

Utvrđivanje očinstva/majčinstva primjenom analize DNA

Milardović, Anamarija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:778513>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANAMARIJA MILARDOVIĆ

**UTVRĐIVANJE OČINSTVA/ MAJČINSTVA PRIMJENOM
ANALIZE DNA**

Završni rad

Split, 2016. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANAMARIJA MILARDOVIĆ

**UTVRĐIVANJE OČINSTVA/ MAJČINSTVA PRIMJENOM
ANALIZE DNA**

**PATERNITY/ MATERNITY TESTING USING DNA
ANALYSIS**

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, 2016. godina

SADRŽAJ :

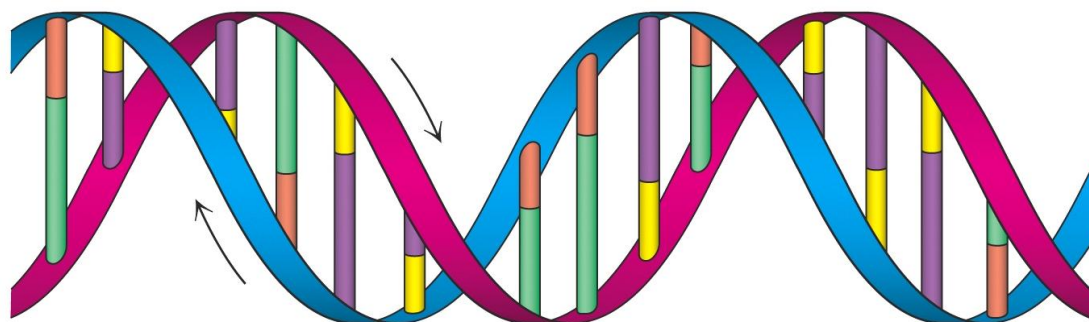
1. UVOD	1
1.1. DNA.....	1
1.2. Vrste DNA	2
1.2.1. Jezgrina DNA	2
1.2.2. Mitohondrijska DNA	3
1.3. Kratki uzastopno ponavljajući sljedovi (STR)	4
1.4. Analiza DNA	5
1.4.1. Uzimanje uzoraka.....	5
1.4.2. Izolacija DNA	6
1.4.3. Kvantificiranje DNA	8
1.4.4. Umnažanje DNA	8
1.4.5. Detekcija rezultata	10
1.5. Matematički postupci kod testiranja roditeljstva.....	11
2. CILJEVI RADA	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali i reagensi	15
3.1.1. Pribor.....	15
3.1.2. Reagensi	15
3.1.3. Aparati / instrumenti.....	16
3.2. Metode	16
3.2.1. Uzimanje uzoraka za analizu.....	16
3.2.2. Priprema uzorka za izolaciju DNA	17
3.2.3. Priprema uzorka za PCR i PCR postupci.....	17
3.2.4. Priprema uzoraka za razdvajanje DNA ulomaka.....	18
5. REZULTATI	19
4.1. ZAKLJUČAK REZULTATA.....	23
5. RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČCI	26
7. LITERATURA	27
8. SAŽETCI	28
8.1. Sažetak.....	28

8.2. Abstract	30
9. ŽIVOTOPIS.....	31

1. UVOD

1.1. DNA

Molekula DNA (engl. *Deoxyribonucleic Acid*; hrv. deoksiribonukleinska kiselina) je nukleinska kiselina koja predstavlja genetsku osnovu svakog živog organizma. Građena je u obliku dvostruke uzvojnice i možemo je naći u gotovo svakoj stanici u organizmu, u svih 46 kromosoma. DNA je sastavljena od jedinica zvanih nukleotidi kojih u ljudskom organizmu ima oko 3×10^9 . Sam nukleotid sastavljen je od triju podjedinica: pet- ugljičnog šećera, fosfatne skupine i nukleotidnih baza koje sadržavaju dušik, a zovu se: adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). Adenin i timin se povezuju dvostrukim, a citozin i gvanin trostrukim vodikovim vezama koje održavaju dvostruke lance nukleotida u DNA zajedno. [1, 2]



Slika. 1. Grafički prikaz dvostruke spiralne građe molekule DNA (prilagođeno prema Stryer L)¹

Genetički kod koji nosi jezgrina DNA zapisan je u genima, aktivnim dijelovima koji se nalaze na točno određenim mjestima lanca DNA molekule, lokusima. Različiti oblici istog gena zovu se aleli, a na svakom pojedinom lokusu osoba posjeduje dva alela- jedan od oca, a jedan od majke. Ako određeni genotip (genski prikaz) ima dva identična alela na određenom genskom

¹ Slika 1.- prilagođeno prema Stryer L [16]

lokusu, zove se homozigot, a ako pak ima dva različita alela na genskom lokusu, zove se heterozigot. [1, 2]

DNA je osnova nasljeđa u prenošenju osobina s roditelja na potomke. Spajanjem roditeljskih DNA molekula nastaje jedinstvena kombinacija genetskog materijala u novoj stanici tako da svaka osoba u svom genomu ima pola očevih, a pola majčinih gena. Usporedbom sekvenci DNA jedne osobe sa sekvencama druge možemo utvrditi proizlaze li jedni geni iz drugih ili ne. [2, 3]

1.2. Vrste DNA

DNA je središnja molekula života koja, kao primarni (osnovni) nosilac nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakoga živog bića. U organizmima je smještena u jezgri u obliku kromosoma i u mitohondrijima (mitohondrijska DNA- mtDNA). [1]

1.2.1. Jezgrina DNA

Više od 1 m dužine jezgrine DNA raspodijeljeno je u strukture koje nazivamo kromosomima. Ljudski genom sadrži 46 kromosoma raspodijeljenih u parove unutar jezgre. Pri stvaranju nove jedinke 23 kromosoma dolaze od oca, odnosno iz spermija, a 23 iz majčine jajne stanice. Jedan od ovih parova kromosoma se naziva spolni kromosom te on određuje spol jedinke. Kombinacija nastala spajanjem dva kromosoma X (XX) određuje ženski, a spajanje kromosoma X i Y (XY) određuje muški spol. Preostala 22 para kromosoma nazivaju se autosomima i homologni su, odnosno imaju sličnu građu te nose identične gene u oba spola. [1,2]

Kromosom Y svrstavamo među najkraće kromosome u humanoj garnituri jer je sastavljen od oko 50 milijuna parova baza te na taj način čini oko 1,8% humanog genoma. Ljudski kromosom Y prisutan je u normalnih muškaraca u jednoj kopiji, nasljeđuje se po ocu, te 95% njegova kompleksa ne podliježe rekombinaciji. Preostalih 5% može se u određenim slučajevima rekombinirati s drugim spolnim kromosomom X i zajedno s njime tvoriti

pseudoautosomnu regiju X i Y kromosoma. Važnost kromosoma Y posebno se ističe u određivanju nasljednih linija muškaraca, kao i kod dokazivanja očinstva kad su djeca muškog spola. [1]

Humani kromosom X primjenjujemo kod ispitivanja očinstva kod djece ženskog spola ukoliko potencijalni otac nije prisutan te tada testiramo njegovu rodbinu. Uporaba ovog biljega još je uvijek relativno ograničena i poglavito se zasniva na kombiniranoj uporabi X-vezanih biljega s uobičajenim autosomnim lokusima. Osim toga, određeni se rezultati mogu ostvariti i u analizi majčinstva, i to najučinkovitije u analizi veze majka- sin, što je rijetko, ali se ipak provodi u različite svrhe. [1]

1.2.2. Mitohondrijska DNA

Mitohondrijska DNA nasljeđuje se po majčinoj liniji te potječe iz citoplazme jajne stanice. Nasljeđuje se po majci i označuje ženske pretke nekog pojedinca. Ova činjenica je korisna u određivanju majčinskih nasljednih linija unutar obitelji i populacija. Unutar obitelji, samo ženska djeca mogu prenijeti slijed nukleotida majčine mtDNA na svoju djecu. Suprotno od jezgrine DNA, mtDNA može biti prisutna i u nekoliko tisuća kopija unutar stanice zbog čega trebamo biti posebno oprezni u radu jer vrlo lako može doći do kontaminacije uzorka stranom mtDNA. Jedan od velikih problema prilikom rada sa mtDNA je prisutnost dviju ili više subpopulacija mtDNA u jedne osobe što se naziva heteroplazma te je ona vjerojatno rezultat različitih pogrešaka tijekom replikacije mtDNA. [1]

Budući da se molekule mtDNA repliciraju neovisno jedna o drugoj, za razliku od jezgrinih kromosoma kod kojih prvo dođe do replikacije DNA, a sparivanje homolognih kromosoma i rekombinacija gena nastaje u mejozi I, ne postoji mehanizam rekombinacije mtDNA. Jedina varijabilnost mtDNA može nastati nakon mutacija koje su uzrok promjene slijeda parova baza. Sva djeca nasljeđuju od majke jednak slijed nukleotida mtDNA, te na taj način osoba ne može biti heterozigot. [1, 2]

1.3. Kratki uzastopno ponavljajući sljedovi (STR)

Kratki uzastopno ponavljajući sljedovi (engl. *short tandem repeats*, STR) su molekularni polimorfizmi koji se sastoje od sekvencija duljine 2- 7 baznih parova koje se na definiranom lokusu ponavljaju određen broj puta, ovisno od osobe do osobe. Ipak, nije neuobičajeno da dvije osobe imaju iste alelne varijante na promatranom STR- lokusu, pa čak i da se poklapaju i na dvama ili trima STR- lokusima, ali je najmanja teorijska vjerojatnost da postoje dvije osobe s identičnim alelnim varijantama. [1]

U novije vrijeme, STR- biljezi se sve češće koriste zbog svoje jednostavnosti i brzine samog procesa, ali i zbog moguće istodobne obrade većeg broja STR- biljega u multipleksnim STR- sustavima. Najčešće se ispituju STR- biljezi koji u svojim ponavljajućim sekvencijama imaju četiri baze. STR- lokusi mogu se amplificirati korištenjem PCR postupaka, a kasnije analizirati elektroforezom kako bi se po veličini razdvojili aleli. Nakon provedene PCR- amplifikacije, STR- aleli se mogu detektirati različitim metodama zbog postojanja industrijski proizvedenih kompleta reagensa koji se primjenjuju u različitim automatiziranim sustavima za detekciju. Tako se dobivaju rezultati s visokom razinom individualizacije pri identificiranju tragova. [1, 3]

Poželjne osobine jednog STR lokusa jesu:

1. Izražena učestalost heterozigotnosti,
2. Jasno definirani ponavljajući sljedovi,
3. Jasno određene alelne varijante,
4. Jednostavno i pouzdano umnažanje.

1.4. Analiza DNA

Analiza DNA zasnovana je na činjenici da je samo 0,5% DNA različito kod svake osobe te se u tom malom dijelu nalazi veliki broj razlika u sekvenci DNA među pojedincima. Prilikom analiziranja DNA molekula koristimo samo ona mjesta na DNA koja su promjenjiva i koja se mogu pojaviti u velikom broju kombinacija, odnosno uspoređujemo ponavljajuće visoko promjenjive sljedove. Većina DNA sljedova ne sadržava gene, već su visokopolimorfni i određeni različitim brojem ponavljajućih DNA sekvencija. Među njih možemo smjestiti i promjenjive brojeve ponavljajućeg niza (VNTR- engl. *variable number tandem repeats*). Međutim, analiza ovakvih sljedova je relativno skupa i dugotrajna te se zbog toga u novije vrijeme pokušava potisnuti analiziranjem novih, molekularno manjih biljega, tzv. kratkih tandemskih ponavljajućih sekvenci (STR- engl. *short tandem repeats*). [1, 2]

Analiza DNA obuhvaća niz povezanih postupaka: izuzimanje ili dostava uzoraka u DNA laboratorij, izdvajanje (izolacija) DNA iz cjelokupne stanice, provjera kvalitete i količine DNA, umnažanje DNA, razdvajanje umnoženog DNA produkta, prikaz, analiza i interpretacija rezultata, usporedba podataka i statistički izračun. [2]

1.4.1. Uzimanje uzoraka

Prije same analize DNA molekula, potrebno je dostaviti uzorke u laboratorij. Uzorci iz kojih je moguće izdvojiti DNA koja se kasnije koristi za samu analizu mogu biti krv i krvne stanice, uzorak epitela usne šupljine, sperma i sjemene stanice, tkiva i organi, kosti, zubi, kosa, nokti, mokraća, feces, ... Svi ovi biološki materijali sadržavaju staničnu jezgru te se zbog toga, ukoliko imamo dovoljnu količinu i određenu kvalitetu uzorka, iz njih može izolirati i analizirati DNA. Međutim, postoje uzorci, kao što su suze, znoj bez epitelnih stanica i serum, koje nije moguće ispitati standardnom analizom DNA jer nemaju staničnu jezgru. Za obično, rutinsko dokazivanje očinstva potrebni su nam uzorci uzeti od pretpostavljenog oca, majke i djeteta, dok je za dokazivanje očinstva gdje majka nije poznata potrebno analizirati uzorke od navodnog oca i djeteta. Prenatalno dokazivanje očinstva je rizično i zahtjeva amniocentezu

kako bi dobili uzorak amnionske tekućine, a uz to je potreban i uzorak mogućeg biološkog oca. Dokazivanje očinstva bez prisustva pretpostavljenog oca zahtijeva uzorke od majke, djeteta, te djeda i bake sa očeve strane. [1, 2, 4]

Budući da je DNA jako osjetljiva molekula čiji integritet može biti narušen zbog različitih uvjeta (npr. vrijeme, temperatura, vlažnost, ...), uspješnost analize ovisi o količini uzorka, stupnju razgradnje DNA te o čistoći dobivenog uzorka. [1, 2]

1.4.2. Izolacija DNA

Molekulu DNA unutar stanica nalazimo okruženu raznim proteinima, mastima te ostalim kontaminirajućim tvarima. Sve te udružene molekule usporavaju analizu DNA te je zbog toga prije same analize potrebno DNA pažljivo i temeljito odvojiti od ostatka staničnih komponenata koje su prisutne u uzorku. Prvi korak prilikom odvajanja tvari koje nam usporavaju analizu je razbijanje stanica nakon čega se oslobađa sadržaj u kojem se nalaze molekule ugljikohidrata, proteina, masti i drugih molekula. S obzirom na to da se kemijske reakcije koje ćemo dalje koristiti prilikom analize DNA ne mogu zbivati u prisutnosti ovih molekula, njih je potrebno ukloniti posebnim tehnikama. [1, 2]

Danas se u rutinskom radu primjenjuje nekoliko metoda izdvajanja DNA. Budući da veliki broj slučajeva koji dolazi u laboratorij sadržava malu količinu DNA, potrebna je posebna opreznost prilikom rukovanja sa takvim uzorcima. Za izolaciju DNA iz takvih uzoraka kod kojih se očekuju male količine DNA najčešće se koriste komercijalni pripravci i to za analizu DNA iz krvi, te metoda s organskim otapalima za izolaciju DNA iz kostiju. [1, 2]

Izdvajanje DNA iz uzoraka možemo napraviti pomoću nekoliko metoda:

1. Izdvajanje DNA pomoću organskih otapala

Ovu metodu, koja se smatra jednom od najstarijih metoda izolacije DNA, možemo još i nazvati metodom izdvajanja sa fenol- kloroformom. Način na koji ova metoda djeluje je uklanjanje velike količine proteina i ostalih molekula koje bi mogle ometati analizu DNA. Na početku samog procesa razni puferi poput TRIS-a, NaCl-a, SDS-a i EDTA pripremaju uvjete za aktivnost proteinaze K. Dodavanjem fenol- kloroform- izoamilalkohola rješavamo se masti i proteina te kasnijim djelovanjem kloroforma uklanjamo preostali

višak fenola i ostatke prljavštine. Nakon ovih postupaka, suspenzija u Eppendorf tubi se centrifugira te se po završetku centrifugiranja pokupi supernatant. Na kraju, dobivena DNA se taloži u posebnim tubama te je ispiramo 70%-tnim alkoholom. Izdvojena DNA ostaje sačuvana u velikim fragmentima i čišća je nego nakon drugih ekstrakcijskih metoda. Može se koristiti za daljnje umnažanje pomoću PCR postupka, ali i za RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) analizu. [1, 5]

2. Izdvajanje DNA Chelex® 100 metodom

Metoda izdvajanja pomoću tvorničkog pripravka Chelex® 100 je puno brža od metode koja koristi fenol- kloroform jer se sastoji od manje koraka, te zbog toga postoje i manje šanse za kontaminaciju i smanjenje kakvoće dobivene DNA molekule. Ove dvije metode također se razlikuju po tome što se izdvojene molekule DNA, izolirane metodom sa fenol-kloroformom, može kasnije analizirati i umnažati sa RFLP i PCR postupcima, dok se DNA izdvojene sa Chelex® 100 metodom može kasnije tretirati samo sa PCR postupcima, ali ne i sa RFLP metodom za koju su potrebne dvostruke DNA uzvojnice, a ne jednostruki lanci koji se dobiju nakon izoliranja sa Chelex® 100. [1, 3]

Princip ove metode je da uzorke kuhamo zajedno sa Chelex® 100 nakon čega se Chelex® 100 veže za molekule i ione koji se u idućem koraku uklanjaju te nam ostaje samo čista DNA koja je u obliku jednostrukog lanca. [1]

3. Izdvajanje DNA QIAquick® metodom

Ova metoda se svodi na izdvajanje DNA molekula pomoću već gotovog kompleta kemikalija uz koji dobijemo točna uputstva koja su optimizirana za veliki broj uzoraka. DNA dijelovi se izrezuju s agaroznog gela te se obrađuju tako da se na početku otopi višak gela, a zatim se dodaju razni puferi i cijela se smjesa centrifugira. Na kraju se sve stavlja u posebne QIAquick tube. Ispiranjem tuba pomoću raznih pufera dobiva se kao konačni rezultat čista molekula DNA. [1, 6]

4. Izdvajanje DNA sa FTA kartica

Zbog svoje jednostavnosti, brzine i cijene, ova je metoda postala jednom od najkorištenijih kod nespornih uzoraka kao što su uzorci krvi ili bukalne sluznice. Uzorci se stavljaju ravnomjerno na posebne FTA kartice te se pohranjuju na hladno i mračno mjesto. Nakon većeg broja ispiranja uzoraka sa vodom slobodnom od DNA te centrifugiranjem i treskanjem dobijemo DNA molekule. [1]

1.4.3. Kvantificiranje DNA

Kvantificiranjem DNA molekule određuje se njena kvaliteta i kvantiteta nakon izolacije organskim otapalima, odnosno nakon izolacije pomoću Chelex® 100 metode, dok nakon izolacije sa FTA karticama nije potrebna kvantifikacija. Kvantifikacija predstavlja pripremu za daljnje umnažanje DNA i njenog genskog materijala sa PCR reakcijama. Postoji nekoliko metoda kojima se kvantificiraju DNA molekule, ali najkorištenije su hibridizacijska (*slot-blot*) metoda, te QRT-PCR kvantifikacija. [1, 3]

Trenutačno jedna od najraširenijih metoda kvantificiranja izdvojene DNA jest komercijalna metoda koja se bazira na hibridizaciji sonde koja sadrži ulomke ljudske DNA, s ljudskom DNA potencijalno prisutnom u biološkom tragu, tj. uzorku. Ovaj postupak je iznimno složen i osjetljiv te su uočene neke pogreške prilikom njegova korištenja jer se pokazalo da ponekad uzorke ne kvantificira, a kasnije se ti isti uzorci uspiju uspješno analizirati. [1]

Druga metoda za određivanje kvalitete i količine izolirane DNA molekule je izuzetno jednostavna i brza metoda kvantitativne PCR reakcije u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time PCR*, QRT-PCR). S povećanjem broja kopija produkta u PCR reakcijskoj smjesi, dolazi do porasta signala fluorescentno obilježenog reportera, te se to sve bilježi pomoću krivulja tijekom umnožavanja. [1]

1.4.4. Umnažanje DNA

Metoda umnažanja DNA kojom se može dobiti milijardu kopija jedne DNA molekule je lančana reakcija polimerazom, PCR (engl. *polymerase chain reaction*). Ova metoda je

napravila veliki preokret u suvremenoj molekularnoj genetici jer je omogućila da od jedne molekule kroz 32 ciklusa dobijemo čak $1,07 \times 10^9$ istovjetnih kopija. U časopisu *Science* objavljen je godine 1985. znanstveni rad autora R. Saiki, K. Mullis i H. Erlich, u kojem se prvi put opisuje tehnika specifičnog umnožavanja ulomaka DNA *in vitro* uz katalizu enzima DNA- polimeraze izdvojene iz bakterije *Escherichia coli*. Kasnije su ovi isti znanstvenici objavili rad koji se temelji na prethodnom, uz izmjenu DNA- polimeraze koja je ovaj put izdvojena iz bakterije *Thermus aquaticus* te je dobila naziv Taq- polimeraza. O važnosti ovog otkrića govori i činjenica da je Kary Mullis za svoj rad dobio 1993. godine i Nobelovu nagradu za kemiju. [1, 7]

Reakcija se temelji na razdvajanju dvostruke uzvojnice DNA te kasnijem spajanju fluorescentno obilježenih DNA- početnica (engl. *primers*) čija je uloga da pronađu ulomke DNA koje želimo umnožiti. Početnice se mogu dizajnirati pomoću računalnih programa ili „ručno“ na temelju slijeda odsječka DNA koji umnažamo. Na kraju se spajaju komplementarne baze na slobodna mjesta te se tako stvaraju novi lanci i nove DNA molekule. [1, 7]

Sve se ovo događa pod određenim temperaturama koje uvjetuju odvijanje reakcija denaturacije, hibridizacije i produljivanja lanca. Denaturacija ili razdvajanje polinukleotidnih lanaca se odvija pod temperaturom od 95 °C, dok je temperatura sparivanja početnica ili hibridizacije između 50 °C i 65 °C. Produljenje lanca se odvija na temperaturi od 72 °C te se događa zbog prisutnosti denaturirane matrice, DNA- početnica i posljedica je aktivnosti Taq- polimeraze čija je osnovna svrha sintetiziranje nove DNA. [1, 7, 8]

Postupak provodimo u uređaju za PCR (engl. *thermocycler*) te na kraju uspješnost procesa provjeravamo pomoću sustava fluorescentne kapilarne elektroforeze gdje razdvajamo dijelove DNA i kasnije ih vizualiziramo te grafički prikazujemo. Konačni rezultat je grafički prikaz (graf- elektroferogram) s podacima o ispitivanim lokusima i pripadajućim alelima. [2]

PCR je jako osjetljiva metoda koja je sklona kontaminaciji sa stranim DNA, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Također, do netočnih rezultata može doći i nakon nespecifičnog spajanja početnica sa komplementarnim bazama. Reagensi i oprema imaju jako visoku cijenu te je i to jedan od razloga zbog kojih si uređaje za PCR ne mogu priuštiti manji laboratoriji. No, unatoč ovim problemima, PCR metode se uz strogo kontrolirane uvjete koriste u mnogim laboratorijima diljem svijeta. [5]

1.4.5. Detekcija rezultata

Nakon amplifikacije slijedi faza detekcije koja se zbiva na nekom od analitičkih strojeva, te se uporabom različitih softvera, u određenim fazama procesa, generiraju konačni genetički profili. Detekcija rezultata ide prema potpunoj automatizaciji te je podložna stalnim promjenama i unaprjeđivanju, a provodi se sekvenciranjem DNA. Sekvenciranje DNA jedna je od najvažnijih tehnika za proučavanje nekog gena, odnosno za određivanje točnog redoslijeda nukleotida tog gena. Moderniziranjem i automatizacijom analize dijelova DNA prelazi se sa dosadašnjeg sporog i kompliciranog manualnog sekvenciranja na puno jednostavnije i učinkovitije automatizirano sekvenciranje. Postoji više metoda sekvenciranja kao npr. Maxam- Gilbertova (M- G) metoda, Sangerova metoda i automatsko sekvenciranje. [1, 9]

Sve ove metode se temelje na manualnoj Sangerovoj metodi čiji je osnovni princip rada zaustavljanje enzimske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksiribonukleozid-trifosfata. Za ovakvu reakciju sekvenciranja potrebno je razdijeliti uzorak DNA na četiri dijela i dodati u svaki radioaktivno obilježenu oligonukleotidnu početnicu koja je komplementarna jednom kraju lanca DNA kojega treba sekvencirati. Početnica se tada produljuje pomoću DNA polimeraze u prisutnosti dNTP, te se u dobrim uvjetima stvaraju četiri niza DNA molekula različite duljine koji se mogu jedni pokraj drugih razdvajati na akrilamidnom gelu i prekriti filmom za detekciju X- zraka. Uzorci koje daju pruge DNA mogu se tada iskoristiti za očitovanje sekvencije DNA. [1, 9]

Kod Maxam- Gilbertove metode obilježava se jedan kraj molekule DNA koji se sekvencira, te se nakon toga DNA razdijeli u četiri uzorka od kojih se na svaki djeluje setom kemikalija koje jednu ili dvije od četiriju DNA baza u svakom uzorku razgrađuju na takav način da se razgradi samo nekoliko mjesta u DNA molekuli. Ovo rezultira mješavinom molekula DNA različitih duljina. Svaki od četiriju uzoraka razdvaja se na akrilamidnom gelu te se kasnije gel prekrije filmom za detekciju X- zraka, a uzorak obilježenih dijelova DNA se tada može iskoristiti za određivanje sekvencije DNA. [9]

Analiza STR- molekularnih biljega unutar DNA molekule temelji se na analizi broja ponavljanja kratke tandemski ponavljajuće jedinice jer su u ovim molekularnim biljezima

sljedovi baza dobro poznati i nema potrebe da se pri svakoj analizi iznova potvrđuju. Zbog toga se obilježavanje ne radi diferencijalnim bojenjem svake baze, nego se to čini s cijelom početnicom za odabrani STR- lokus. Alelna varijanta, zastupljena na danom lokusu, pobuđena laserom, fluorescira i tu fluorescenciju detektira složena kamera analitičkog instrumenta. [1]

U novije vrijeme, često se za sekvenciranje rabi metoda fluorescentne detekcije tijekom elektroforetičke separacije. Ova metoda temelji se na korištenju ranije generiranog standarda koji omogućuje detekciju te analizu konkretne alelne varijante, matriksa i određenog biljega koji se analizira usporedno sa konkretnim uzorcima. U većini slučajeva radi se s više STR- lokusa, od kojih se neki poklapaju po veličini i zauzetoj poziciji na gelu, pa se zbog toga rabe četiri ili pet boja kojima se obilježuju odabrani biljezi. Istom se bojom obilježuju dovoljno udaljeni lokusi, tj. oni lokusi kod kojih je zbog velike razlike u njihovoj molekularnoj masi isključeno preklapanje, a različitim se bojama analiziraju lokusi iste veličine tako da je, i unatoč istom vremenu prolaska kroz detekcijski sustav, moguća njihova distinkcija zahvaljujući raznobojnom fluoresciranju alelnih varijanti podrijetlom iz različitih lokusa. Dakle, rezultati predstavljaju alelne varijante koje su pokazatelji koliko se puta poznata repetitivna jedinična sekvencija ponavlja. [1]

1.5. Matematički postupci kod testiranja roditeljstva

Testiranje roditeljstva se temelji na određivanju obveznog alela, odnosno, onog alela koji vuče podrijetlo od biološkog oca. Budući da se uvijek pretpostavlja da je kod testiranja majka zaista majka djeteta, testira se nosi li pretpostavljeni otac uistinu djetetov obvezni alel. Cilj testiranja je isključiti što je moguće veći broj pojedinaca. Ako pretpostavljeni otac nije isključen kao mogući biološki otac, vrijednost dokaza jednaka je relativnoj vjerojatnosti da je pretpostavljeni otac prenio na dijete obvezni alel u odnosu na vjerojatnost da je obvezni alel prenio neki nesrodni pojedinac iz populacije te se to zove indeks očinstva (engl. *paternity index*, PI). Ako je navodni otac homozigot ili ima oba obvezna alela, njegova vjerojatnost prenošenja obveznog alela jednaka je 1,0 (2/2). Ako pretpostavljeni otac ima samo jednu kopiju obveznog alela ili ako sadržava jedan od dvaju obveznih alela, onda je vjerojatnost da je on prenio obvezni alel jednaka 0,5 (1/2). Vrijednost PI za određeni lokus jednaka je vjerojatnosti da navodni otac može prenijeti alel, podijeljenom s učestalošću obveznog(ih)

alela, te će stoga moguće vrijednosti PI biti $1/p$ ili $0,5/p$. Ako su prema genotipovima majke i djeteta određena dva obvezna alela, p će se računati prema formuli $p = p_1 + p_2$, a indeks očinstva se računa za svaki lokus koji se testira i glasi : $PI = 1/(p_1 + p_2)$, odnosno, $PI = 0,5/(p_1 + p_2)$. [1, 10]

Također, postoji i kombinirani indeks očinstva (engl. *combined paternity index*, CPI) u kojem se izražava omjer vjerojatnosti da je pretpostavljeni otac, a ne neki drugi pojedinac iz populacije, prenio obvezne alele sa svih ispitivanih lokusa. Vrijednost ukupnog indeksa očinstva (CPI) računa se tako da se pomnože svi izračunati indeksi očinstva, bez obzira na to koliko lokusa promatramo. U današnje vrijeme, pri uporabi otprilike 15 STR- lokusa zastupljenih u najpoznatijim komercijalnim kompletima reagensa, vrijednost CPI se kreće u intervalu od nekoliko stotina tisuća pa do nekoliko milijuna. [1]

Vjerojatnost prijenosa očinstva (engl. *probability of paternity*), odnosno vjerojatnost da je pretpostavljeni otac biološki otac djeteta računa se po formuli $PP = CPI/(CPI + 1)$, gdje je PP vjerojatnost prijenosa očinstva, a CPI ukupni indeks očinstva. Ova se formula dobije nakon reduciranja Bayesove formule za procjenu mogućnosti da se odigra neki događaj, a koja glasi:

$\frac{H \times p}{H \times p + Y \times (1-p)}$. Budući da su prigodom testiranja očinstva moguća samo dva nalaza (pozitivan ili negativan), početna vjerojatnost iz jednadžbe (p) je 0,5. Upravo zbog ove formule, o vjerojatnosti očinstva, kod testiranja očinstva nikada nije moguće dobiti rezultat od 100%. Bez obzira koliki CPI bio, uvijek se mora podijeliti sa brojem koji je veći od njega za 1 i nikada taj količnik neće moći dati broj 1, a samim tim u postotnom izražavanju vjerojatnosti očinstva nikada neće moći dati 100%. Uopćena pravila upućuju na to da je u standardnom testiranju, kada je i majka prisutna, poželjno dobiti najmanje 5 znamenki 9 nakon decimalnog zareza, tj. 0,99999 ili, kada prikazujemo u postocima, 99,999%. [1]

Snaga testa očinstva može se odrediti s pomoću tzv. neisključenosti slučajne osobe u općoj populaciji (engl. *random man not excluded*, RMNE). RMNE je udio populacije koji bi mogao dati sve obvezne alele, te ne može biti isključen, odnosno izražava se učestalost osoba koje ne mogu biti isključene kao mogući davatelji genetičkog materijala. Računa se po formuli za jedan lokus: $1 - (1-p)^2$. Postoji i kombinirana neisključenost slučajne osobe u općoj populaciji (engl. *combined random man not excluded*, CRMNE) koja je analogna CPI- u, tj. jednaka je umnošku pojedinačnih vrijednosti. [1, 10]

Ukoliko treba utvrditi tko je majka djeteta, rabi se formula za računanje neisključenosti slučajno odabrane žene iz populacije (engl. *random female not excluded*, RFMNE) koja je ista onoj za računanje RMNE ako nema informacija o majci. Majka se isključuje iz daljnje analize ako nema ni jedan od dvaju alela koje ima dijete, ali se i ne može isključiti ako ima samo jedan od dvaju alela koje ima dijete. Također, i ovdje postoji kombinirana neisključenost slučajno odabrane žene iz opće populacije (CRFNE) koja pokazuje postotak žena u populaciji koje ne mogu biti nasumično isključene ili mogu biti lažno uključene. Suprotno od CRFNE je 1/ CRFNE, koji prikazuje broj žena koje moraju biti testirane kako bi se došlo do poklapajućeg rezultata. [1]

2. CILJEVI RADA

Izolirati, umnožiti i razdvojiti umnoženi DNA produkt; iz uzoraka brisa bukalne sluznice za 3 osobe koje su vrlo vjerojatno u srodstvu.

Rezultate prikazati grafički, tablicom i statistički izračunati vjerojatnost srodstva.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali i reagensi

3.1.1. Pribor

Sterilni štapići za uzimanje brisa bukalne sluznice

Rukavice i zaštitna maska

Sterilni kirurški nožić

Poluautomatske pipete sa nastavcima

Sterilne tubice

3.1.2. Reagensi

Chelex® ekstrakcijski pufer

Proteinaza K

DTT (Dithiothreitol)

AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit [11]

AmpFLSTR® Identifiler® Plus Master Mix [11]

AmpFLSTR® Identifiler Plus Primer Set [11]

AmpFLSTR® Identifiler® Plus Control DNA 9947A [11]

ddH₂O

Hi-Di™ Formamide

GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard

3.1.3. Aparati / instrumenti

Vorteks

Eppendorf ThermoMixer® comfort

Mikrocentrifuga

GeneAmp® PCR System 9700

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

3.2. Metode

3.2.1. Uzimanje uzoraka za analizu

Za početak samog dokazivanja očinstva ili majčinstva potrebno je pravilno uzeti uzorke od potencijalnog oca i majke te djeteta. U ovom radu, kao materijali za daljnju obradu, korišteni su brisevi bukalne sluznice 3 osobe koje su vrlo vjerojatno u rodbinskim odnosima.

Bris bukalne sluznice se uzima pomoću vatiranih štapića koji se nalaze u sterilnoj transportnoj kolekcijskoj tubi. Bitno je da transportna podloga bude tvornički zapakirana i prethodno neotvarana kako ne bi došlo do kontaminacije koja bi utjecala na rezultate rada. Da bi se spriječila kontaminacija, također, tijekom cijelog postupka osoba koja uzima uzorak treba koristiti zaštitne rukavice, te masku. Prije samog uzorkovanja potrebno je na tubu napisati osnovne podatke o ispitaniku, odnosno, ime i prezime ispitanika, vrstu uzorka, ustanovu u kojoj se provodi analiza, te datum uzimanja uzorka. [12]



Slika 2. Uzimanje uzoraka brisa bukalne sluznice za potrebe utvrđivanja srodstva.

Nakon što je sve pripremljeno za uzorkovanje, ispitanik treba otvoriti usta, a tada osoba koja uzima uzorak provjerava jesu li ispitanikova usta prazna te vrhom štapića prolazi rotirajućim pokretima po bukalnoj sluznici oko 5-10 sekundi, pokušavajući uzeti što više materijala. Nakon što je procijenjeno da postoji dovoljna količina uzorka, bris se vadi iz usta ali pazeći da se ne dotaknu ostale površine kao što su zubi i usne. Stavlja se u njegovu transportnu podlogu te se čuva na sobnoj temperaturi ili u frižideru do upotrebe i testiranja. [12]

3.2.2. Priprema uzorka za izolaciju DNA

Nakon što je uzorak pravilno uzet i dostavljen u laboratorij, potrebno ga je pripremiti za daljnju obradu. Cijeli postupak pripreme uzorka se obavlja u digestoru i pod strogom zaštitom od ikakve kontaminacije. Ukoliko je cijela površina spremna za rad, uzorak se vadi na čistu podlogu te se uzima zapakirani sterilni nožić pomoću kojega se odreže vrh brisa. Uzorak se stavlja u tubu od 1,5 mL te mu se dodaje 200 μ L Chelex® ekstrakcijskog pufera, 7 μ L DTT, i 3 μ L proteinaze K. Tube se vorteksiraju oko 10 sekundi, a potom se inkubiraju na 56 °C 30 minuta te se nakon toga ponovno vorteksiraju 10-ak sekundi i stavljaju u vruću vodenu kupelj na 8 minuta. Nakon inkubacije slijedi ponovno vorteksiranje, a potom i centrifugiranje u mikrocentrifugi na maksimalnoj brzini u trajanju od 3 minute. Ovako pripremljen uzorak se čuva na 4 °C ili smrznut, te je spreman za daljnje postupke i analizu. [13]

3.2.3. Priprema uzorka za PCR i PCR postupci

Nakon ekstrakcije DNA iz uzorka slijedi priprema za PCR. Kod pripreme za PCR koristi se AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit koji se sastoji od AmpFLSTR® Identifiler® Plus Master Mix, AmpFLSTR® Identifiler Plus Primer Set, AmpFLSTR® Identifiler® Plus Control DNA 9947A. U PCR Eppendorf tubicu se stavlja 2,5 μ L AmpFLSTR® Identifiler® Plus Master Mix, 1,25 μ L AmpFLSTR® Identifiler Plus Primer Set, 0,3 uzorka te 2,2 μ L ddH₂O koja će razrijediti DNA.

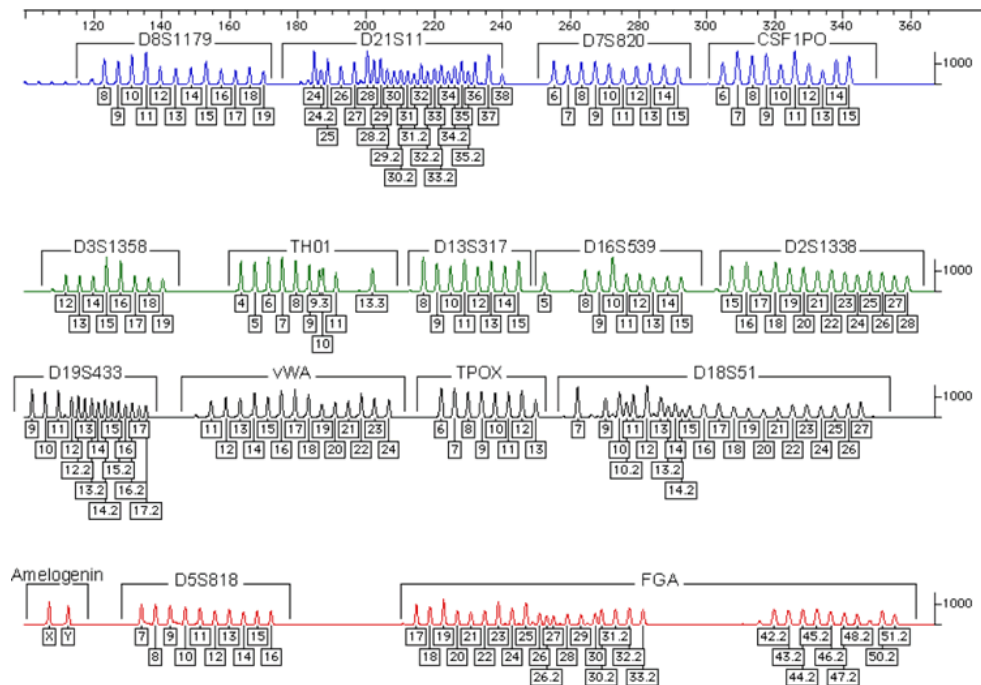
Također, uz pripremljene uzorke za PCR analizu potrebno je napraviti negativnu i pozitivnu kontrolu. U obadviije kontrole stavlja se ista količina Identifiler® Plus Master Mix i AmpFLSTR® Identifiler Plus Primer Set, dok se u pozitivnu kontrolu umjesto uzorka stavlja 0,5 µL AmpFLSTR® Identifiler® Plus Control DNA 9947A u negativnu kontrolu, umjesto uzorka, stavlja se 2 µL ddH₂O. [14]

Pripremljeni uzorci se stavljaju u GeneAmp® PCR System 9700 i slijedi promjena temperatura u određenom vremenu. PCR program glasi: 11 minuta na 95 °C, 20 sekundi na 94 °C, 3 minute na 59 °C, 10 minuta na 60 °C. Nakon ovog protokola, uzorak ostaje na 4 °C do pripreme za sekvenciranje. [14]

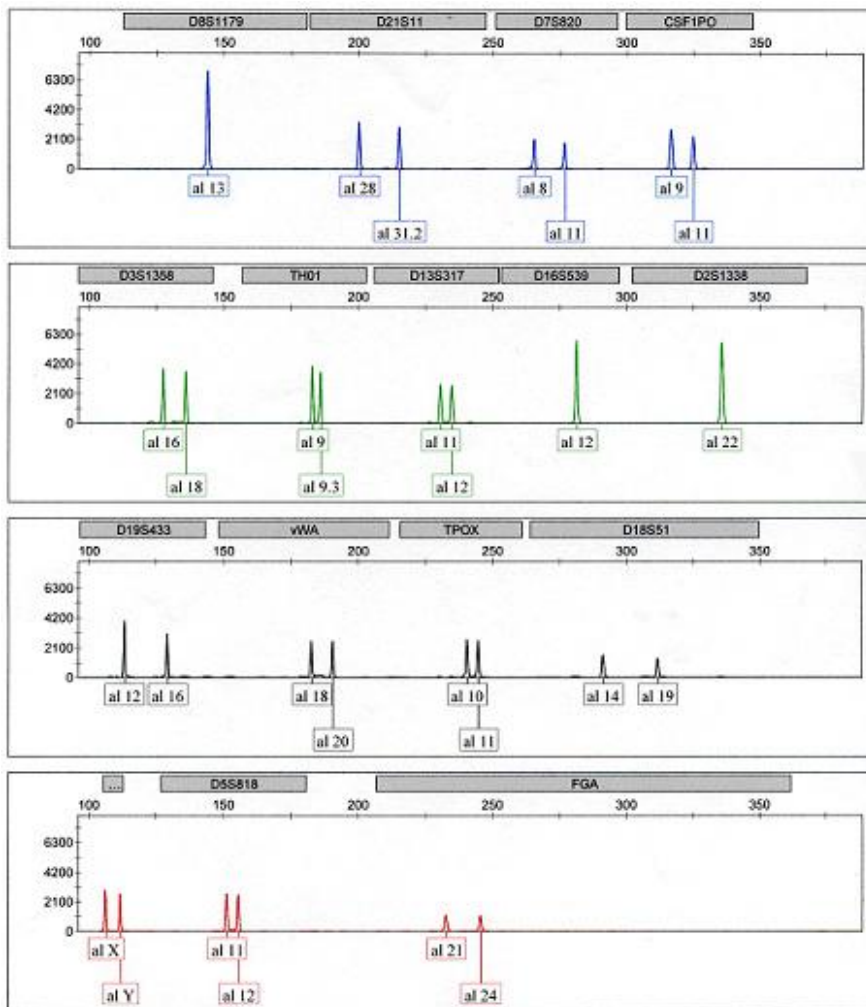
3.2.4. Priprema uzoraka za razdvajanje DNA ulomaka

U prikladne tubice se dodaje 12 µL Hi-Di™ Formamide, 0,5 µL GeneScan™ –500 LIZ® (Size Standard koji uzorak razdvaja prema veličinama izraženim u pb), te 2,5 µL amplificiranog uzorka. Sve se zajedno promiješa te se stavlja na 95 °C 3 minute da se DNA molekula denaturira. Nakon toga se uzorak stavlja 3 minute na led da DNA molekula ostane denaturirana za razdvajanje. Potom se cijela količina prebaci u nove tubice, i u instrument ABI Prism 310, za razdvajanje DNA ulomaka. Nakon toga rezultati se obrade GeneMapper® ID software-om verzije 3.2. [15]

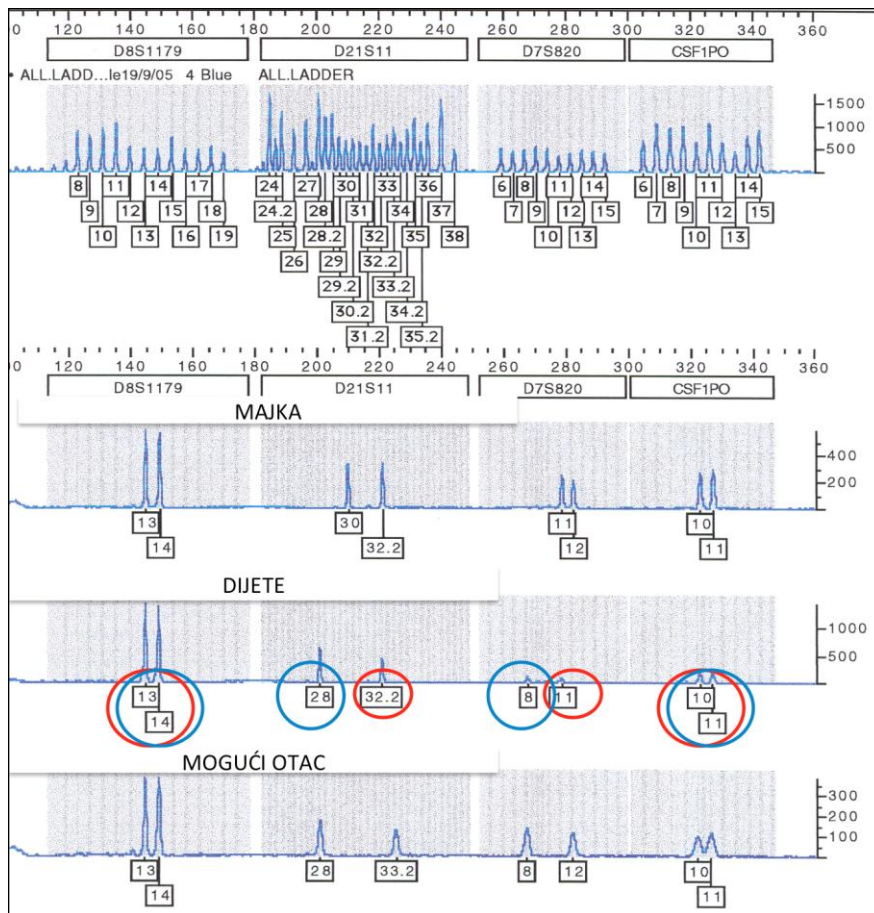
5. REZULTATI



Slika 3. Prikaz ljestvice alela kompleta - AmpFISTR Identifiler Kit. U sastavu se nalazi 15 biljega (*lokusa*) i lokus za određivanje spola - Amelogenin. U svakom lokusu naveden je popis mogućih alela.



Slika 4. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka muške osobe umnožene u kompletu - AmpFlSTR Identifiler Kit.



Slika 5. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka majke, djeteta i mogućeg oca, a u svrhu dokazivanja očinstva. Uzorci su umnoženi u kompletu - AmpFISTR Identifier Kit.

Nizom napravljenih analiza genskih lokusa na uzorcima brisa bukalne sluznice *majke (M)*, , *djeteta (D)* i, mogućeg oca (*MO*), dobiveni su slijedeći rezultati (Tablica br. 1):

Lokus/Aleli	M	D	MO	naslijeđeni alel
D8S1179	11 14	14 15	13 15	15
D21S11	28 32.2	30 32.2	30 31	30
D7S820	10 12	12 12	12 12	12
CSF1PO	11 12	12 12	12 12	12
D3S1358	16 16	16 17	17 18	17
TH01	6 8	6 9	9 9.3	9
D13S317	11 13	11 11	11 11	11
D16S539	11 13	11 13	11 12	11
D2S1338	17 27	17 17	17 23	17
D19S433	13 15.2	13 15.2	13 15	13
VWa	17 17	17 17	17 17	17
TPOX	8 11	8 11	11 11	11
D5S818	11 12	11 12	11 13	11
FGA	21 25	21 25	21 22	21
Amelogenin	X X	X X	X Y	X

4.1. ZAKLJUČAK REZULTATA

Nakon provedene analize genskih lokusa i slijedom utvrđenih kriterija o prosudbi biološkog očinstva, utvrđeno je da je MO biološki otac djetetu D, s vjerojatnošću 99,99997 %.

Vjerojatnost nalaženja istog genotipa utvrđenog za xy u općoj populaciji Hrvatske (a za alele prenijete na dijete) je 1 : 598 736.

5. RASPRAVA

Slika prikazuje rezultate za 4 ispitivana lokusa. Prva linija prikazuje ljestvicu mogućih alela, dok druga, treća i četvrta linija redom pokazuju rezultate za majku, dijete i mogućeg oca.

Usporedbom svakog pojedinog lokusa odredi se što je dijete naslijedilo od roditelja. Najprije se odredi što je dijete naslijedilo od majke (koja nije sporna), a preostali alel je naslijeđen od biološkog oca. Npr. u lokusu D8S1179 dijete ima alele 13 i 14. Kako oba roditelja posjeduju istu kombinaciju, pretpostavka je da je jedan naslijeđen od jednog roditelja, a drugi od drugog roditelja. U lokusu D7S820 dijete ima alele 8 i 11. Od majke je naslijedilo alel 11 što znači da onaj preostali, tj. 8, mora posjedovati njegov biološki otac, a što u ovom slučaju i je. Na isti način se radi analiza u svakom ispitivanom lokusu. Ako se po tom principu za svaki lokus odredi podudarnost djeteta sa naslijeđenim alelima majke i oca, onda se kaže da se ispitivana osoba uključuje kao biološki otac tom djetetu. Kod takvih slučajeva, uključjenja, izračuna se statistička vjerojatnost.

Na ovakav isti način, kao što je opisan u prethodnom slučaju kod slike 5., vršimo dokazivanje očinstva za sve ispitivane lokuse (prikaz rezultata u tablici broj 1). Uspoređuju se genski lokusi majke (M), djeteta (D) te mogućeg oca (MO). Budući da se pretpostavlja da je majka zaista majka djetetu, tj. nije sporno majčinstvo, prvo se uspoređuju djetetovi rezultati s majčinim, a zatim preostali djetetovi sa alelima svih ispitivanih lokusa mogućeg oca. Nakon usporedbe svih lokusa, može se uvidjeti da se svi aleli ispitivanih lokusa između ispitanika poklapaju i može se sigurnošću tvrditi da je pretpostavljeni otac zaista otac djetetu, te se on kao takav uključuje kao biološki otac.

U analizi utvrđivanja očinstva statistički se računa vjerojatnost srodstva, koja mora biti viša od 99,9999% te vjerojatnost nalaženja istog genotipa u općoj populaciji, a utvrđenog za

moćeg oca (obzirom na alele prenjete na dijete). Primjer, ako je ta vrijednost 1 : 4 500 000, znači da je vjerojatnost pronalaska samo jedne osobe s tim određenim genotipom u odnosu na populaciju od 4 500 000 potencijalnih stanovnika.

Statistički izračun je proces kojim se oblikuje rezultat u svrhu davanja različitih oblika vjerojatnosti srodstva, očinstva, majčinstva ili drugih rodbinskih relacija ovisno o DNA zahtjevu.

5. ZAKLJUČCI

- Ako se za svaki lokus odredi podudarnost djeteta sa naslijeđenim alelima majke i oca, onda se kaže da se ispitivana osoba **uključuje kao biološki otac** tom djetetu. Kod takvih slučajeva, uključenja, izračuna se statistička vjerojatnost.
- Ukoliko postoji 2 ili više čvrstih isključenja (više odstupanja od jednog alela) onda se kaže da se ispitivana osoba **isključuje kao biološki otac** tom djetetu.
- Analiza DNA, ako se poštuju pravila struke, je pouzdana metoda za određivanje majčinstva/očinstva.

7. LITERATURA

1. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. U: Primorac D i ur. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
2. Ma H, Zhu H, Guan F, Cherng S. Paternity Testing. Journal of American Science. 2006; 2(4): 76- 92.
3. Sutlović D, Defins- Gojanović M. Priručnik o uporabi analize DNA u sudsko- medicinskoj praksi. Split: Redak; 2015.
4. Pravilnik o načinu uzimanja uzoraka biološkog materijala i provođenja molekularno genetske analize. Narodne novine, br. 152/08, 76/09, 80/11, 121/11, 91/12, 143/12, 56/13 i 145/13 i 120/14.
5. Praveen Kumar ST, Aswath N. DNA isolation from teeth by organic extraction and identification of sex of the individual by analyzing the AMEL gene marker using PCR. J Forensic Dent Sci. 2016 Jan- Apr; 8(1): 18- 21.
6. QIAquick® Gel Extraction Kit, Quick- Start Protocol, 2015.
7. Abramović Ristov A. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. str. 361- 366
8. Polymerase Chain Reaction (PCR). Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
9. Cox TM, Sinclair J. Molekularna biologija u medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. str.: 46- 58
10. Macan M, Uvodić P, Botica V. Paternity Testing in Testing of Brother- sister Incest. Croat Med J. 2003; 44(3): 347- 349.
11. AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4427368>
12. Giamanco CM. Collecting a Buccal Swab- an Art or a Cinch?. Human Identification Technologies, Inc. Dostupno na: <http://www.hitdna.com/images/PDFs/publications/Taking%20a%20Buccal%20Swab.pdf>
13. Saliva from oral swabs, filter paper or gauze- protokol iz laboratorija za sudsku medicinu KBC Split
14. Protokol za PCR iz laboratorija za sudsku medicinu KBC Split

15. ABI Prism® 310 Genetic Analyzer, User Guide, 2001.

16. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb: Školska knjiga; 2013.

8. SAŽETCI

8.1. Sažetak

Ciljevi rada:

Osnovni cilj ovog rada je analizom DNA molekule dokazati te izračunati vjerojatnost očinstva iz dobivenih uzoraka osoba koje su vrlo vjerojatno u srodstvu.

Metode:

Nakon uzimanja uzoraka brisom bukalne sluznice, iz uzoraka je izolirana DNA molekula pomoću metode sa Chelex®, a zatim je ta ista DNA molekula umnožena metodom lančane reakcije polimerazom, odnosno PCR metodom. Umnožena DNA se razdvaja na ulomke pomoću ABI Prism 310 instrumenta, a na kraju se rezultati očitavaju, uspoređuju te se izračunava statistička vjerojatnost.

Rezultati:

Nizom analiza genskih lokusa pretpostavljenog oca, majke te djeteta, dokazano je da je mogući otac uistinu otac djetetu sa vjerojatnošću 99,99997 %, te se kao takav uključuje kao biološki otac.

Zaključci:

Nakon pravilne analize DNA te dobivenih rezultata, ukoliko postoji podudarnost između genskih lokusa djeteta i mogućeg oca, govori se o uključenju ispitivane osobe kao oca, a u suprotnom slučaju, ukoliko se rezultati razlikuju u 2 ili više lokusa, radi se o isključenju.

Ključne riječi:

DNA molekula, geni, PCR, dokazivanje očinstva

8.2. Abstract

Objective:

The main aim of this work is to prove and calculate the probability of paternity by analyzing the DNA molecule from the samples received of people who are probably related.

Methods:

After sampling buccal swab, DNA molecule was first isolated by Chelex® method and then amplified by polymerase chain reaction, or PCR method. The amplified DNA is separated into fractions using an ABI Prism 310 instruments, and finally, the results are read, comparing and calculating the statistical probability.

Results:

Series of analyzes of genetic loci presumed father, mother and child have proved that the potential father truly is the father of a child with a probability of 99.99997%, and as such includes as the biological father .

Findings:

After the correct DNA analysis and the results, if there is a correspondence between genetic loci of child and possible father, we consider it as the inclusion of test person as a father, and in the opposite case, if the results are different in two or more loci, it's about exclusion.

Key words:

DNA molecule, genes, PCR, paternity testing

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Anamarija Milardović

Datum i mjesto rođenja: 29. rujna 1994., Split

Adresa: Medvidovića Draga 84, 21 260 Imotski, Hrvatska

E- mail: anamarija.milardovic2@gmail.com

Telefon: 021/ 841 – 243

Mobitel: 099/ 411 – 8801

Obrazovanje:

2001. – 2009. Osnovna škola „Stjepan Radić“, Imotski

2001. – 2007. Škola stranih jezika Eklata, engleski jezik

2009. – 2013. Gimnazija Dr. Mate Ujevića, Imotski, prirodoslovno- matematički smjer

2013. – 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split, smjer medicinsko- laboratorijska dijagnostika

Strani jezici:

Engleski jezik- aktivno znanje

Talijanski jezik- pasivno znanje

Ostale aktivnosti:

2005. – 2011. RK „Imotski sokolovi“, Imotski

2011. – 2012. ŽRK „Imota“, Imotski

Zahvala

Zahvaljujem se mojoj mentorici, prof.dr.sc.Davorki Sutlović, na uloženom trudu, stručnoj pomoći i potpori prilikom izrade ovoga završnoga rada.

Zahvaljujem se gospođi Boji Režić na nesebičnoj pomoći i ljubaznosti koju mi je pružila prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela ovoga rada

Zahvaljujem se obitelji, prijateljima i kolegama na svojoj podršci koju su mi pružili.