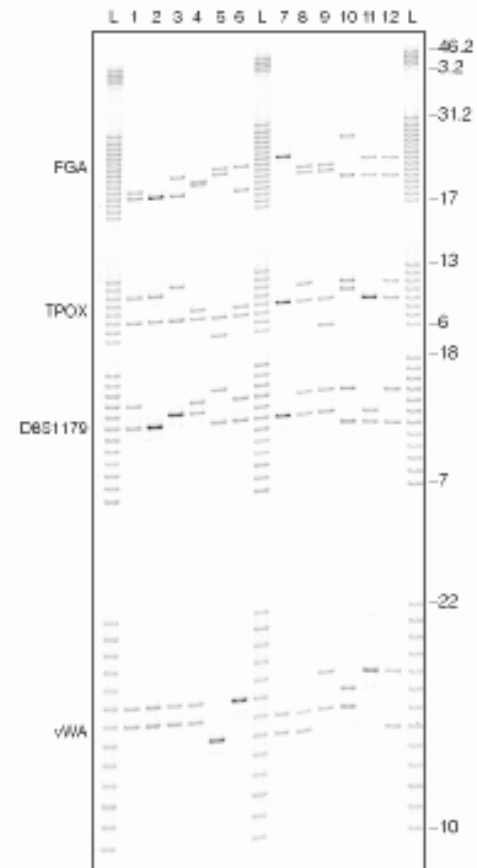
A.



B.

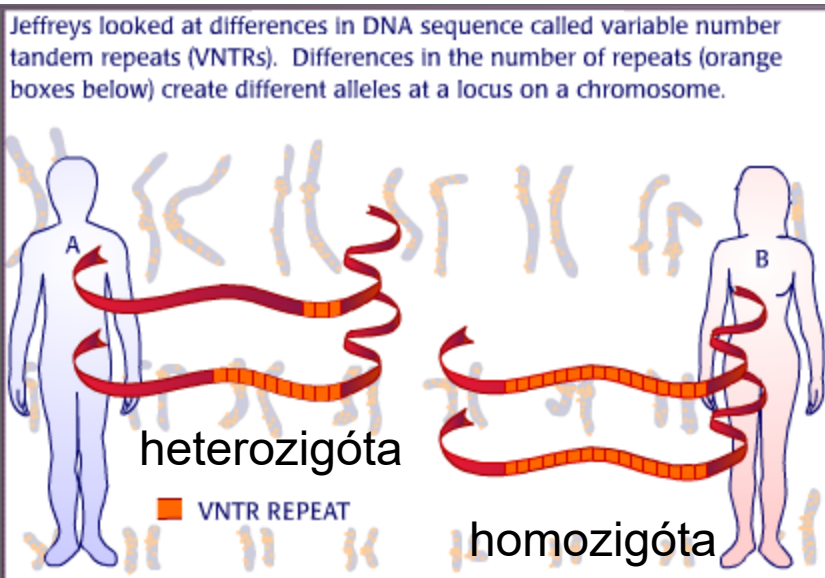


C.

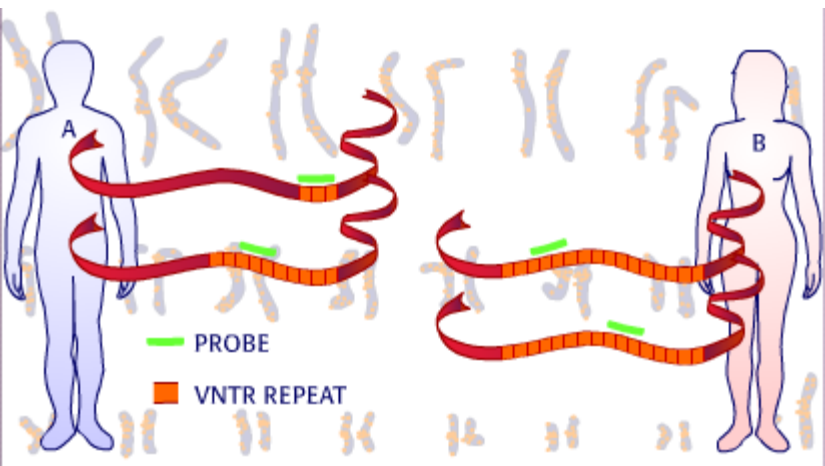


DNS profil / DNS ujjlenyomat

1



VNTR polimorfizmus egy adott kromoszómaszakaszon különböző allélokat eredményez

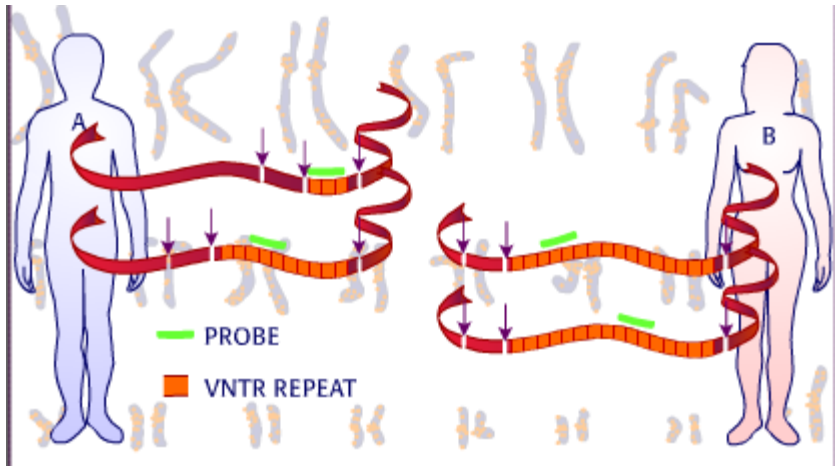


Próba DNS képes a VNTR-hez kötni (single / multi-locus fingerprint)

2

DNS profil / DNS ujjlenyomat

3



Restrikciós endonukleázzal kezelve különböző hosszúságú – próbával hibridizált szakaszokat kapunk

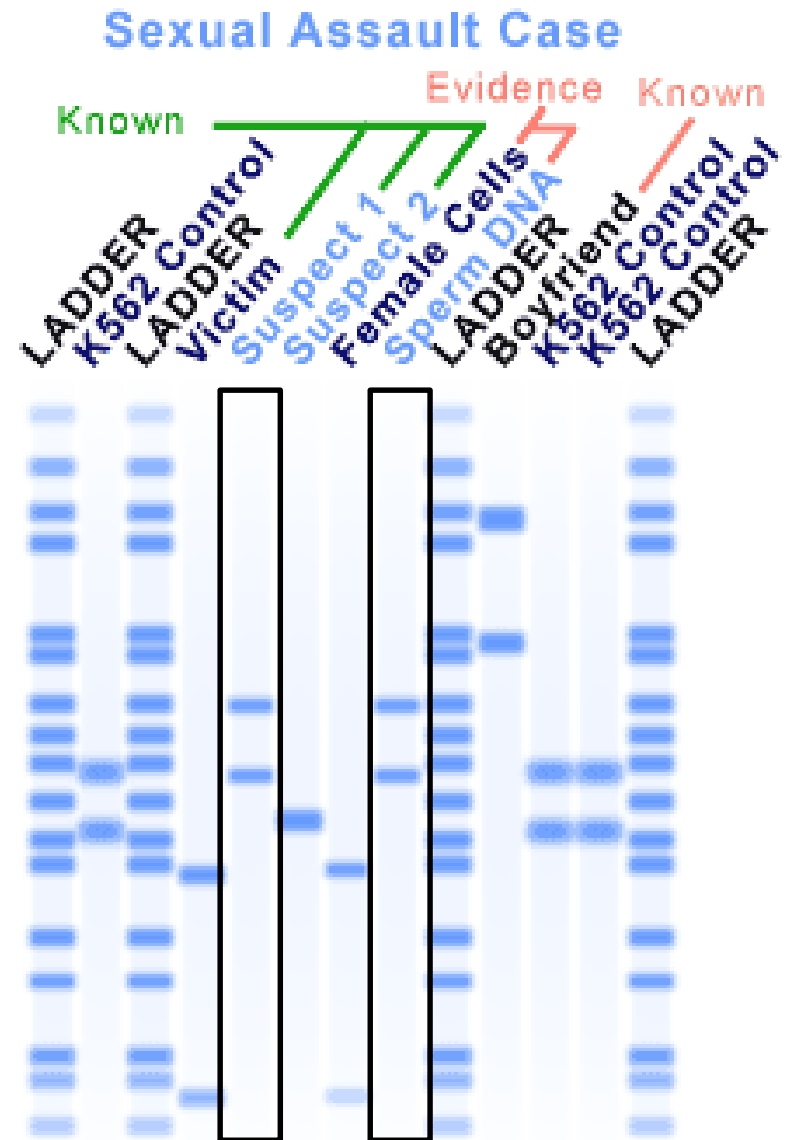
13 VNTR- szakasz kezelése után a kapott fragmenseket méret alapján elválasztják = DNS profil

4



Nemi erőszak

Melyik gyanúsított DNS-e azonosítható a hüvelyi mintából?

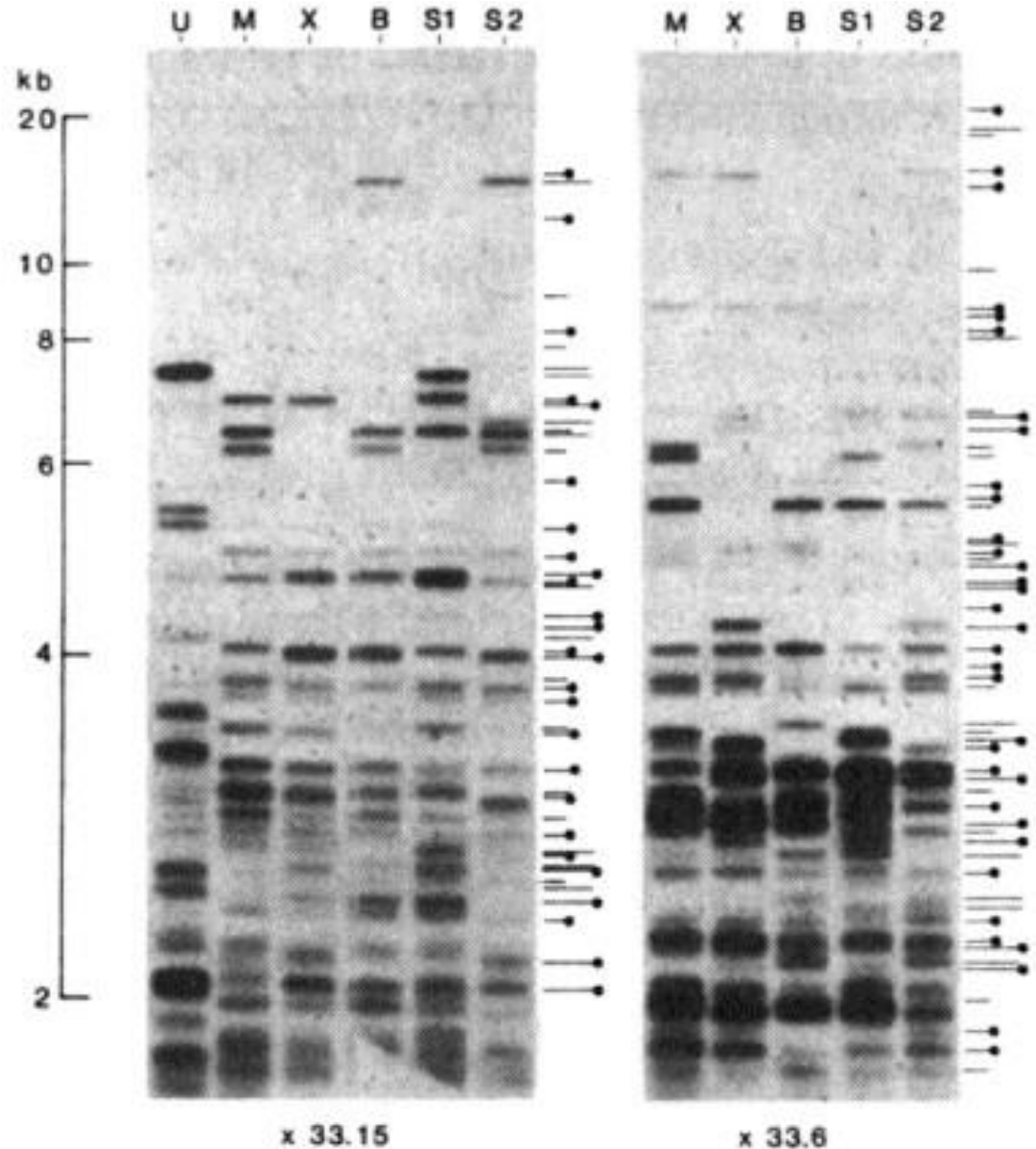


Rokonság

Sharbah család

Jelölés

- U – nem rokon minta
- M - anya
- B - fivér
- S - lánytestvér
- X – azonosítandó személy
- Rövid vonal - anya
- Hosszú vonal - apa
- "Fakanál" - X
- Családhoz tartozik-e X?



Esettanulmányok

Esetleírás 1

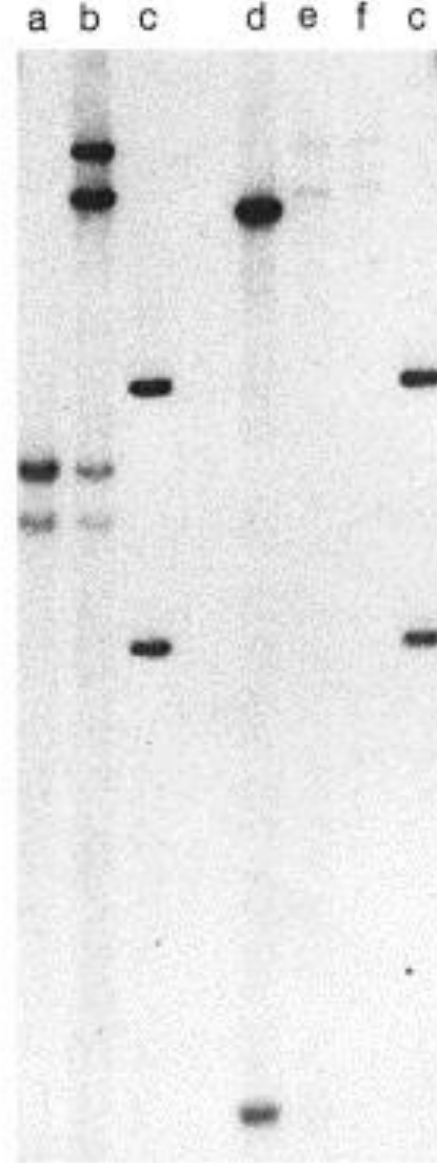
- 1983-ban megerőszakoltak és megöltek egy nőt
- A helyszínen talált sperma alapján akkor csak a vércsoportra tudtak következtetni
- 1986-ban hasonló bűncselekmény történt, a sperma alapján ugyanaz a vércsoport adódott
- A rendőrség által gyanúsított férfi bevallotta a második gyilkosságot, de az elsőt nem

Nemi erőszak – esettanulmány 1

Jelölés

- a - áldozat1 vérminta
- b - áldozat1 hüvelyi minta
- c - gyanúsított
- d - áldozat2 vérminta
- e, f - áldozat2 hüvelyi minta
- Lehet-e a gyanúsított a tettes?
- Milyen egyéb információt tudhatunk meg?

A spermaminták alapján megállapították, hogy a két gyilkosságot ugyanaz az ember követte el, de egyik sem a gyanúsított!!!!



Esettanulmány 1

- A környezet összes férfilakosától vérmintát vettek, kiszűrték az elkövetőre jellemző vércsoportú egyéneket
- 5000 minta DNS profilja alapján nem találtak egyezést
- Megtudták, hogy egy férfi a neve alatt más mintáját adta le (véletlen)
- A férfi DNS profilja egyezett a helyszínen talált mintával



Esettanulmány 2

State of Florida vs. Jones and Reesh, Murder at Rodman Dam, 1988

In July, 1987, Randall Scott Jones and Chris Reesh, both in their teens, went target shooting with a .30-30 hunting rifle in the Rodman Dam recreation area in Florida. While they were shooting, Jones' pickup truck became stuck in a sand pit. A fisherman suggested they ask a couple in a pickup parked nearby for help.

Jones and Reesh approached the truck, where Kelly Lynn Perry and her fiance, Matthew Brock, were sleeping. The two men debated whether or not to wake them to ask for assistance.

The following morning, fishermen found the bodies of Perry and Brock in the woods adjacent to the recreation area. Police investigation revealed that each had been shot in the head with a .30 caliber bullet and that Perry had been sexually assaulted. Their pickup was reported stolen.

In August, Jones was arrested in Mississippi, found driving Brock's pickup. Reesh was arrested the next day in Palatka, Florida, after Jones told police that they were together that night in July. Both were indicted on counts of first-degree murder and sexual battery.



Randall Scott Jones

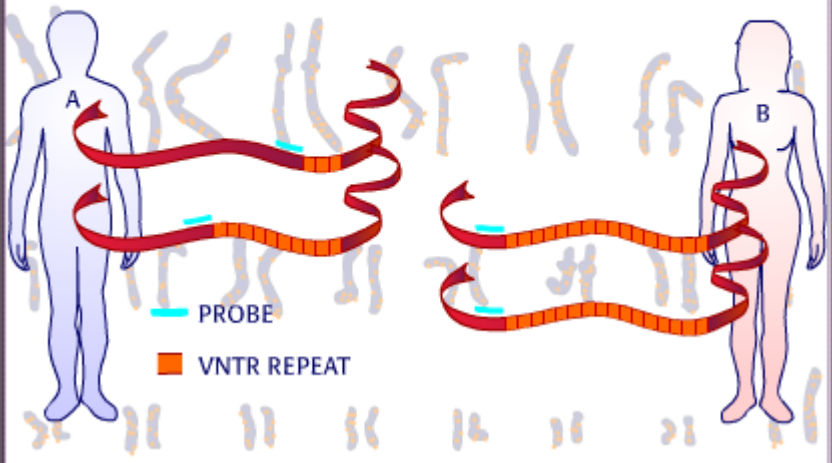


Chris Reesh

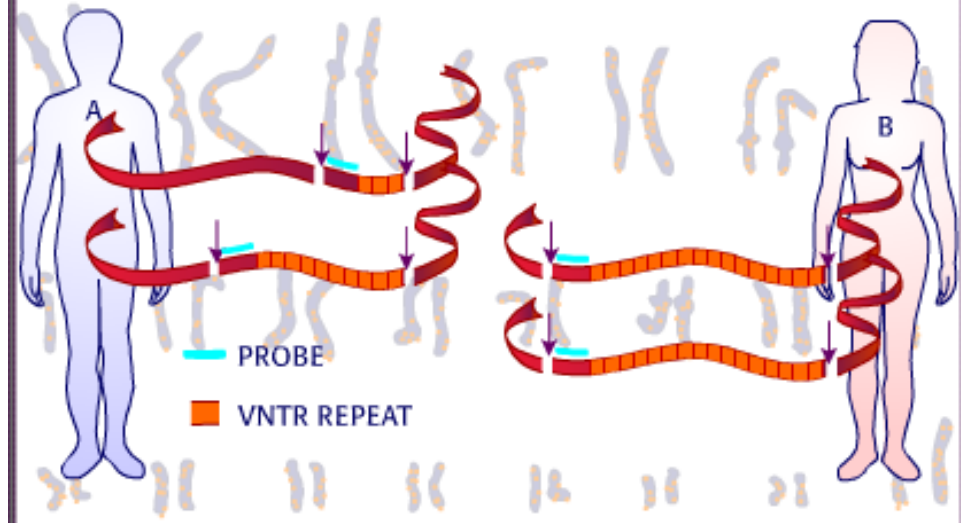
Single locus probe

Esetleírás 2

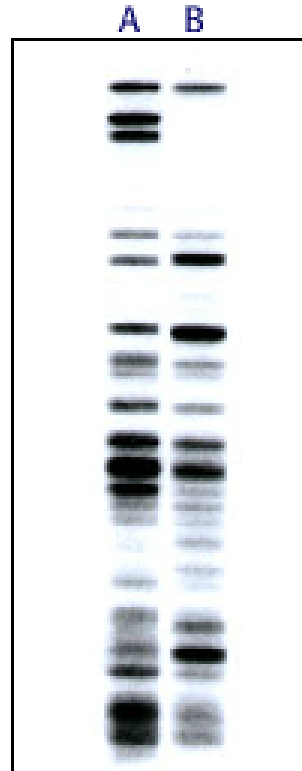
In 1987 a group at the University of Utah identified the VNTR locus named D1S80 on chromosome 1. Their probe, which binds to the *unique* sequence just *outside* of the repeated structure, is termed a single-locus probe.



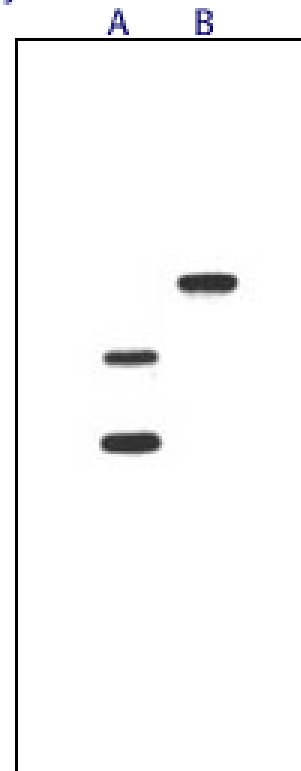
A restriction enzyme that cuts at specific sites on either side of the D1S80 locus creates fragments that correspond to the different numbers of repeats in VNTR alleles.



In comparison with Jeffreys' multilocus fingerprints, single-locus fingerprints can be interpreted unambiguously, and the frequencies of different alleles can be determined precisely.



MULTILOCUS
FINGERPRINT



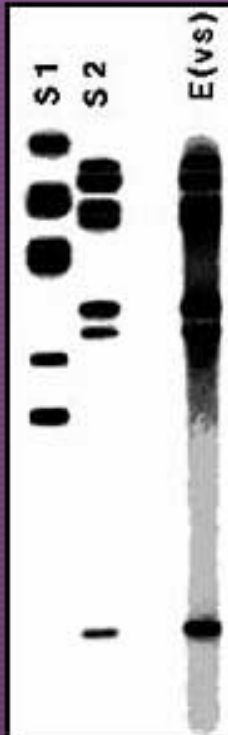
SINGLE-LOCUS
FINGERPRINT

Esettanulmányok

Esetleírás 2

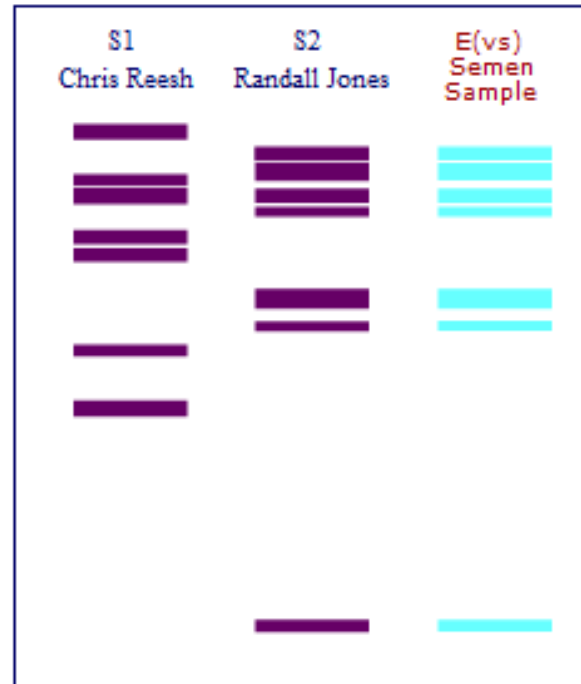
A laboratory that specializes in DNA fingerprint testing extracted DNA from a semen sample, E(vs), retrieved from Perry's body, and blood samples from Reesh, S1, and Jones, S2.

The lab used a cocktail of single-locus probes to produce the DNA fingerprint seen at right.



Single-locus probe DNA fingerprint.
Source: Cellmark Diagnostics.

To compare the semen sample DNA fingerprint, E(vs), with the others, drag the fingerprint to the left. E(vs) will slide and overlap with Reesh's and Jones' DNA fingerprints.



Esettanulmányok

Esetleírás 2

A representative from the DNA fingerprinting laboratory testified that the chance of another person having the same DNA fingerprint as Jones was one in 9,390,000,000.

After deliberating only 30 minutes, the jury convicted Jones of murder and rape. The judge sentenced him to a double death sentence, making this the first case involving DNA fingerprint evidence in U.S. legal history in which the death sentence was handed down.

■ PALATKA, FLORIDA, FRIDAY, MARCH 25, 1988

254

Jones found guilty

By BETH HICKMAN/STAFF
Palatka News Staff

Raymond Earl Jones, 38, was found guilty Thursday of the premeditated murders of a Palatka couple at the Holmes Forensic Institute area last summer.

The 12-member jury returned verdicts of guilty on charges of two counts of first degree murder, one count of burglary, one count of shooting into an occupied vehicle and one count of sexual battery. The jury deliberated 30 minutes before returning the verdicts.

Circuit Judge Robert Perry, who presided over the two-day trial, ordered the jury to return Monday or make certain a more substantial act of death is the state's choice than in a life sentence for Jones. State Prosecutor Eric McLeod said Thursday afternoon he plans to ask for the death penalty.

"Of the matter, McLeod said, "I think it was the only verdict they could return based on the evidence and the law." He added, the one

and "Jones is being sent back but it does give them (the victims' families) what we can, and that is justice. I'm happy for the families."

Jones is a defendant has admitted to killing Kelly Lynn Perry and Matthew Paul Brock in the early morning hours of July 27 as they slept in Brock's truck at the Holmes Forensic Institute area parking lot. In a statement read to the jury, Jones said he debated several times of either waiting the night to get his car out of the yard or killing them and taking the truck.

Brock was shot twice in the head and Perry was shot once in the head. Their bodies were then dragged into the nearby woods. After using the truck to pull his car free, Jones returned to the vehicle and raped Perry before fleeing to Homestead.

Howard Pratt, of the Public Defender's Office, had asked the jury during his closing argument Thursday to lessen the charges to second-degree murder for which Jones could have been sentenced 20 to 30 years in prison. He said Jones did not deserve to be found guilty of first-degree murder because he did not believe Jones knew what he was doing at the time of the murder and had no intention to kill the couple.

Perry, who tested his own witness presenting all evidence, said that facts given to the jury of his doubts were what his wife was told from Jones' testimony.

"These killings are heinous, beyond understanding... We can see his troubled background and it is evident to the area."

Perry added that because Jones had confessed to the crime and entered a statement that his confederate had killed the couple that "there is something good something of value in this crime."

But McLeod sharply disagreed. He repeatedly used the word "evil" to describe Jones' actions.

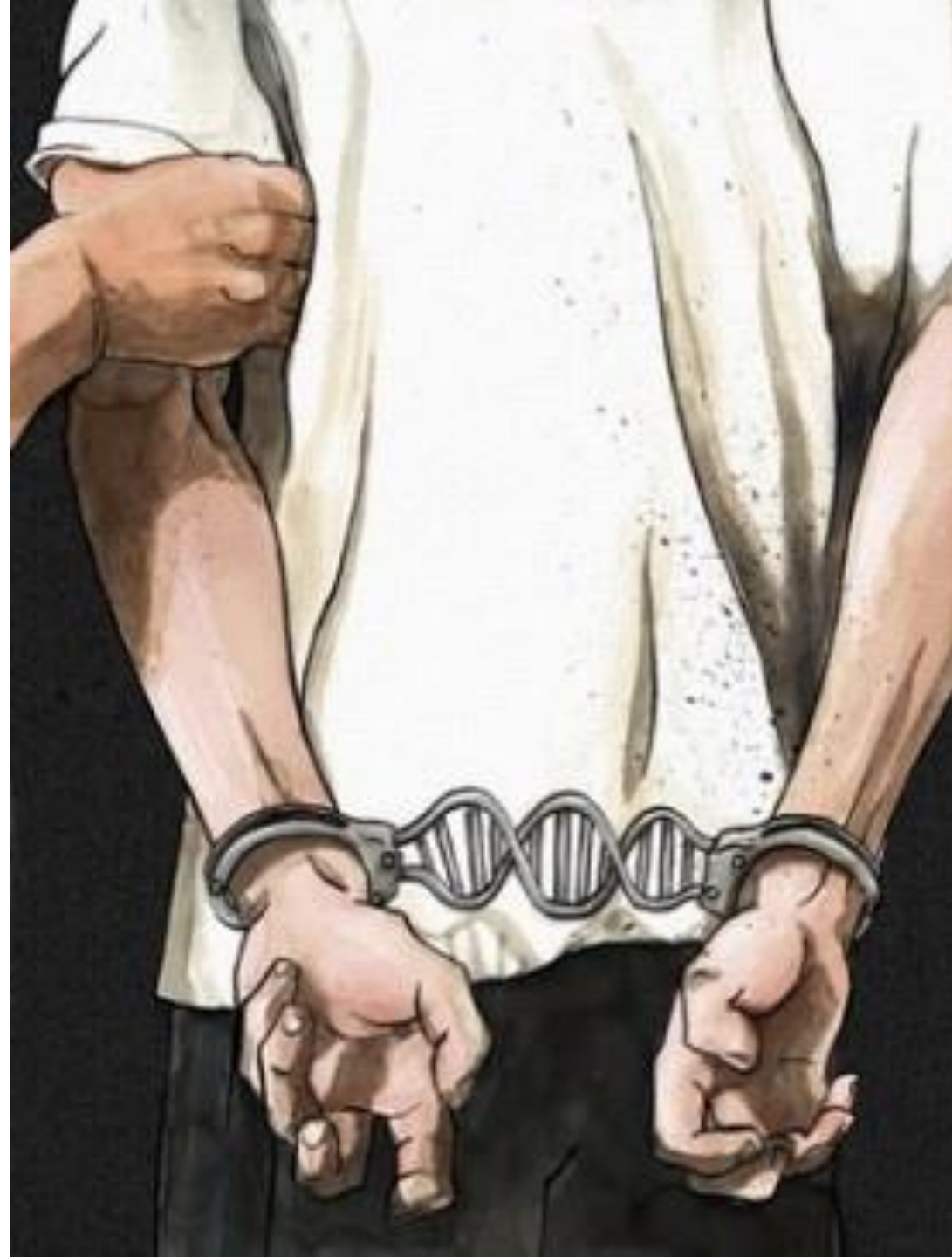
"Every fact in this case and the testimony of the defendant show he decided to kill those two people."

See GUILTY on Page 12A

with that statement. "The defendant was cooperative because he just doesn't give a damn what he did or anyone in court about justice this."

Jones is 5-11, 170 pounds, black, single, born in 1950. He is represented by Palatka attorney Paul Rutledge, who was appointed by the court.





Mitokondriális DNS

- Mivel anyai ágon öröklődik csak (matrilineáris), és kevésbé változatos, személyazonosításra elsődlegesen, önmagában nem alkalmas
- Rokon mintákkal együtt használható azonosításra
- Roncsolódott minták esetén: pl. katasztrófa áldozatainak azonosítása, ha csak haj, csont, fogdarab áll rendelkezésre
- Csak lányokon keresztüli leszármazási viszonyok, viszont a fiúkban is jelen van (viszont a fiúkkal megszakad a továbbítás)

Y-kromoszóma

- Apai ágon öröklődik csak (patrilinéáris)
- Legnagyobb része a meióziskor nem tud párba állni, nincs rekombináció
- Ez a szakasz csak mutációval változhat, sok generáción át változatlan
- Csak fiúkon keresztüli leszármazási viszonyok

Őstörténet

- Az Y-kromoszómát és az mtDNS-t nem variálja egyfolytában a rekombináció
- Csak másolási hibából adódó mutáció lehet
- A mutációs sebesség adott
- Mutációs mintázatok – haplotípusok
- Mitokondriális Éva, Y-kromoszómás Ádám
- mtDNS-sel könnyen lehet tévútra menni (kéne tudni az egész populáció mtDNS-ét, főleg a ffiak vándoroltak, nőket rabolták, eladták, politikai házzasságok stb)