

Igazságügyi Genetikai vizsgálatok

Lencse Zsófia

A diasort készítette: Kovács Áfonya és Lencse Zsófia

Nemzeti Szakértői és Kutató Központ

DNS – összehasonlító vizsgálati módszer

Helyszíni minták:

Minta gyanúsítottól

Egyezés?

Rokonsági
kapcsolatok?

sértettől, eliminációs
(kizárási) minták:

Jogi szabályzás miatt
csak nem kódoló régiót
vizsgálhatunk →
fenotípusos infó nincs

DNS-profil nyilvántartás
(ismert személyek kivételével)

Hátrány : bizonyos infó
elvéstése
Előny: variabilitás →
szelektivitás



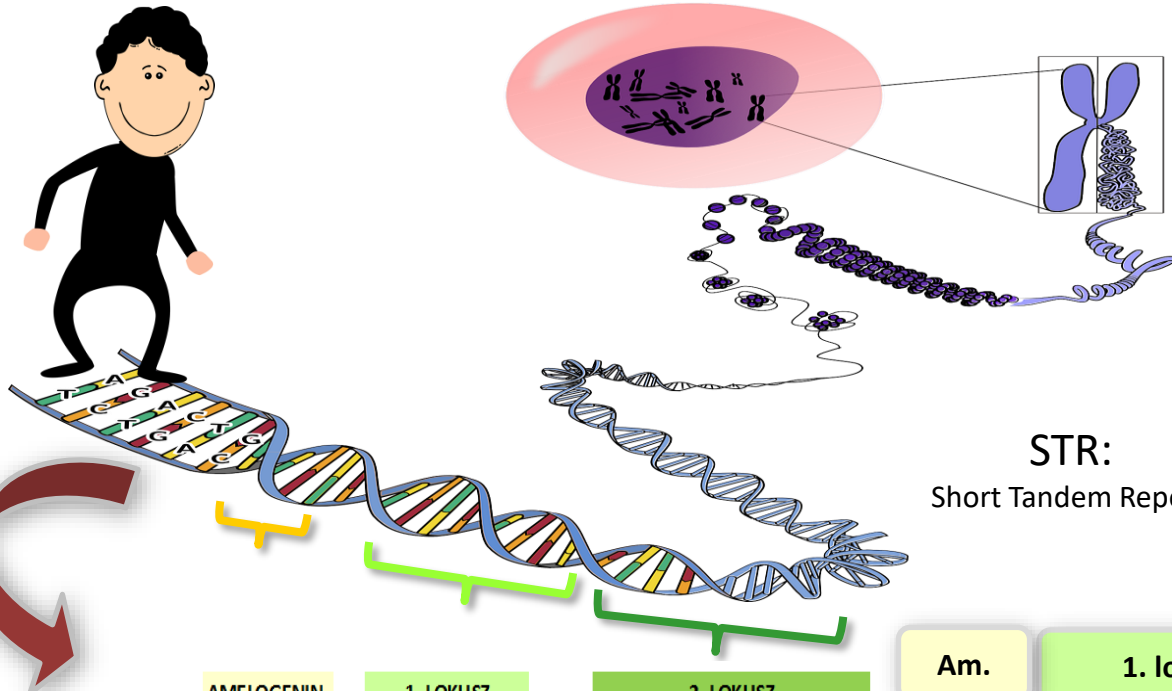
Azonosítatlan
személyek,
holttestek:

Egyezés?

Rokonsági kapcsolatok?

Eltűnt személyek
mintái:

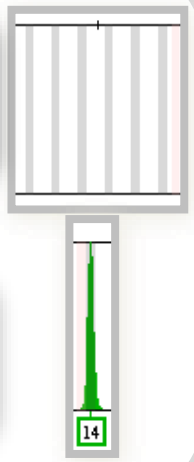
Személyes tárgyáról,
vagy
Rokonok mintái



STR:
Short Tandem Repeat

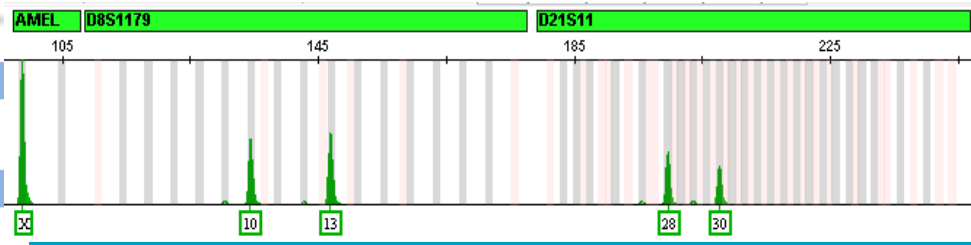
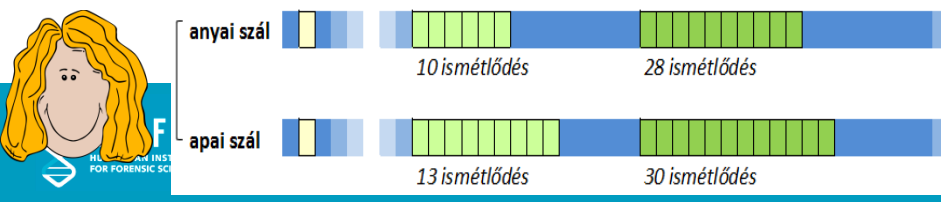
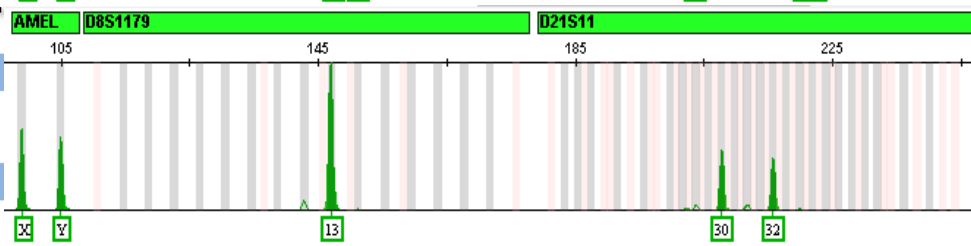
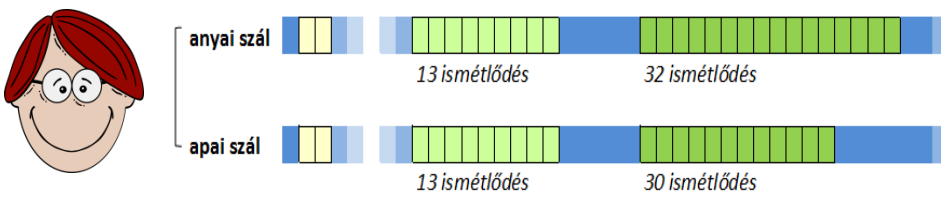
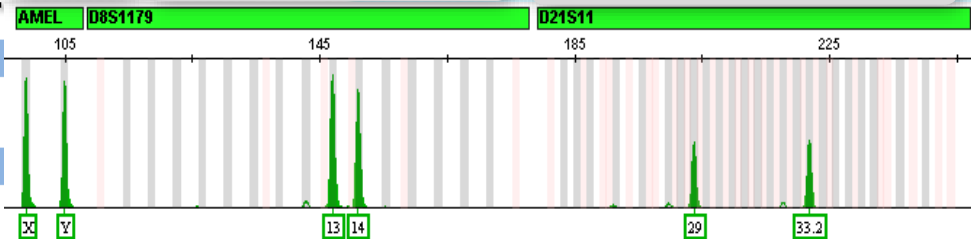
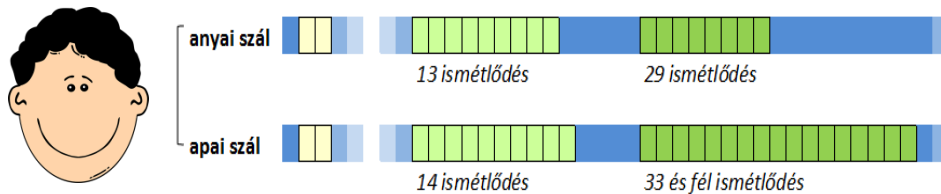
Lehetséges allélok
(tulajdonságok)

Kimutatott allél(ok)
1 anyai + 1 apai
lokuszonként



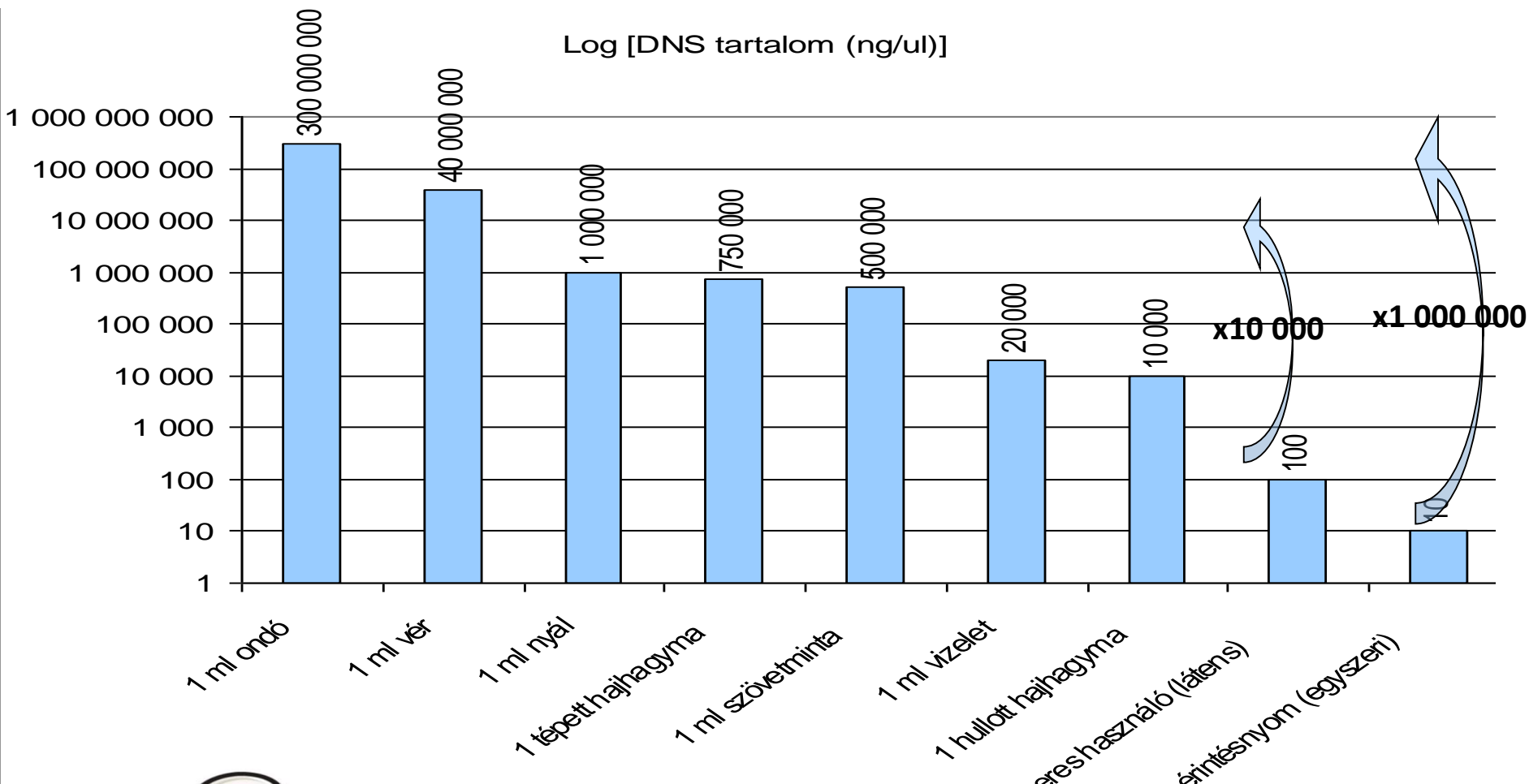
AMELOGENIN 1. LOKUSZ 2. LOKUSZ

Am. 1. lokusz (hely) 2. lokusz (hely)



hordozók, szövetek DNS tartalma

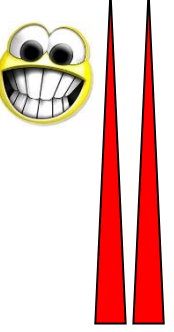
Log [DNS tartalom (ng/ul)]



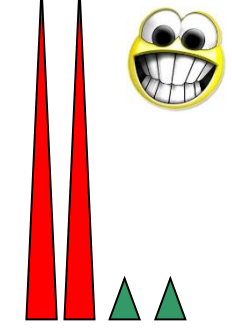
Kb. 6-7 pg DNS/sejt

Keveredési arányok

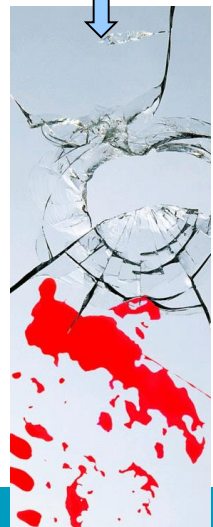
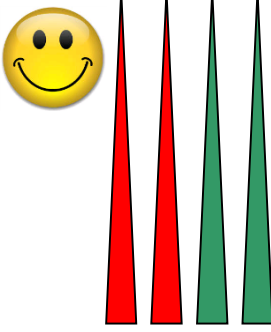
piros: gyanúsított
zöld: egyéb személy



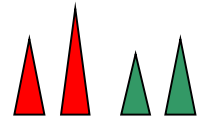
~ 1
egy-
személyi
gyanúsít-
totti

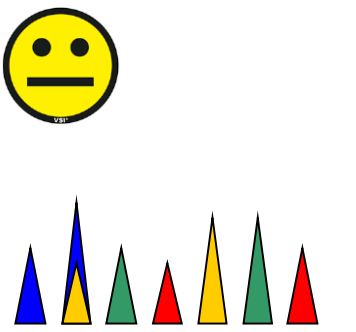
~ 10:1
gyanúsított
vér +
érintésnyom
(=látens)

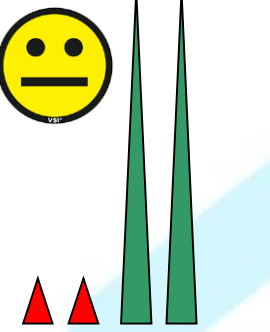
~ 1:1
gyanúsított
vér
+
vér

~ 1:1
gyanúsított
érintésnyom
(=látens) +
érintésnyom
(=látens)



~ 1:1:1:1...
érintésnyom (látens)
sok személytől, köztük
a gyanúsítottól

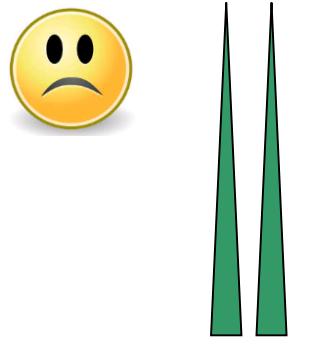
~ 1:10
gyanúsított
érintésnyom
(=látens)
+ tárgy rendszeres
használója



sértetté



~ 1:10
gy. érintésnyom
(=látens) + vér

~ 1:100
gy. érintésnyom
(=látens) + vér

Honnan vegyünk mintát?

Vizsgálat Ultra Viola fényben

Fluorescencia

Absorbancia



Kémiai vérelőpróbák

Benzidin

Hemoglobin „pseudoperoxidáz” aktivitásán alapszik

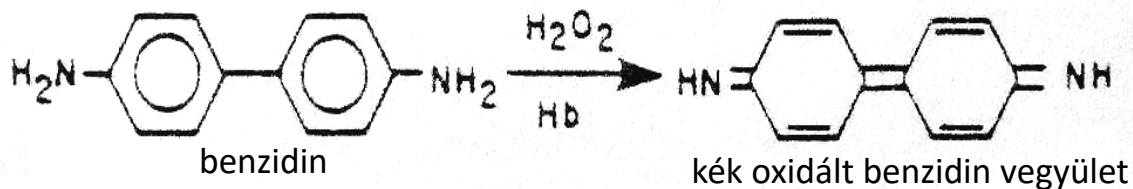
pillanatszerű **sötétkék színreakció**

preparálás: benzidin + ecetsav + etanol + 3% H₂O₂

érzékenység: **1 : 300 000 – 500 000**

Karcinogén, **gátol**

fals pozitív reakciók; nem specifikus humán vérrre!



Luminol:

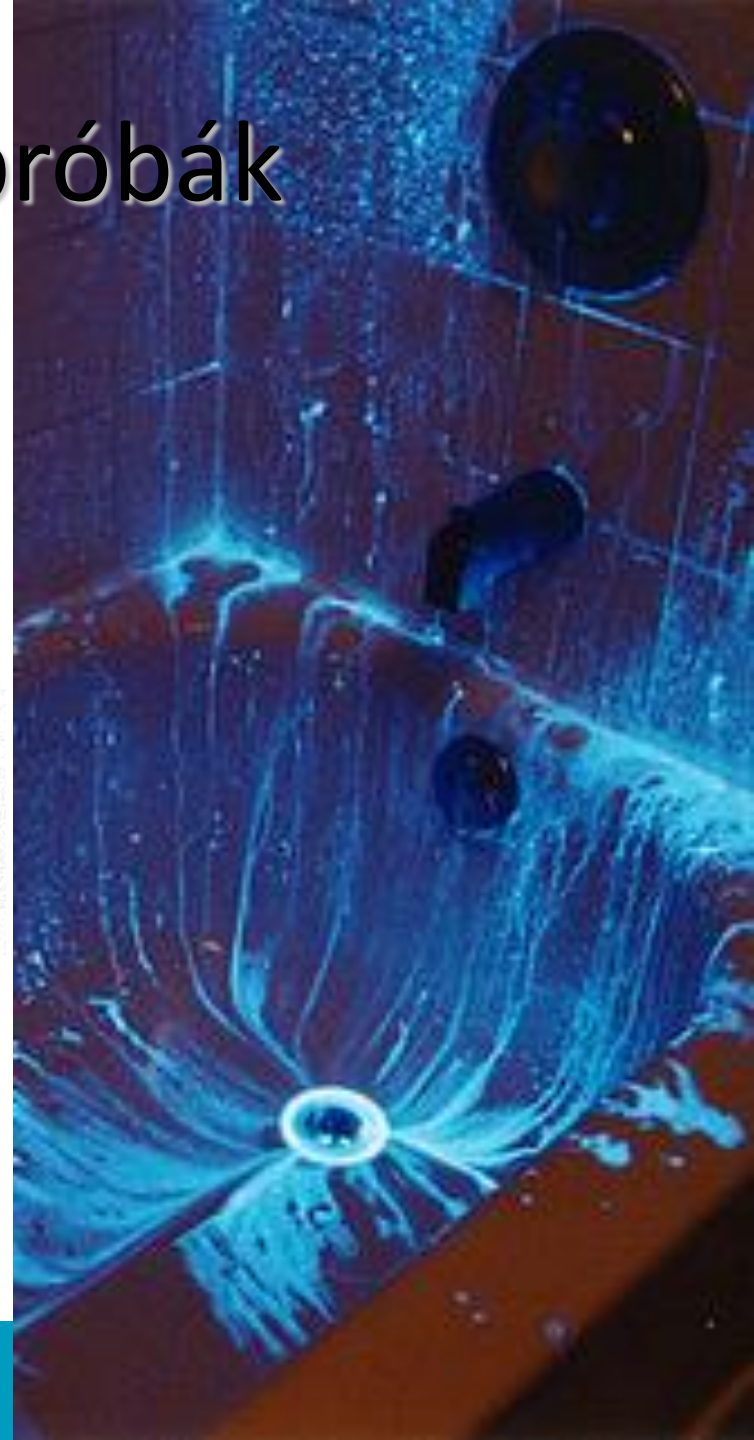
chemilumineszcens reakció: vér esetén kékes-fehér

fény – a vas katalizálja a reakciót, amiben gerjesztett aminoftalát keletkezik

preparálás: luminol + Na₂CO₃ + H₂O₂ v. Na₂BO₄

utólagos **DNS vizsgálatot nem befolyásolja**

érzékenység: **1 : 5 000 000**



Nyál kimutatása

Nyál α -amiláz keményítő bontó enzim kimutatása:

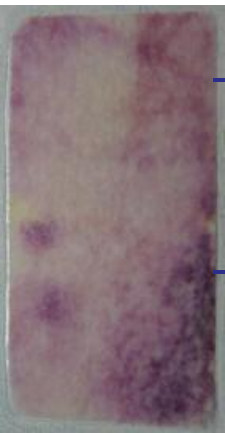
- a nyál szárazanyagtartalmának 60%-a amiláz mucin
- egyéb biol. anyagban is (vérszérum, tej, ondó, hüvelykenet, verejték, széklet, de igen kis mennyiségben!!!)

Phadebas amylase teszt: nem vízdékony keményítőhöz kötött kék festékanyagot tartalmaz. Amiláz jelenlétében a keményítő bomlása miatt a kék festék felszabadul, az oldatot kékre színezi.



Ondó, spermium kimutatása

- Ejakulátum alkotók: foszforil-kolin, *savanyú-foszfátáz*, citromsav, fruktóz, spermium (kivéve sterilitás esetén)
- **Savanyú-foszfátáz (ACP) vizsgálat:**
- alifás és aromás **ortofoszforsav-észtereket hidrolizálja** gyengén savanyú (pH=5) közegben
- az enzim nagyságrendekkel nagyobb koncentrációban van jelen az ondóban (prosztata eredetű), mint egyéb testvázadéokban (pl. hüvelyváladék)
- érzékenység 1 : 1000
- **nem specifikus!**
- a savanyú foszfátáz az alfa-naftil foszfátot hidrolizálja, a keletkező naftol reagál az o-dianisidinnel, ennek következtében egy **lila színű festék szabadul fel**
- **Phosphatesmo KM** tesztcsík



Immunológiai tesztek

Ondó és spermium teszt:

PSA=Prostata specifikus antigénre specifikusak (prosztatában termelődik, ondóra specifikus kiv. prostata daganatban szenvedő férfiak (vér, vizelet),

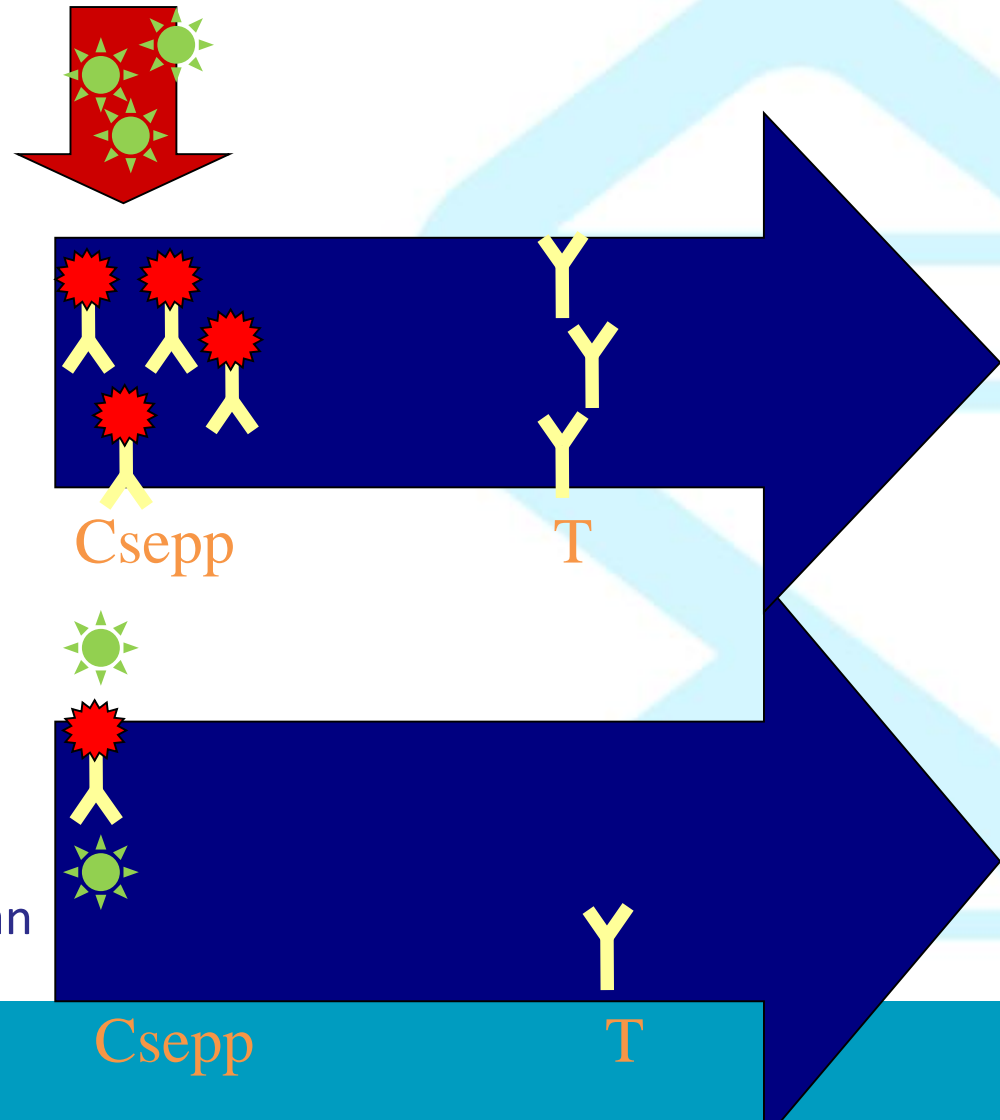
Semelogeninre specifikusak

Azoospermiás ondó (férfiak 1-9 %-a) kimutatása!

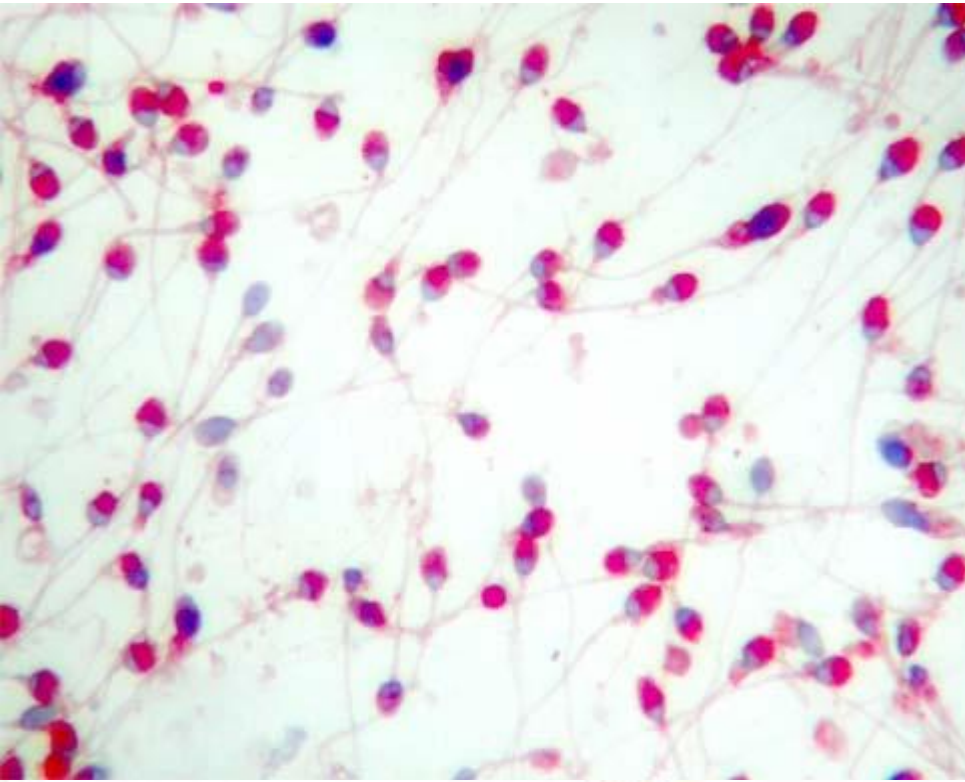
Vérteszt: Hemoglobinra specifikus (pl. Hexagon OBTI)

Terhességi teszt: hasonló elv

Hook-effektus: fals negatív, ha túl sok jelölendő, mert a testcsíkra sok olyan köt, ami nem kötött színanyagot



Festett kenet



Kernechtrot-Picroindigocarmin (ALSO4, Nuclear Fast Red, Pikrinsav, Indigókármin)
(balra)

Sperm Hy-liter (Fluorescens)
(lent)



A DNS vizsgálat folyamata



DNS felszabadítása

lineáris folyamat, egymásra épülő lépések

SEB – SDS

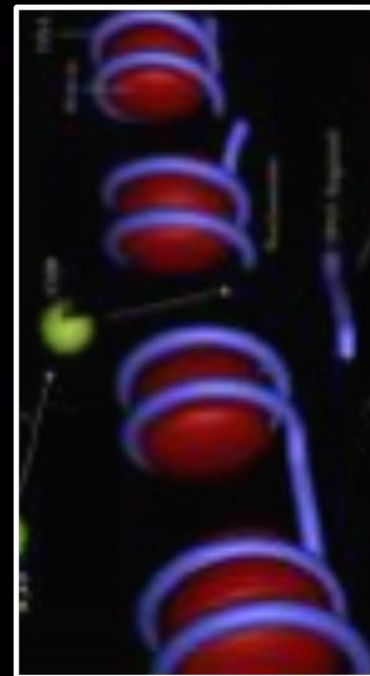
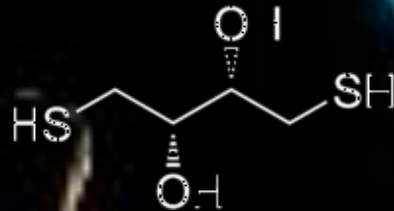
sejthártya felszabadítása (hétköznapi: mosószer) U.a.
mint a lízis puffer

Proteinase K

sejtet körülvevő ill. DNS-t rögzítő fehérjék emésztése,
kicsapása (hétköznapi: húspuhító enzim)

DTT Dithiothreitol

diszulfid hidakat tartalmazó fehérjék bontása –
spermiumokban, hajban van ilyen



Egy különleges lehetőség: spermium és hám differenciált feltárása

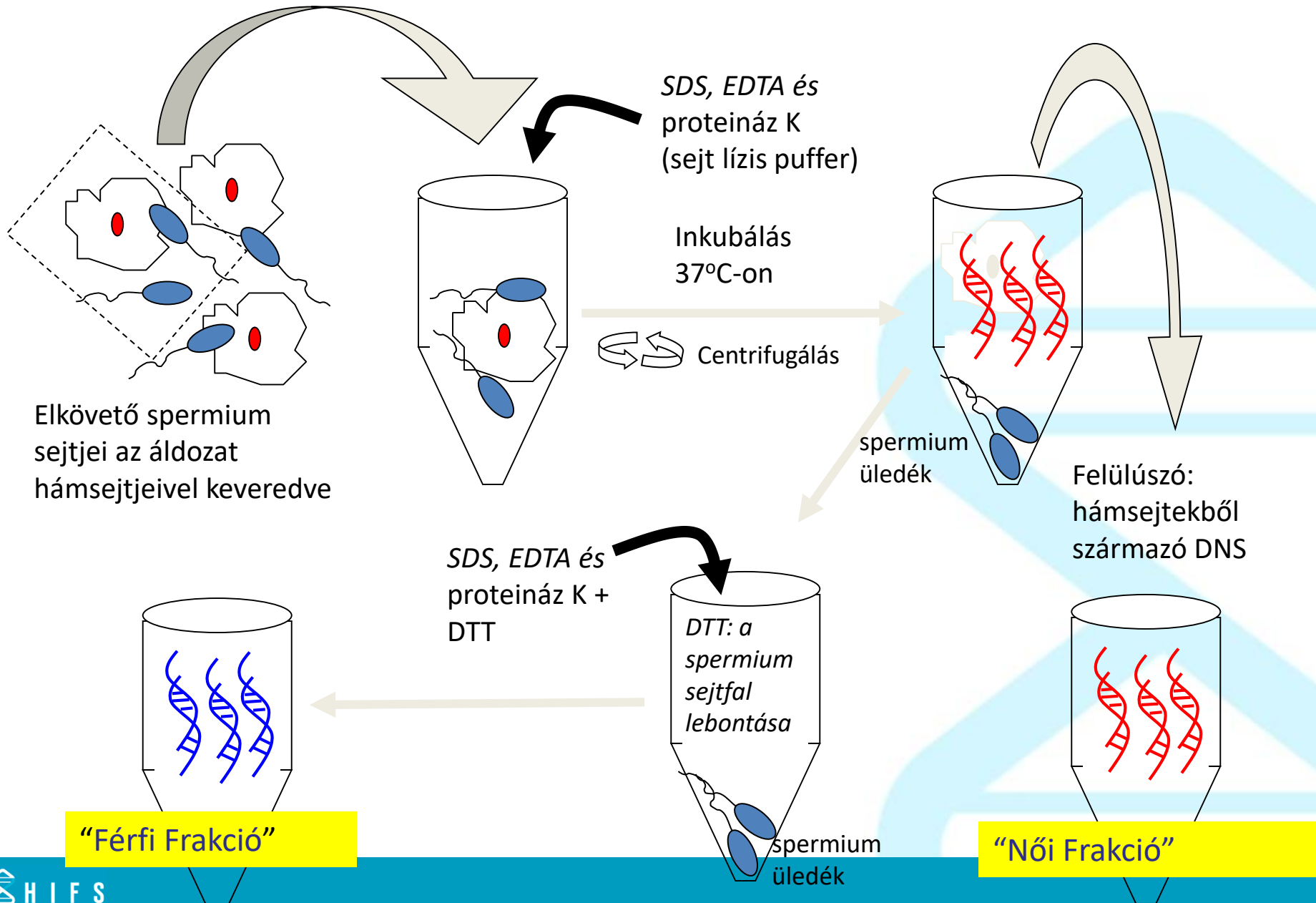
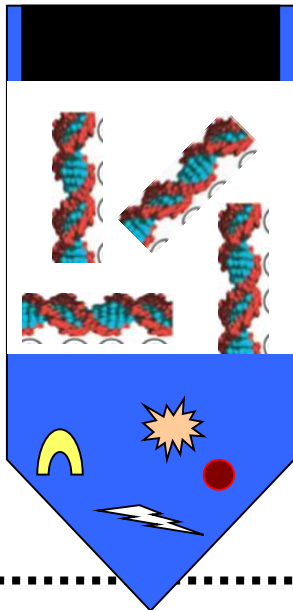


Figure 3.2, J.M. Butler (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd Edition © 2005 Elsevier Academic Press

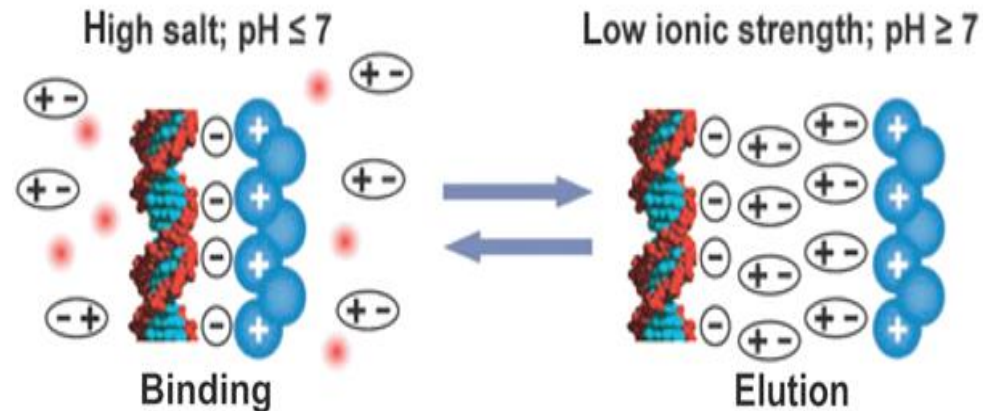
DNS tisztítása

- Van az oldatunkban DNS + sejttörmelék, fehérje és sejthártya lebontva. Gátló anyagoktól meg kell tisztítani a DNS-t!

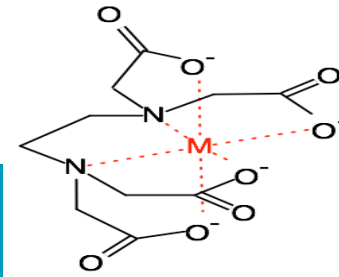
- Oldhatóság különbsége alapján (felület...)



- Mágnesgyöngyhez kötjük a DNS-t



- Tris-EDTA szerepe:
 - Endogén nukleázok inaktíválása

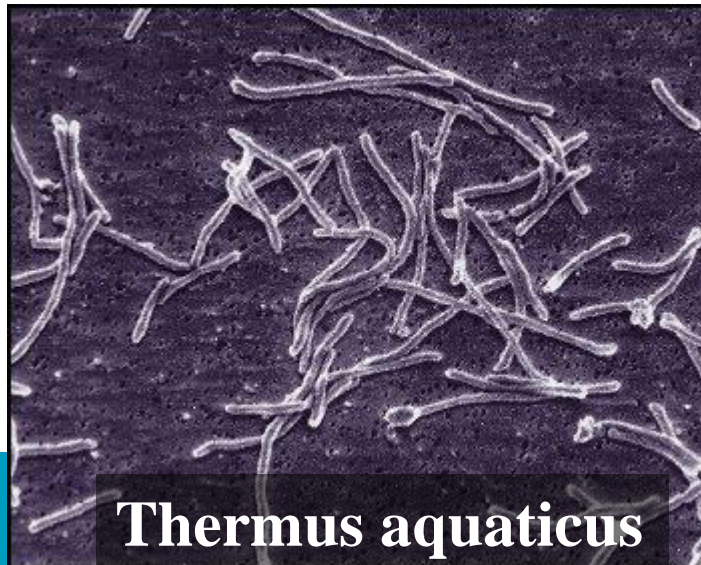


PCR (polimeráz láncreakció)

- Cél: a számunkra érdekes DNS-szakasz felszorzása
- Kary B. Mullis és a hőforrásban élő baktériumok (*Thermus aquaticus*) polimeráz enzime
- Hot start!



© R.G. Steane



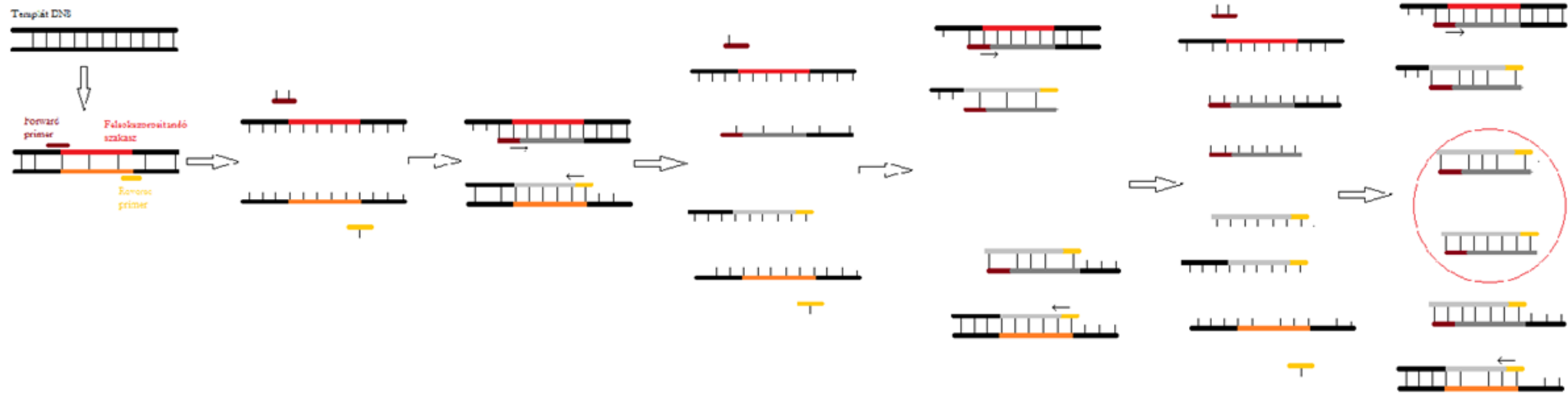
Thermus aquaticus



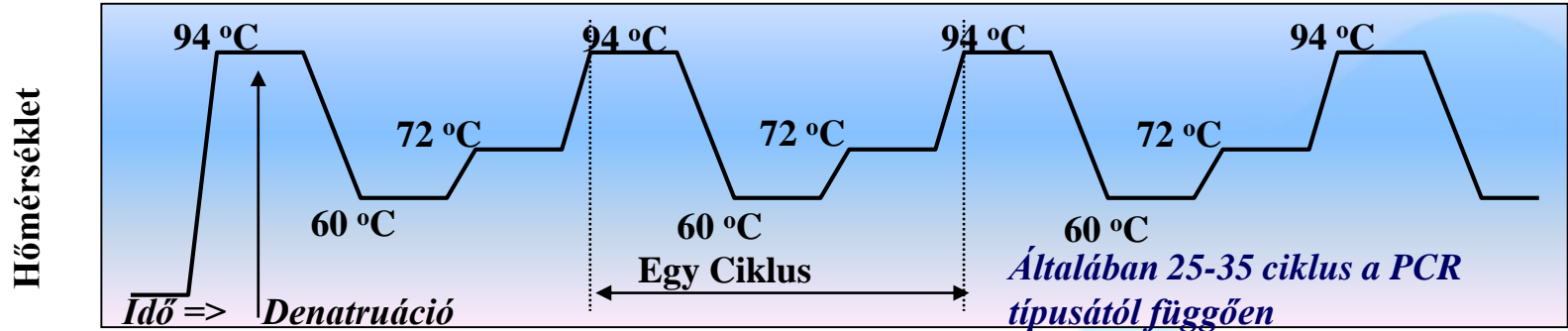
Kary B. Mullis

PCR

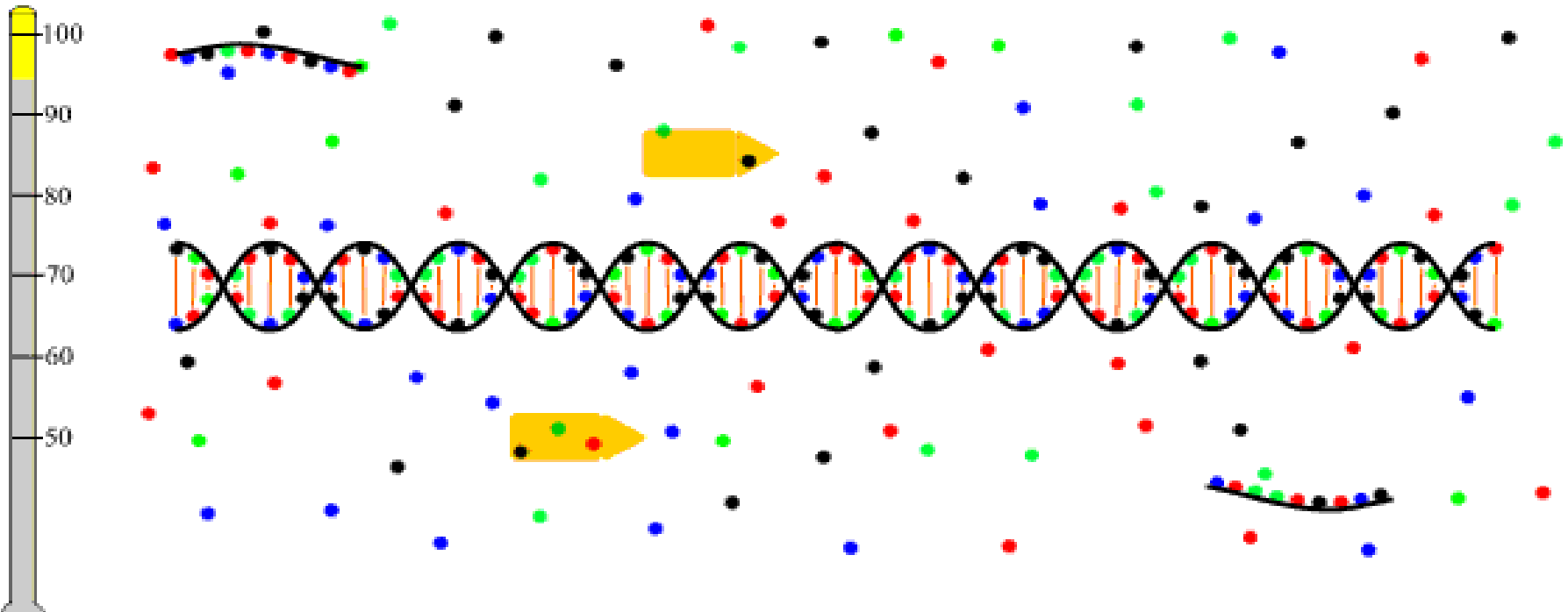
- A mechanizmus -



PCR

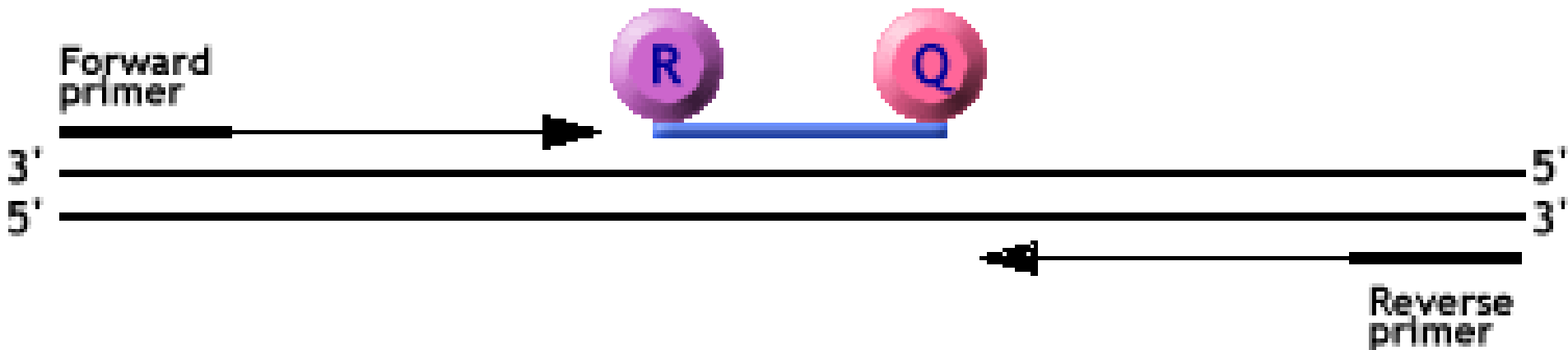


PCR : Denaturation 94 °C



Real-time PCR – DNS mennyiség

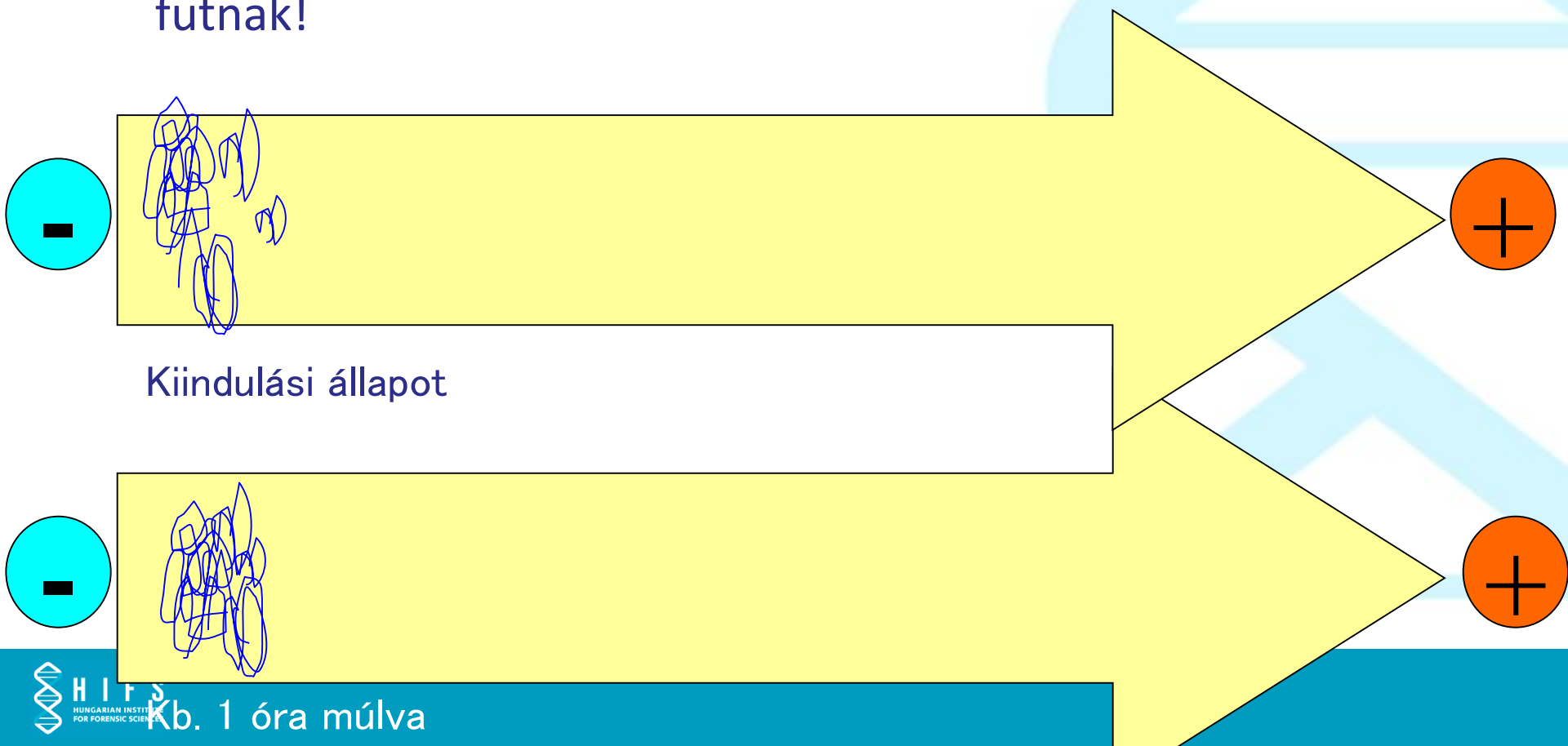
1. Polymerization.



- A PCR optimális működéséhez 0,5-1 ng DNS bevitelre van szükség!

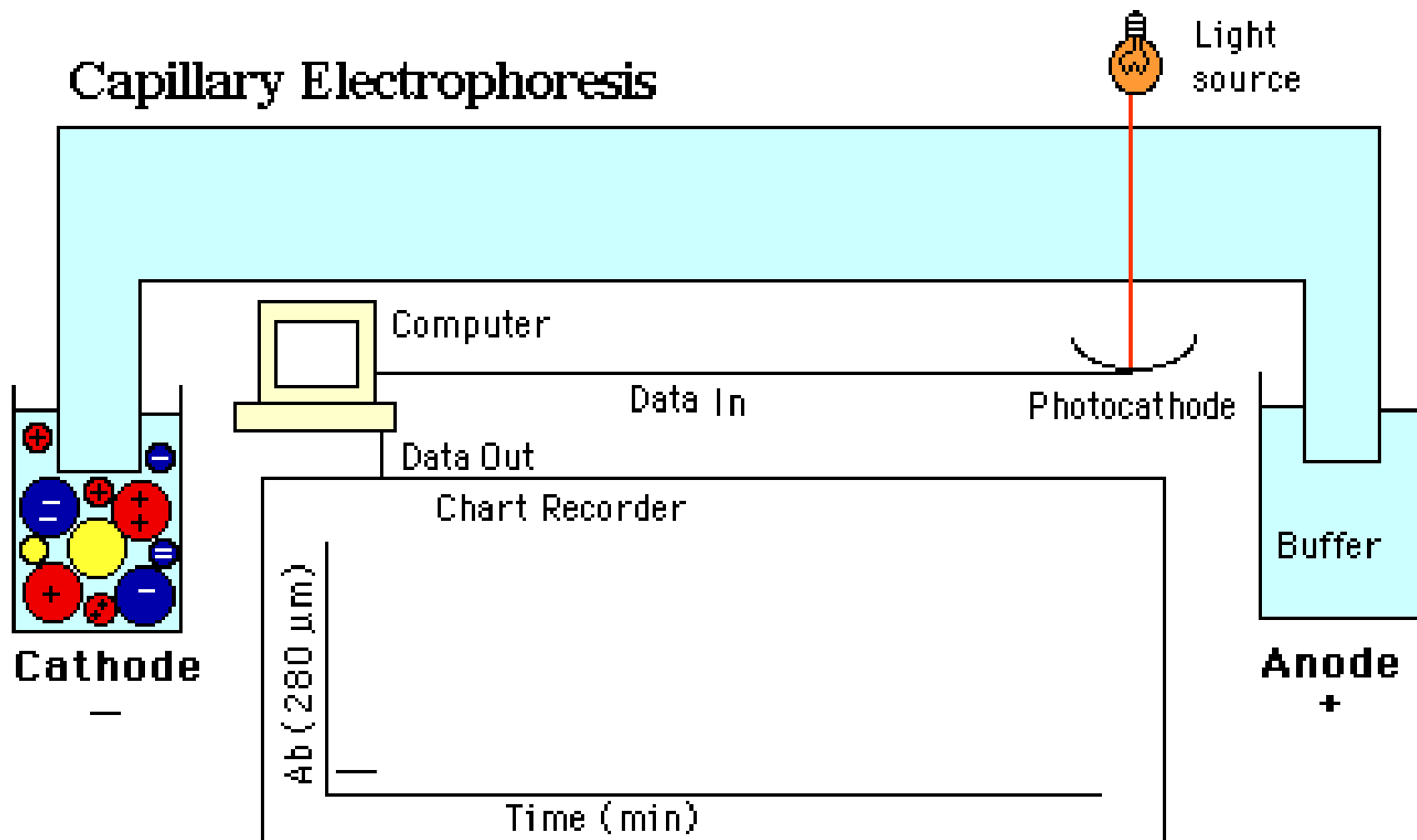
Gélelektroforézis

- DNS molekulák futóversenye egy „pókhálószövedéken” át
 - Agaróz, vagy akrilamid közegben
- A több ismétlődő egységből (repeat) álló molekulák lassabban futnak!

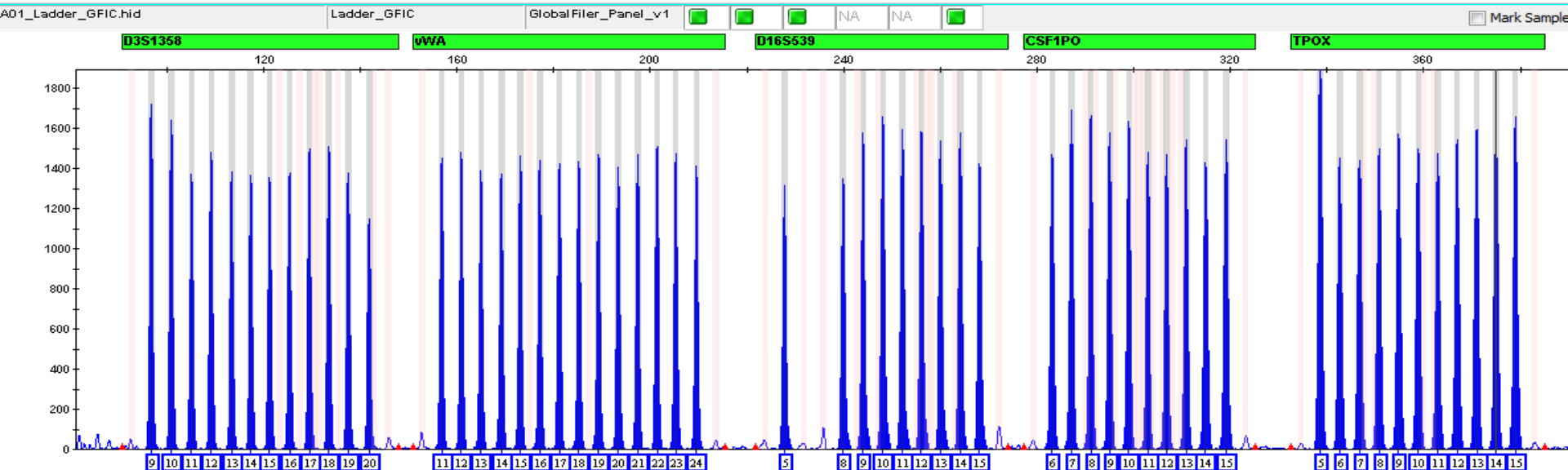
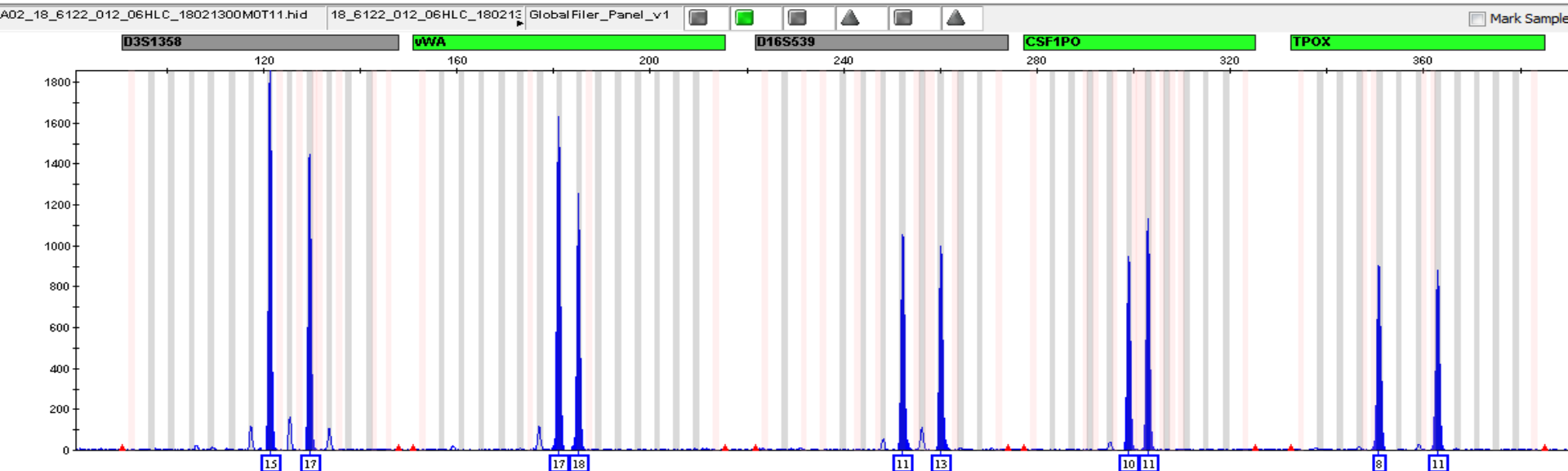


Kapilláris gélelektroforézis

Capillary Electrophoresis

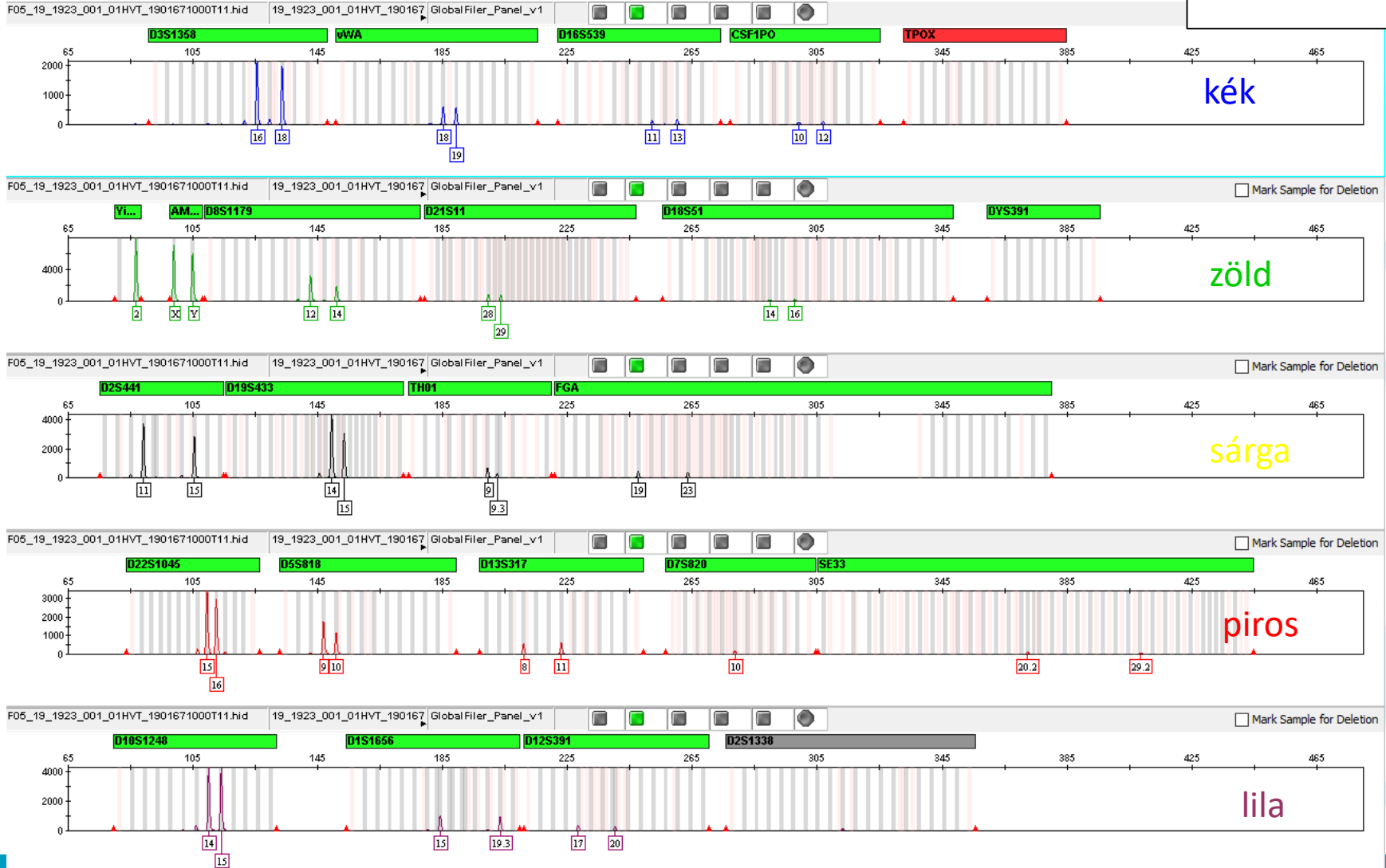
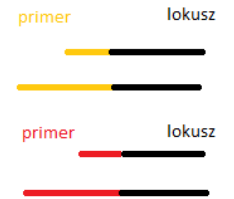


Gélelektroforézis kiértékelése



Kiértékelés 2.

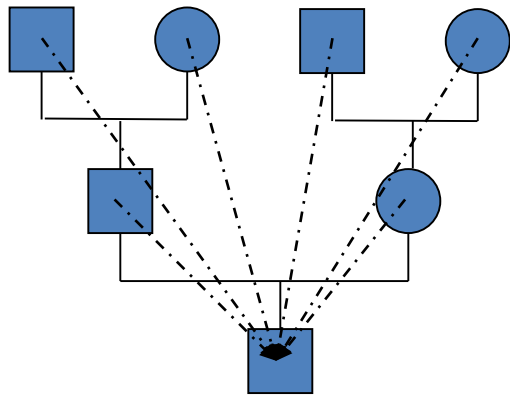
méret primerekkel



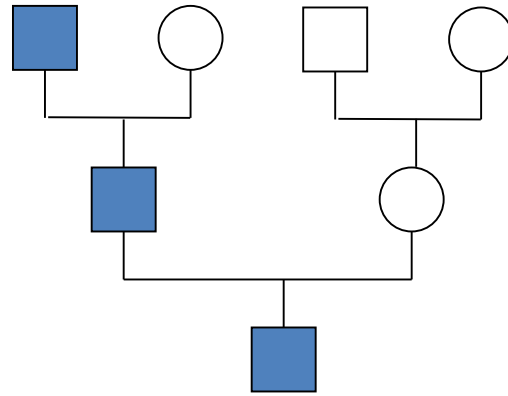
szín jelölés

Eltérő öröklődési mintázatok

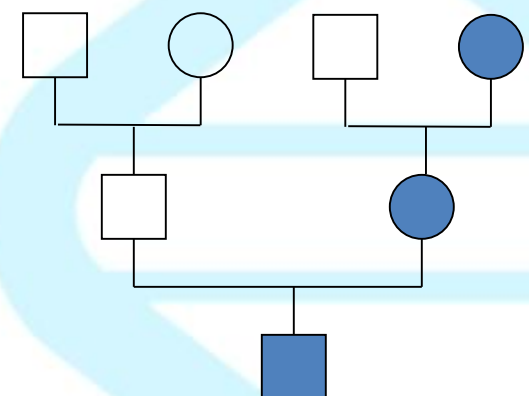
Leszármazási markerek



Autoszómás marker
(az összes felmenőnkől örököljük részletekben)

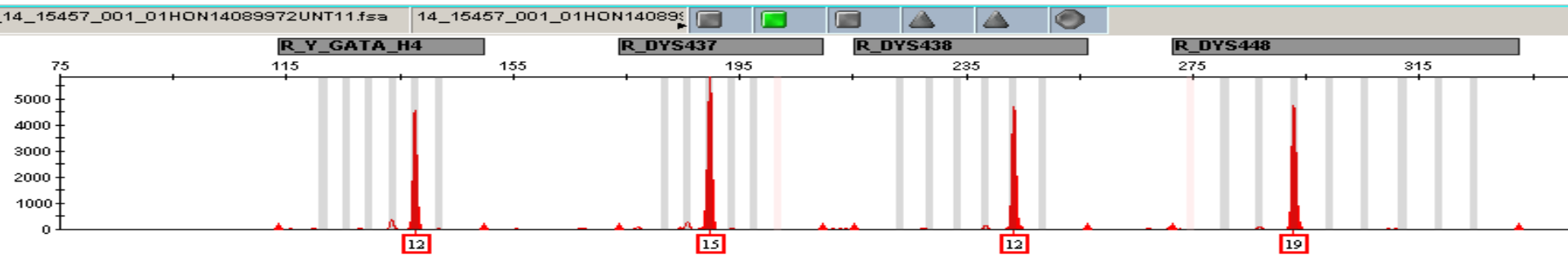
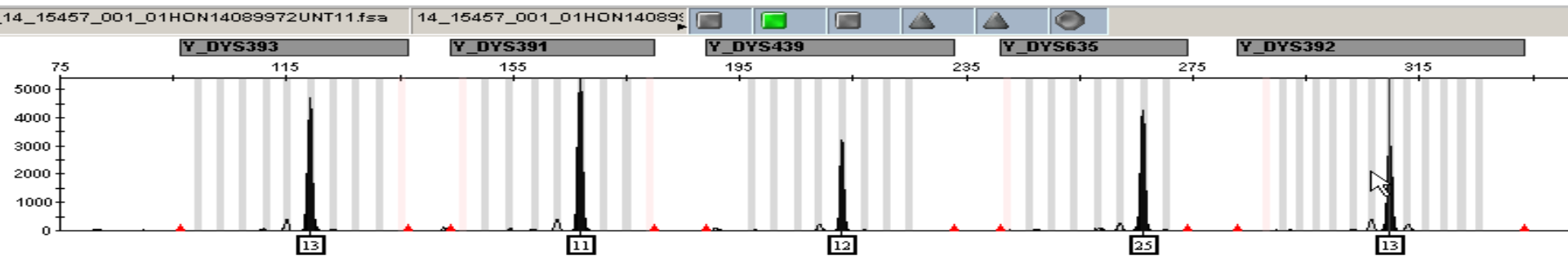
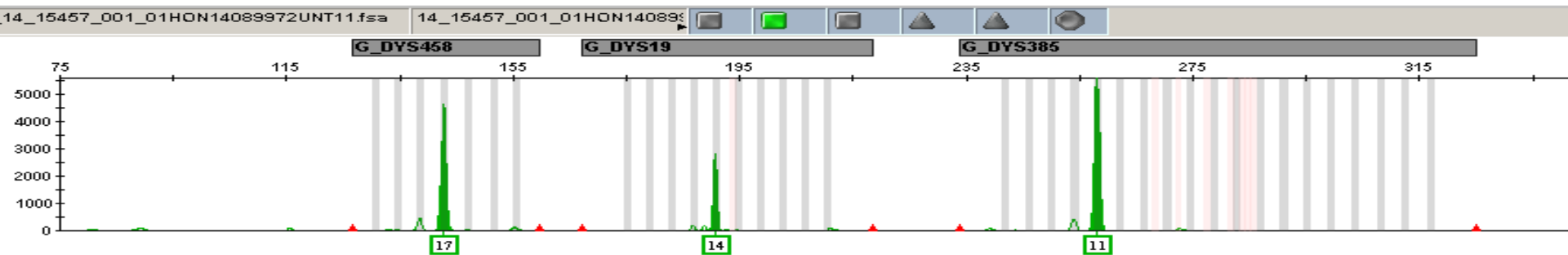
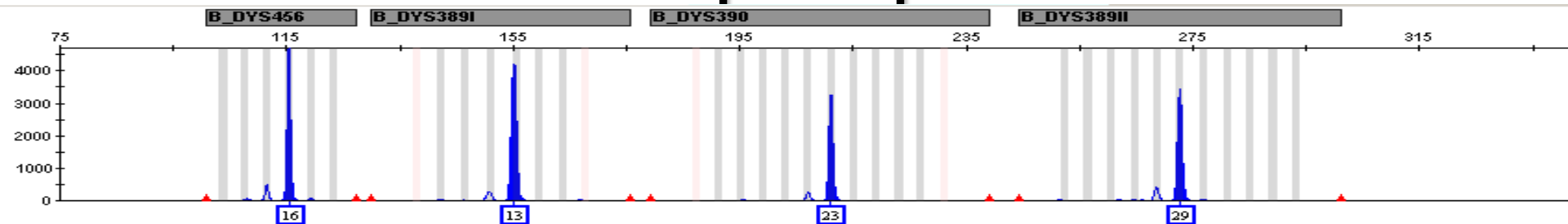


Y-kromoszóma
(csak a fiú gyermekek öröklik apjuktól)



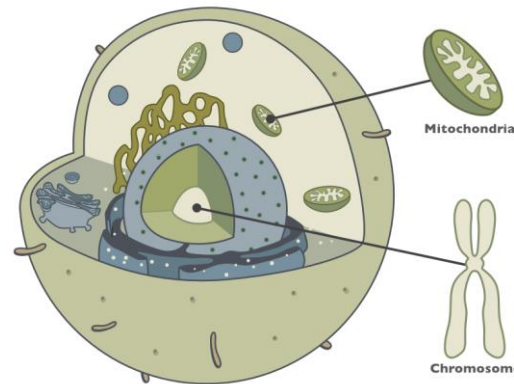
Mitokondriális DNS
(minden gyermek az édesanyjától örökli)

Y-haplotípus

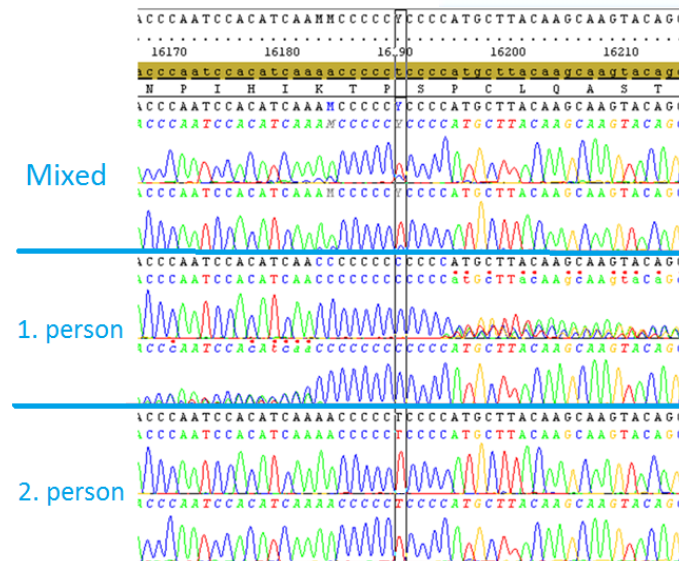
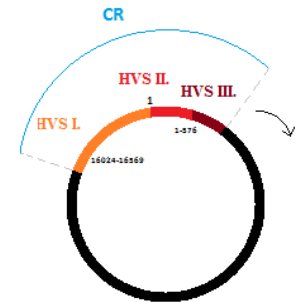


Mitokondriális DNS

- Nem STR vizsgálat, hanem szekvenálás
 - Bázissorrend meghatározás
 - Csak a hipervariábilis régiókban → szintén nem kódoló
- Mikor használjuk?
 - Alacsony DNS tartalmú
 - 2 pg/μl alatt (Pl. hullott hajszál)
 - Degradált
 - 1 személyi
 - Anyai leszármazás vizsgálat
 - Speciális hatósági kérés
- CSAK KIZÁRÁSRA



A mitokondriális DNS



A DNS vizsgálat eredménye

- **Egyezés** – Az összevetett STR profilok csúcsai ugyanazt a genotípust mutatják és a profilok között nincsen megmagyarázhatatlan eltérés.

A szakértői véleményben az egyezés fokát statisztikai értékeléssel, valószínűsítő véleményadással is alá kell támasztani.

- **Kizárás** (nincs egyezés) – A mintákból kimutatott DNS-profilok összehasonlítása olyan genotípusbeli különbséget mutat, ami csak a minták különböző eredetével lehet megmagyarázni.
- **Inkonkluzív** – Az adatok kiértékelése során nem állapítható meg, hogy a profilok megegyeznek-e egymással.

Statisztikai értelmezés

- Mennyi az esélye (LR), hogy 1-et dobok, és nem más számot?

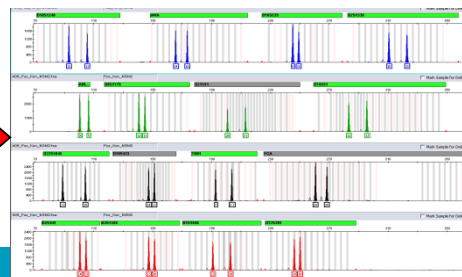
• **1** : **5**



- Mennyi az esélye, hogy a biológiai nyom XY-on kívül más személytől származhatott?

• **1** : **10^{12}** azaz **1** az **1 billióhoz**

gyanúsítottól



**vele nem rokon
ismeretlen személytől**

versus

Esély és nem kategórikus vélemény



Két egyetemi baseball csapat két játékosa, akik:

- Ugyanaz a nevük
- Nagyon hasonlóan néznek ki
- Egyikük 195, másikuk 193 cm magas
- Mindketten dobójátékosok
- Mindketten szemüvegesek
- De nem rokonok (DNS teszt)

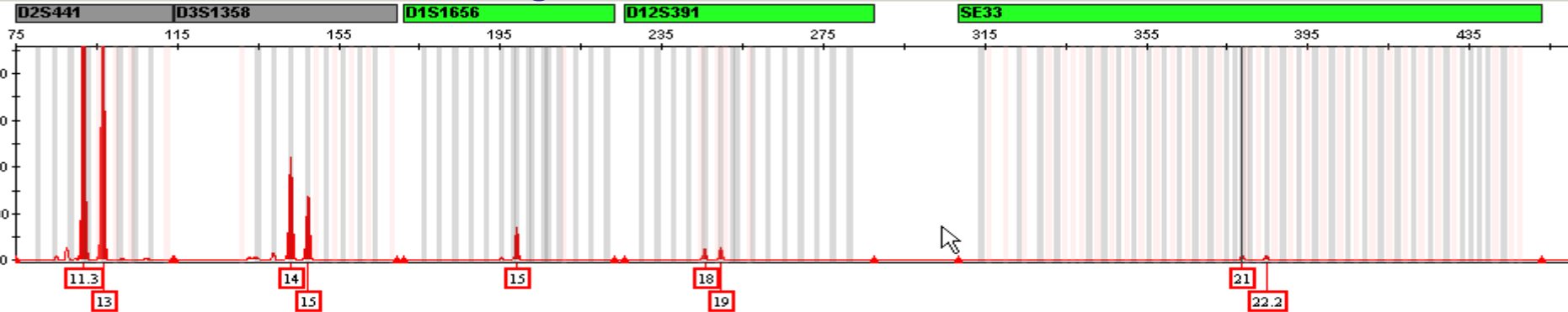
Mekkora az esélye?

- Tapasztalatból is tudjuk, hogy nagyon kevés
 - Hány ilyen **nevű** ember van x hány ilyen **kinézetű** ember van x hány ilyen **mérettartományba** eső ember van x hány **baseball dobójátékos** van x hány **szemüveges** ember van : **1**
- Mégis van ilyen! → EZÉRT NEM ADUNK KATEGÓRIKUS VÉLEMÉNYT!!!**

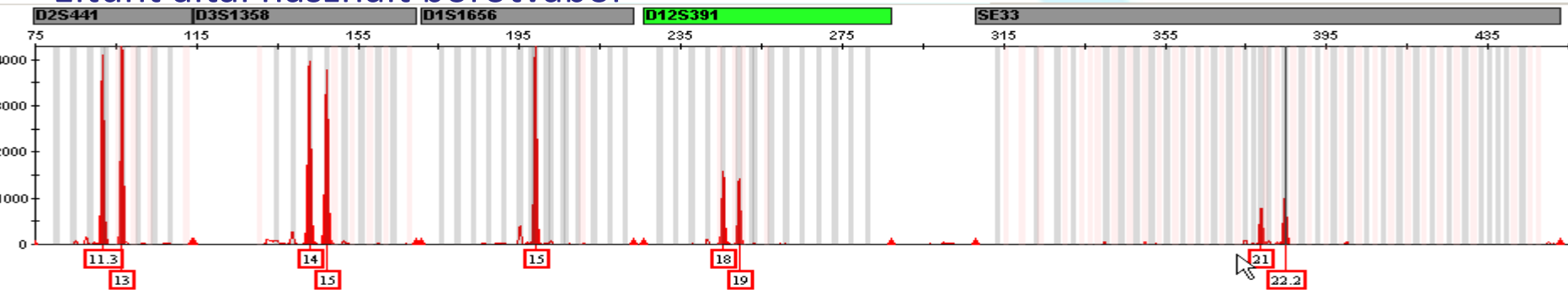
https://index.hu/mindekozben/poszt/2019/02/25/ket_baseballjatekost_ugyanugy_hivnak_es_hasonloan_neznek_ki_dns-teszttel_ellenoriztek_rokonok-e/?fbclid=IwAR100IU522D3DwAhSuMa4Q_a09QDIBPF2DjCv9yLLnQaDgBy2UjYg1vnVQ

Ismeretlen holttest azonosítása

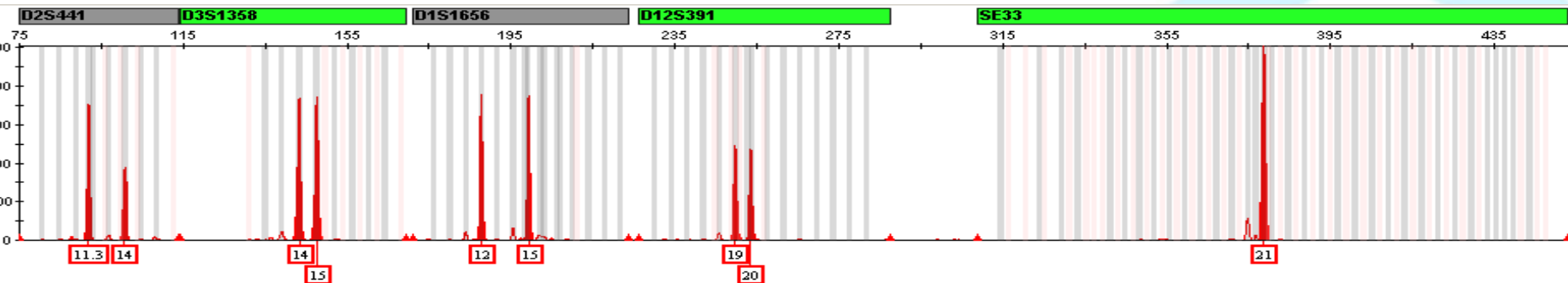
- Ismeretlen holttestből égett csontmintából



- Eltűnt által használt borotvából



- Eltűnt lányának szájnyalakártya-törletéből



A DNS vizsgálat korlátai, befolyásoló tényezők

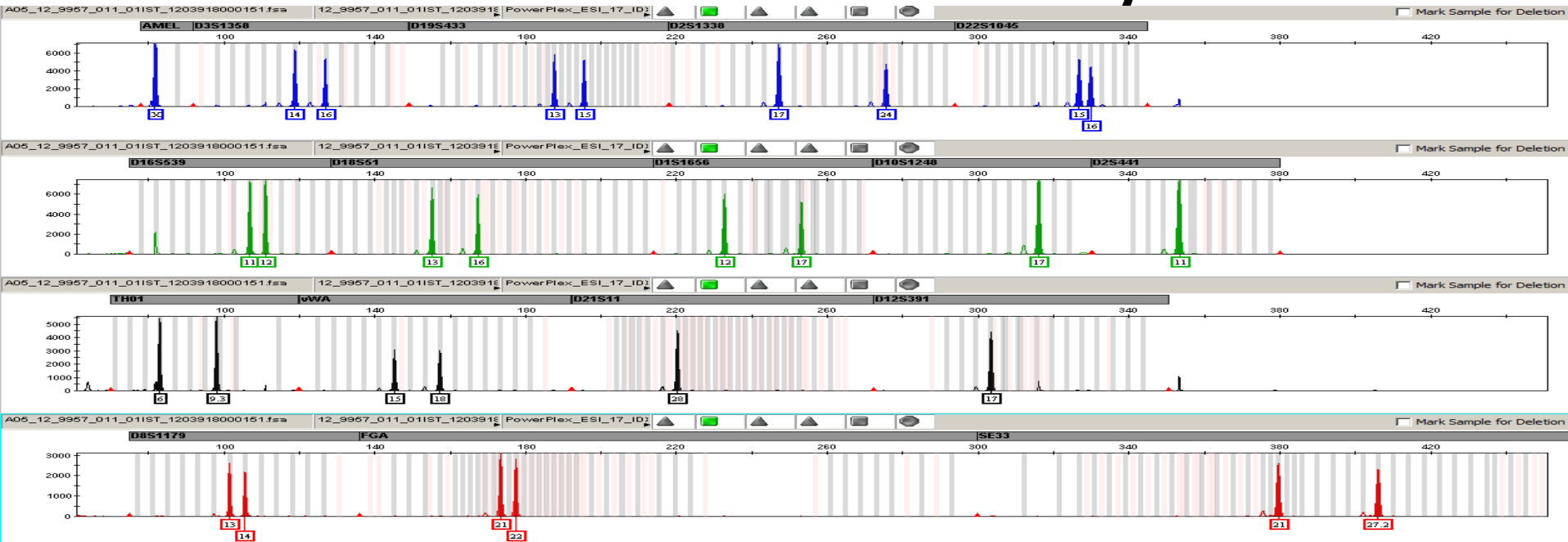
- **A biztosított minta DNS tartalma**
(mennyiség és minőség: detektálási küszöb)
- **A biztosított minta degradálódása, bomlási folyamatok**
 - enzimatis (Nedves környezetben: pár nap!)
 - ultraibolya sugárzás
- **Gátló anyagok jelenléte**

„Nem csak magunkat kell féltetni a fertőzéstől, hanem a mintát a tőlünk való szennyezéstől!”

1-3 sejtből már teljes DNS profil állítható fel, sajnos akkor is, ha a mintát kezelő személyektől származik...



És az ikrekkel mi a helyzet?



Mintakód - Mintanév	AMEL	vWA	D16S539	D2S1338	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA	D3S1358	D7S820	CSFIPO	D13S317	TPOX	D5S818
Kutnyánszky Edit	X	17	15/ 18	11/ 12	17/ 24	13/ 14	28	13/ 16	15/ 16	13/ 15	6/ 9.3	21/ 22	11	14/ 16	12/ 17	17
Kutnyánszky Vera	X	17	15/ 18	11/ 12	17/ 24	13/ 14	28	13/ 16	15/ 16	13/ 15	6/ 9.3	21/ 22	11	14/ 16	12/ 17	17

DNS életideje

- **több év - több 100 év lehet, ha a környezet nem segíti elő a lebontását**
 - honfoglalás kori csontokból bizonyítottan kivonható DNS
 - de egy száraz, hűvös beltérben 10-50 évig megmaradhat (az eredeti mennyiségtől is függ a sikeresség)
 - 10 éves látens nyomból még lehetséges, hogy tudunk DNS-profilt felállítani
- **hamar (akár 3 nap - 2 hét) lebomolhat nem megfelelő körülmények közt, mint:**
 - nedves, meleg környezet
 - mikrobák jelenléte (pl. talajban, bomló szövetek közt)
 - hüvelyben kb. a 3. nap után bomlik le a spermium, kicsit később maga a DNS
 - hasonlat: 1 pohár tej milyen körülmények közt savanyodik meg?
 - vegyszerek hatására még hamarabb (pl. hypo – azonnal)



- → épp ezért a **DNS-ből a minta *korát nem tudjuk megállapítani!***
- → a **DNS nyom *nem mutat időrendiséget***

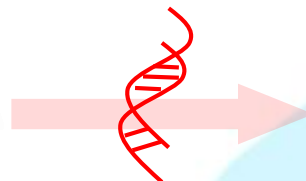
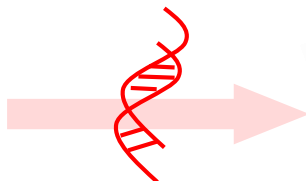
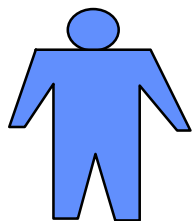
A „fantom” „arc nélküli nő”

- 1993-2009 között
- 40 ügyben, országosan egy ismeretlen női profil, emberölések helyszínén is, Heilbronn: rendőrgyilkosság
- 2 évig kereste a német rendőrség 350 000 € nyomravezetői díjat tűztek ki
- egy oszták nő volt a „fantom”, aki a pamut pálcákat gyártó gyárban dolgozott...
- Greiner Bio-One cég doglozója, aki *sterilezés előtt* csomagolta a swabokat => steril, de nem DNS-mentesként árult pálcák voltak



Másodlagos transzfer

„Az ügy történt, hogy az összes munkaruhámat ellopták, a kesztyűmet is, és abban követték el....”



~: egy személy megfog egy tárgyat (1. tárgy), majd arról a tárgyról a DNS-e egy másik tárgyra (2. tárgy) kerül át úgy, hogy a két tárgy érintkezik egymással

- bizonyítottan lehetséges
- példa: ujjnyomporozó ecsettel történő átvitel

- **Érdeemes-e vizsgálni?** (pl. kesztyűvel megfogott tárgyakat) → attól függ, hogy
 - a 2. tárgy felülete nem tartalmaz-e (jelentős mennyiségű) vétlen, egyéb DNS-t, vagy szinte DNS mentes, steril (minél tisztább, annál esélyesebb)
 - az 1. tárgyon milyen mennyiségben volt DNS (minél több, annál esélyesebb)
 - az átvivő milyen jó nyomhordozó
 - összességében elég alacsony sikeresség várható

NEM cáfolható, és az esélyét sem tudjuk meghatározni!

Köszönöm a figyelmet!

Lencse Zsófia

igazságügyi genetikus szakértő gyakornok

NSZKK

Genetikai Szakértői Intézet

