Analiza mješavina sekvencioniranjem nove generacije hipervarijabilnih regija mitohondrijske DNA

**Cilj** Primijeniti masivno paralelno i klonalno sekvencioniranje (sekvencioniranje nove generacije, prema engl. *next generation sequencing, NGS*) za analizu forenzičkih miješanih uzoraka.

**Postupci** Dupleks lančane reakcije polimeraze (prema engl. *polymerase chain reaction, PCR*) usmjerena na hipervarijabilne regije I/II (HVI/HVII) mitohondrijske DNA (mtDNA) korištena je kao priprema za NGS analizu na uređaju Roche 454 GS Junior. Koristili smo osam setova 454-fuzijskih primera tagiranih multipleks označivačima u kombinatoričkom pristupu za paralelnu amplifikaciju i dubinsko sekvencioniranje do 64 uzorka.

**Rezultati** Ovaj test pokazao je visoku osjetljivost za sekvencioniranje ograničenih količina DNA ( ~ 100 mtDNA kopija) i za analizu spravljenih ili bioloških mješavina s niskom razinom varijanti ( ~ 1%) kao i kompleksnih mješavina (≥3 prinosnika). Pri analizi miješanih uzoraka primijetili smo nisku razinu (<2%) PCR artefaktnih „hibridnih” sekvenci koje su nastale „skačućom“ PCR (eng, jumping PCR) ili promjenom obrasca i koje se mogu eliminirati smanjenjem broja ciklusa PCR.

**Zaključak** Ovo istraživanje pokazuje snagu NGS tehnologije usmjerene na mtDNA HVI/HVII regije za analizu zahtjevnih forenzičkih uzoraka i uzoraka s ograničenom količinom DNA.