

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Metody molekulární genetiky v kriminalistice

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Vladimír SEMECKÝ, CSc.

Hradec Králové 2010

Kateřina Hynčicová

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové, dne 10. 5. 2010

Kateřina Hynčicová

Poděkování

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za vedení a cenné rady při přípravě a psaní této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Kateřina Hynčicová

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír SEMECKÝ, CSc.

Název bakalářské práce: Metody molekulární genetiky v kriminalistice

Cílem této bakalářské práce je přinést přehledný a souhrnný pohled na využití genetiky v kriminalistice. Obsah práce se skládá ze dvou částí. Teoretická první část je zaměřená na základní informace o DNA, její historii, vývoj a druhy biologických materiálů vhodných ke zkoumání. Druhá část je část metodická, která se dotýká problematiky analýzy prováděné a zpracovávané na pracovišti Policie ČR.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Kateřina Hynčicová

Supervisor: Doc. RNDr. Vladimír SEMECKÝ, CSc.

Title of bachelor thesis: Methods of molecular genetic in kriminology

The aim of this Bachelor's thesis is to give a comprehensive and clear perspective into the use of genetics in forensic science. The content is comprised of two parts. The first theoretical part is concentrated on information about DNA, its history, development and types of biological materials suitable for forensic casework. The second one is methodical, addressing issues of the analysis carried out and processed at the workplace of the Police of the Czech Republic

OBSAH

| | | |
|--|--|----|
| Úvod | | 7 |
| Teoretická část | | 9 |
| Kapitola 1. DNA a její počátky v kriminalistice | | 10 |
| 1.1 DNA | | 10 |
| 1.1.1 Rozdělení DNA | | 13 |
| 1.2 Historie DNA | | 13 |
| 1.3 První využití DNA v kriminalistice ve světě | | 16 |
| 1.4 První využití DNA v kriminalistice v ČR | | 17 |
| Kapitola 2. Objekty zkoumání ve forenzní genetice | | 18 |
| 2.1 Druhy biologických materiálů | | 19 |
| 2.2 Biologický srovnávací materiál | | 21 |
| Metodika | | 23 |
| Kapitola 3. Analýza DNA, vyhodnocení a interpretace | | 24 |
| 3.1 Metody izolace DNA ze stop | | 24 |
| 3.1.1 Silikagelové membrány | | 24 |
| 3.1.2 Magnetické částice | | 25 |
| 3.1.3 Chelex®100 | | 26 |
| 3.1.4 Diferenciální lýza | | 26 |
| 3.2 Kity ke speciálním metodám izolace | | 27 |
| 3.2.1 Tissue Hair Kit | | 27 |
| 3.2.2 Differex system | | 27 |
| 3.3 Metody izolace z bukalních stěrů | | 28 |
| 3.4 Metody kvantifikace | | 28 |
| 3.5 Metody amplifikace | | 29 |
| 3.6 Elektroforéza DNA | | 31 |
| 3.7 Speciální analýzy DNA | | 32 |
| 3.7.1 Analýza „Y“ chromozomu | | 32 |
| 3.7.2 Analýza mitochondriální DNA | | 32 |
| 3.8 Vyhodnocení a interpretace výsledků analýzy DNA | | 33 |
| Kapitola 4. Národní databáze DNA | | 35 |
| Kapitola 5. Další využití genetiky | | 36 |
| Závěr | | 37 |
| Seznam použitá literatury | | 38 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|------------------------|---|
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| mtDNA | mitochondriální DNA |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| KÚP | Kriminalistický ústav Praha |
| OKTE | Odbor kriminalistické techniky a expertiz |
| ND DNA | Národní databáze DNA |
| INFO-DNA | informační počítačový systém provozovaný na OKTE a KÚP |
| CODIS | Combined DNA Index Systém |
| ZP PP | závazný pokyn policejního prezidenta |
| BS | bukální stěr – stěr ústní sliznice na tampónu (vatové tyčince) |
| UV | ultrafialové záření |
| <i>In vitro</i> | uměle vytvořené podmínky |
| <i>In vivo</i> | přírodní podmínky |

Úvod

Genetika je mladým, moderním a dynamicky se rozvíjejícím přírodovědným oborem. Její využití v současné době nalzáme v širokém spektru různých oborů, jako např. zdravotnictví, zoologie, botanika, biometrika a v hojné míře i kriminalistika. Genetika, jako přírodovědný obor, a její využití v kriminalistice je v dnešní době hodně sledovaným a diskutovaným tématem. Svůj podíl na tom mají i moderní seriály typu *Kriminálka Las Vegas* apod., které prostřednictvím multimedialních prostředků ovlivňují chápání i význam samotné genetiky a její aplikaci v kriminalistice. Forenzní genetiky, jak se zpravidla využití genetiky v kriminalistice nazývá, je v současné době nesporně jedním z pilířů při objasňování trestné činnosti nejen na území České republiky, ale i v dalších vyspělých zemích celého světa. Důvod, proč tomuto tak je, lze spatřovat v tom, že kriminalistická genetiky jako jeden z mála oborů kriminalistiky umožňuje individuální identifikaci osoby. Individuální identifikace v rámci kriminalistiky byla donedávna výsostnou pravomocí daktyloskopie. Dalším důležitým faktorem vzrůstu zájmu o využití genetiky v kriminalistice je ten, že fakticky neexistuje tzv. dokonalý trestný čin, tj. trestný čin a místo trestného činu, kde by nebyla pachatelem zanechána jakákoli kriminalisticky relevantní stopa. Člověk je vždy, ať už ve větší či menší míře, vylučovatelem biologického materiálu, který zanechává na místě trestného činu. Jakákoli, i jediná, buňka zanechaná na místě činu a v ní zachovaný genetický kód je nositelem důležitých individuálních informací o osobě možného pachatele. Je jen otázkou času, kdy další rozvoj moderní techniky umožní genetické zkoumání jen jediné buňky, což bude pro kriminalistickou genetiky další velký pokrok. Zkoumáním jedné jediné buňky zanechané na místě trestného činu by kriminalistická genetiky naplnila další aspekt kriminalistiky, kterým je práce s minimálním (mikroskopickým) množstvím materiálu zanechaným na místě trestného činu. I tak již v dnešní době kriminalistická genetiky umožňuje zkoumání velmi malého až minimálního množství biologického materiálu, ve kterém je možno najít pouze několik desítek až stovek buněk.

Jak již bylo uvedeno výše, je genetiky mladým přírodovědným oborem a tedy i její využití v kriminalistice má krátké kořeny. Počátky genetiky se objevují v druhé polovině 19. století. Do oboru kriminalistiky se však genetiky začleňuje až mnohem poz-

ději, a to v době okolo devadesátých let 20. století. V České republice byl první případ využití genetiky v kriminalistice zaznamenán v roce 1992.

Kriminalistická genetik, jako odvětví oboru kriminalistiky, je v boji proti zločinu velmi mladým bratrem daktyloskopie, jak v ČR, tak i v zahraničí. Přesto si v kriminalistice vybojovala velmi silné postavení a dostalo se jí velmi rychlého přijetí v rámci prověřování a vyšetřování trestné činnosti a kriminalisticky relevantních událostí. To dokladuje i fakt, že v poslední době dochází k rychlému nárůstu počtu provedených genetických zkoumání nejen u nás, ale i v zahraničí, a také k prudkému rozvoji nových přístrojů, metod a postupů.

Vzhledem k tomu, že kriminalistická genetik je u nás ještě mladým odvětvím a do podvědomí lidí v České republice se dostává spíše prostřednictvím pochybných televizních seriálů a bulvárních časopisů, nebo reportáží, než odbornou diskusí a pomocí odborných publikací, kterých do současné doby nebylo mnoho napsáno, je nasnadě, abych se touto cestou pokusila o zpracování krátkého, ale uceleného přehledu, který by shrnul základní principy, návody a postupy používané na pracovištích zabývajících se kriminalistickou genetikou v rámci forenzní praxe. Z tohoto důvodu bude má práce pojednávat o postupech práce na pracovištích Policie České republiky, kterými jsou Kriminalistický ústav Praha a pracoviště Odborů kriminalistické techniky a expertíz krajských správ Policie České republiky.

TEORETICKÁ ČÁST

1. DNA v kriminalistice

1.1 DNA

DNA neboli kyselina deoxyribonukleová (z anglického názvu „deoxyribo-nucleic acid“)¹ je jedním ze základních stavebních kamenů živých organismů a hraje klíčovou úlohu v přenosu genetické informace. Nachází se v buněčném jádře a v některých dalších buněčných organelách.

Jedná se o dlouhý polymer složený z tzv. nukleotidů, který kóduje sekvenci aminokyselinových zbytků v proteinech tím, že využívá genetický kód (tripletový kód nukleotidů). DNA je tvořena dvěma dlouhými polynukleotidovými vlákny stočenými do tzv. „dvojitě šroubovice“ (z angl. double helix). Obě vlákna jsou též nazývána „řetězce“ DNA. Tato vlákna jsou složena ze sekvence podjednotek (nukleotidů) spojených k sobě navzájem chemickou vazbou, vodíkovými můstky. Polynukleotidová vlákna jsou tvořena čtyřmi typy nukleotidových podjednotek. Každá nukleotidová podjednotka obsahuje dusíkatou bázi (heterocyklus s uhlíkovými a dusíkovými atomy), která je navázána na pětiuhlíkový sacharid „deoxyribózu“ (monosacharid 2-deoxy-β-D-ribóza)² a zbytek kyseliny fosforečné (PO₄³⁻).

Dusíkaté báze navázané na deoxyribózu jsou: cytosin – „C“, thymin – „T“, adenin – „A“ a guanin – „G“. Báze jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od purinu nebo pyrimidinu. K purinovým bázím řadíme adenin a guanin, k pyrimidinovým bázím řadíme cytosin a thymin³. Uvedené báze navázané na sacharid deoxyribózu tvoří tzv. nukleosid, který pak spojením se zbytkem kyseliny fosforečné tvoří nukleotid. Tyto nukleotidy jsou poté označovány symboly A, G, C, T.

Nukleotidy se mohou párovat za pomoci vodíkových můstků. Párování se řídí komplementaritou bází, kdy adenin se vždy páruje s thyminem (A-T) dvěma vodíkovými vazbami a guanin s cytosinem (G-C) se páruje třemi vodíkovými vazbami, při-

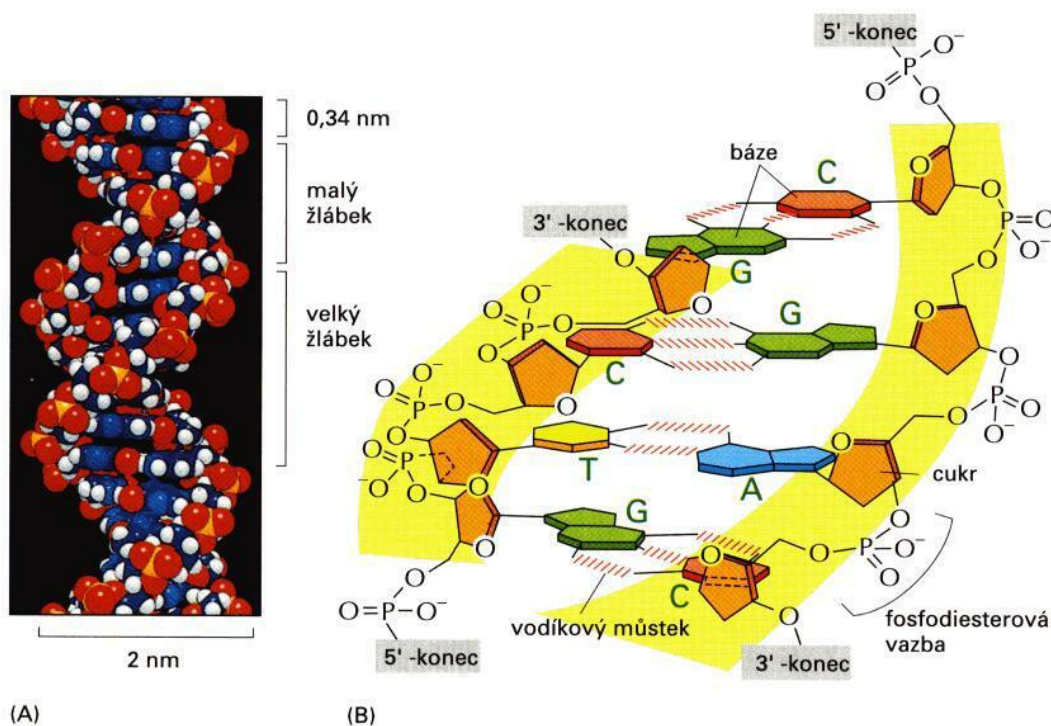
¹ KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, str. 11

² KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, str. 33

³ KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, str. 35

čemž DNA obsahuje stejný počet adeninových a thyminových zbytků a stejný počet guaninových a cytosinových zbytků.

Polynukleotidové řetězce v DNA jsou antiparalelní, což znamená, že jeden řetězec DNA je orientován ve směru 5' - 3' a druhý řetězec zase ve směru 3' - 5'. Molekula DNA je charakterizována primární, sekundární a terciární strukturou.



Obr. č. 1 Model DNA⁴

Primární struktura DNA

Je dána pořadím nukleotidů, které jsou do polynukleotidového řetězce vázané 3',5' fosfodiesterovou vazbou a tato struktura přímo určuje genetickou informaci. Nukleotidy se od sebe liší vždy jen přítomností rozdílné báze. Primární strukturu DNA je možné zapsat například jako ATCGTCG nebo 5' - ATCGTCG - 3'.

Sekundární struktura DNA

Tuto strukturu tvoří dva polynukleotidové řetězce spletené většinou do pravotočivé dvojšroubovice, tzv. dvojité - α helix. Tato struktura je poměrně stabilní. Stabilitu sekundární struktury dodávají vodíkové vazby, kterými se vážou dvojice dusíkatých

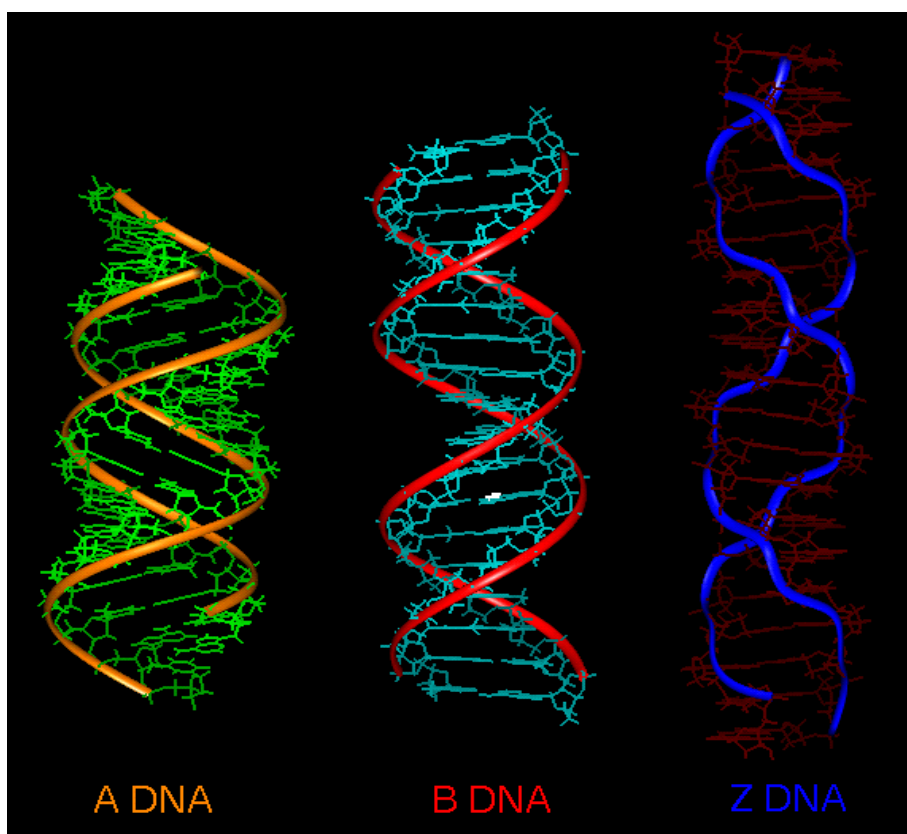
⁴ www.gymnazium.ji.cz/docs/sipvz/chemie/vyssi/.../27nukleo.ppt

bází na principu komplementarity. Báze směřují dovnitř dvoušroubovice, jsou kolmé na její osu a obě strany pak tvoří kostra z fosfátů a deoxyribóz. Forma stočení dvoušroubovice není vždy a za všech podmínek stejná. In vitro je většina DNA ve formě „**B**“, in vivo se však za určitých podmínek vyskytuje i v jiné formě.

Forma „**B**“ je nejběžnější pravotočivá forma (popsaná Watsonem a Crickem), kdy na jeden závit šroubovice připadá 10 párů nukleotidů. Na šroubovici jsou velké a malé žlábký (viz obr. č. 1), které umožňují interakci s bílkoviny, čímž dochází ke zkroucení řetězce do kompaktnějšího tvaru.

Forma „**A**“ je pravotočivá a na jeden závit šroubovice připadá 11 párů nukleotidů.

Forma „**Z**“ je levotočivá a na jeden závit šroubovice připadá 12 párů nukleotidů. Řetězce se v tomto případě na osu nenavíjejí plynule, ale trhaně – „cik-cak“⁵. Tato forma je nejméně stabilní.



Obr. č. 2 Formy stočení DNA⁶

⁵ VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. Academia. PRAHA 1999, str. 101

⁶ www.ncbr.chemi.muni.cz/~evaf/c7925/parovani.ppt

Terciární struktura DNA

Tato struktura je určena prostorovým uspořádáním šroubovice. Příkladem terciární struktury jsou chromosomy. Chromosomy jsou specifické barvitelné buněčné struktury eukaryont přítomné v jádře. Skládají se z DNA a histonů a jejich existence má usnadnit rovnoměrné rozdělení genetické informace do dceřiných buněk⁷.

1.1.1 Rozdělení DNA

Kódující DNA

Tvoří asi 2% celé DNA v organismu člověka. Genetické informace přenáší geny. Gen je konkrétní úsek DNA o konkrétní sekvenci nukleotidů. Geny jsou nositeli vnitřních (genotyp) a vnějších (fenotyp) dědičných znaků a vlastností.

Nekódující DNA

Tato DNA nenese žádnou genetickou informaci dědičnosti a proměnlivosti. Tvoří 98% celé DNA. Její význam je zatím nejasný. Z hlediska kriminalistiky má však v současné době nejdůležitější význam.

1.2 Historie DNA

Genetika jako vědecký obor molekulární biologie se začínala formovat v období konce 19. století. Největší rozmach tohoto oboru pak nastal v období druhé poloviny 20. století. Genetika v tomto období dosáhla velkých pokroků a získala si popularitu mezi velkým počtem biologických pracovníků po celém světě.

Za zakladatele genetiky je považován opat augustiniánského kláštera v Brně **Johann Gregor MENDEL** (1822 – 1884). Mendel byl první, kdo nehodnotil organismus jako celek, ale rozložil ho na jednotlivé znaky. V letech 1856 – 1863 se zabýval křížením hrachu a sledováním jeho potomstva. Své pokusy prováděl mezi vyšlechtěnými liniemi hrachu setého (*Pisum sativum*), poskytujícími potomstvo se stejnými znaky jako mají rodiče). Mezi znaky, které sledoval, patřily například tvar semen, barva semen, barva květů, a jiné. Křížením druhů rostlin dospěl k závěrům, z nichž vyvodil a definoval tři principy známé jako „Mendelovy zákony dědičnosti“⁸. Při tomto jako je-

⁷ <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromozom>

⁸ I. Mendelův zákon – zákon o uniformitě hybridů F1 generace homozygotů

den z prvních použil, ve svém díle „*Pokusy s rostlinnými kříženci*“⁹ (1866), biostatistické metody. Mendelovy pokusy a jeho dílo však ve své době neměly velký ohlas a byly spíše zapomenuty.

Po vydání Mendelovy práce se dostává genetik na delší čas do útlumu. Ke znovuoobjevení genetiky jako plnohodnotného vědního oboru a jejího připomenutí a potvrzení Mendelovy práce došlo až na počátku 20. století. Toto období je spojeno s třemi profesory **Hugo de VRIESEM** (1848 – 1935), **Erichem von TSCHERMAKEM** (1871 – 1962) a **Carlem Erichem CORRENSEM** (1864 – 1933), kteří nezávisle na sobě při svých výzkumech použili Mendelovy principy a následně je potvrdili. Holandský profesor de Vries je dnes považován za zakladatele nauky o genetických mutacích. Rakouský profesor Tschermak se stal průkopníkem aplikované genetiky díky aplikaci Mendelových zákonů do praxe. Díky jejich práci dochází k nastartování období, které je označováno jako „doba genetiky“.

Autorem definice molekulární biologie je anglický biolog **William Thomas ASTBURY** (1898 – 1961) - „*Molekulární biologií se rozumí vědní obor, který zkoumá strukturu biologických makromolekul, především informačních makromolekul, jejich interakce a uspořádání v živém systému ve vztahu k jejich funkci v základních životních dějích*“.¹⁰

V roce 1896 se německému chemikovi jménem **Johannes Friedrich MIESCHER** (1844-1895), podařilo z bílých krvinek obsažených v hnisu vyizolovat látku tvořící buněčné jádro kterou pojmenoval „nuklein“ (název „deoxyribonukleová kyselina“, resp. „DNA“ byl pro tuto sloučeninu zaveden až o několik desetiletí později¹¹). Tento vyizolovaný vzorek, ale nebyl v takové kvalitě a čistotě, aby jej bylo možno dále zkoumat.

V roce 1933 získal Nobelovu cenu první genetik **Thomas Hunt MORGAN** (1866 – 1945). Thomas Morgan přinesl nové poznatky o genech a genové vazbě. Zabýval se také strukturou chromozómů a uložením genů v nich.

Molekulární strukturu DNA se podařilo prokázat dvěma mladým spolupracovníkům. Americký biolog **James Dewey WATSON** (narozen 1928) a britský fyzik **Fran-**

II. Mendelův zákon – zákon o čistotě a segregaci vloh

III. Mendelův zákon – zákon o volné kombinovatelnosti vloh

⁹ v originále psáno německy „*Versuche über Pflanzen – Hybriden*“

¹⁰ ROZSYPAL, S., a kol. *Molekulární genetika*. Státní pedagogické nakladatelství n.p. v Praze, PRAHA 1983, str. 9-10

¹¹ KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, str. 33

cis **Harry Compton CRICK** (1916 – 2004) roku 1953 předložili strukturní model dvoušroubovice DNA. Dospěli k závěru, že DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci, které jsou navzájem propojeny vodíkovými můstky mezi dusíkatými bázemi. Při své práci vycházeli z perfektně provedené rentgenové studie krystalických preparátů DNA, pořízených **Mauricem Hughem Frederickem WILKINSNEM** (narozen 1916) a **Rosalindou Elsie FRANKLINOVOU** (1920 – 1958). Jimi vytvořeným modelem vstoupila biologie do nové éry. V roce 1962 Watson, Crick a Wilkins získali za tento objev Nobelovu cenu za medicínu.

V roce 1956 americký vědec **Arthur KORNBERG** (1918 - 2007) izoloval první enzym „DNA polymerázu“ a dokázal, že za přítomnosti tohoto enzymu dochází k polymeraci DNA *in vitro* („ve skle“ – práce s organizmy a jejich částmi v umělých laboratorních podmínkách). Při polymeraci DNA vznikají z malých úseků DNA úseky dlouhé, které jsou více vhodné k dalšímu zkoumání. V roce 1959 byla Kornbergovi udělena za tento objev Nobelova cena v oboru lékařství a fyziologie.

V následujícím období až do konce 20. století došlo k řadě dalších objevů a genetika našla uplatnění ve spoustě vědních oborů. Z hlediska forenzní genetiky jich je důležitých hned několik. Jedním z těchto objevů byla možnost sekvencování. Tuto metodu koncem sedmdesátých let nezávisle na sobě vyvinuli Američan **Walter GILBERT** (narozen 1932) a Brit **Fred SANGER** (narozen 1918). Gilbert je zakladatelem chemické metody a Sanger enzymové metody sekvenování.

Významnou událostí pro forenzní genetiku byl rok 1983 kdy **Kary B. MULLIS** (narozen 1944) objevil metodu nazvanou PCR, neboli "*polymerázová řetězová reakce*"¹². Metoda PCR umožňuje množení vybraného úseku DNA *in vitro* bez živých organizmů. Objev řetězové polymerázové reakce předznamenal prudký vývoj molekulární biologie a umožnil rozšíření její praktické aplikace. Za tento objev získal Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu.

Výrazným mezníkem byl také objev systému identifikace jedinců pomocí DNA z biologického materiálu, čímž se výrazně posunuly možnosti nejen vědy, ale i kriminalistiky. K tomuto objevu dospěl v roce 1985 britský genetik **Alec JEFFREYS** (narozen 1950). Ke svému objevu přišel náhodou, při studiu svalového proteinu myoglobinu a genů, které ho kódují u různých savců. Geny pro tento protein hledal v celé genetické

¹² *P*olymerase *C*hain *R*eaction (**PCR**)

informaci na základě opakujících se nukleotidových sekvencí, které se nacházejí v okolí tohoto genu. Zjistil, že pozice genu je u různých druhů živočichů různá. Výsledek, který získal zpracováním lidské DNA, se ale od ostatních vzorků lišil. Bylo zřejmé, že zvolené opakující se sekvence se nacházejí na různých místech lidského genomu, a co víc - liší se u jednotlivců. Zpočátku tomu odmítal uvěřit, ale každý další vzorek ho přesvědčoval o správnosti jeho tvrzení. Z jeho objevu se postupně vyvinula metoda detekce individuálních rozdílů mezi dědičnou informací různých lidí, která vešla do obecného povědomí jako „*DNA fingerprinting*“¹³. Tato metoda je dnes využívána nejen v kriminalistice, soudním lékařství, při určování rodičovství, ale také v chovatelství a dalších oborech.

1.3 První využití DNA v kriminalistice ve světě

První využití metody DNA fingerprinting provedl v roce 1987 sám Alec Jeffreys. Díky jeho metodě se podařilo objasnit případ dvou znásilněných a zavražděných dívek. První případ se stal 21. listopadu roku 1983. Tehdy 15letá **Lynda Mannová** odešla na návštěvu svých přátel. Druhý den ráno byla nalezena znásilněná a uškrtená. Na jejím těle bylo nalezeno sperma. Expertizami z odvětví biologie bylo zjištěno, že vrahem je osoba s krevní skupinou A, který má pouze 10% mužů. Dlouhou dobu se nedařilo zjistit pachatele. O necelé tři roky později, 31. července 1986, byla v blízkosti místa vraždy Lindy Mannové nalezena další zavražděná 15letá **Dawn Ashworthová**. Dawn Ashworthová byla rovněž znásilněna a uškrtena. Nalezené sperma na jejím těle vykazovalo shodnou krevní skupinu jako sperma nalezené na těle Lindy Mannové. K činu se tehdy přiznal sedmnáctiletý vrátný z ústavu pro duševně choré, ale popřel, že by měl něco společného s vraždou Lyndy Mannové. Jednalo se o 17letého **Richarda Bucklanda**. Poté byl kontaktován policií Alec Jeffreys, který svou nově vyvinutou metodu použil ke srovnání vzorků z obou případů se vzorkem krve podezřelého Bucklanda. Jeho výsledky byly pro policii překvapením. Jeffreys porovnáním vzorků zjistil, že obě ženy zavraždil stejný pachatel, ale nejednalo se o podezřelého Bucklanda. Následně provedla policie odběr vzorků krve cca pěti tisícům mužů a jejich zpracování trvalo něco okolo šesti měsíců, bohužel bez kladného výsledku. Později byl na základě udání zatčen **Colin Pitchfork**. Jemu odebrané vzorky DNA byly zadány do databáze a porov-

¹³ tento název lze volně přeložit jako „otisk prstu z dědičné informace“

nány s ostatními vzorky. V databázi byla nalezena shoda DNA jeho vzorků se vzorky DNA izolovanými ze spermatu při obou uvedených vraždách. Následně byl Pitchfork odsouzen k dvěma doživotním trestům odnětí svobody.

I přesto, že se metoda hned napoprvé osvědčila, jejímu širšímu využívání zpočátku bránily vysoké náklady a také potřeba relativně velkého množství biologického materiálu pro analýzu. Nicméně i tak se metoda analýzy lidské DNA pro kriminalistické účely postupně rozšířila do ostatních zemí. Jeden z největších rozmachů kriminalistické genetiky nastal v USA. Jen o tři roky později byla analýza lidské DNA úspěšně použita v kriminalistické praxi i v tehdejší Československu. Českoslovenští vědci byli jedni z prvních průkopníků analýzy lidské DNA v kontinentální Evropě.

1.4 První využití DNA v kriminalistice v ČR

Počátky využití DNA v české kriminalistice jsou datovány do roku 1990, do tehdejší Československé republiky. Jsou spojovány s případem vraždy 19leté studentky **Jany Krkoškové** z Masarykovy univerzity v Brně, která byla nalezena bez známek života dne 27. června 1990 na dámské toaletě Pedagogické fakulty. Již z prvního pohledu na tělo oběti bylo zřejmé, že se jedná o vraždu se sexuálním motivem. Na těle oběti bylo při pitvě nalezeno 31 bodnořezných ran. Na místě činu bylo zajištěno velké množství krevních stop. Nejvíce však kriminalisty zaujaly stopy ve formě kapek, které budily dojem, že vznikly otřepáním zakrvácené ruky. Tyto krevní stopy byly zajištěny na jednom místě kachliček a vzniklo podezření, že by se mohlo jednat o krev pachatele zanechanou na místě po jeho zranění nožem. Všechny krevní stopy byly podrobeny biologickému, sérologickému zkoumání. Jejich porovnání a vyhodnocení bylo pro kriminalisty zklamáním, protože jak oběť, tak možný pachatel, který byl zadržen hned druhý den po vraždě, měli stejnou krevní skupinu. Zadržený údajný pachatel **Milan Lubas** díky tomuto zjištění okamžitě žádal o propuštění z vazby. Na základě indicií a rozporů v Lubasových výpovědích se kriminalisté rozhodli požádat o provedení identifikace krevních stop metodou DNA Katedru genetiky a molekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. Na této katedře se prováděla do té doby pouze experimentální analýza lidské DNA. Vedoucí katedry **doc. RNDr. Vladimír FERÁK, CSc.** (1938) se rozhodl analýzu vzorků krevních stop provést. Necelé čtyři měsíce po vraždě byl na světě znalecký posudek, z něhož bylo patrné, že krevní stopy zajištěné z kachliček na WC, vypadající jako by si někdo otřepal ruku, byly skutečně

Milana Lubase. Naopak krevní stopy zajištěné na oděvních svrčcích podezřelého Milana Lubase, konkrétně na ponožkách a riflích, pocházely od oběti. Milan Lubas se ke svému činu nikdy nedoznal. Na základě analýzy DNA byl ale přesto odsouzen na 23 let a dne 4. února 1993 ve vězení spáchal sebevraždu.

Jedním z mezníků české kriminalistiky byl také rok 2004. V tomto roce byl proveden první plošný odběr, tzv. „screening“, bukálních stěrů osob při vyšetřování vraždy **Barbory Němečkové** z Kmětiněvsí. Třináctiletá žačka byla nalezena mrtvá dne 1. ledna 2004. Při tomto případě se podařilo zajistit pouze jednu relevantní stopu. Byla to stopa biologická, popsána jako nečistoty zpod nehtů levé ruky zavražděné. Z této stopy se nakonec podařilo izolovat DNA v dostatečné kvalitě a čistotě. Byl stanoven smíšený DNA profil dvou osob, kdy část tohoto profilu patřila osobě mužského pohlaví. V případě vraždy Barbory Němečkové sehrál velkou roli i fakt, že lidé z blízkého okolí byli nakloněni vyšetřování tohoto případu a dobrovolně odevzdali kriminalistům vzorky své DNA. Po delší době, když ani toto nevedlo k vyřešení případu, byl okruh osob rozšířen i na osoby mladší 15 let. Celkem bylo odebráno a analyzováno okolo 650 vzorků DNA. Teprve profil DNA stanovený ze vzorku s pořadovým číslem 632 se shodoval s profilem stanoveným ze stopy. Vzorek s tímto pořadovým číslem patřil chlapci, kterému v té době ještě nebylo ani patnáct let a byl spolužákem zavražděné dívky. Bylo to v mladé historii české kriminalistické genetiky vůbec poprvé, kdy se veřejnost nebála odevzdat svůj genetický profil na porovnání.

2. Objekty zkoumání ve forenzní genetice

Jediným zkoumaným biologickým materiálem ve forenzní genetice jsou ty materiály lidského původu, v jejichž buňkách zůstalo zachováno buněčné jádro. Nejčastěji to jsou krevní stopy, stopy slin s uvolněnými epiteliálními buňkami z dutiny ústní, epiteliální buňky z pokožky zanechané na místě kontaktu, buňky zachycené na kořincích vlasů, spermie nebo buňky uvolněné v tělních sekretech.

2.1 Druhy biologických materiálů

Krev je suspenze krevních elementů (krvinky a destičky) v koloidním roztoku organických a anorganických sloučenin. Má charakteristickou červenou až červenohnědou barvu. Krev je jednou z nejvýznamnějších tělních tekutin a zároveň i stopy lidské krve na místě činu jsou jedny z nejvýznamnějších a nejčastějších. Je jedním z nejvhodnějších biologických materiálů k forenznímu zkoumání. Krevní stopy se nacházejí nejčastěji v zaschlém stavu, není však výjimkou, když je krev nalezena i ve stavu tekutém. Nejčastěji se krevní stopy vyskytují na pachateli, oběti, nástrojích, nebo na místě události.

Sliny jsou výměškem slinných žláz dutiny ústní. Mají většinou charakter latentní stopy (stopa pouhým okem neviditelná) a na podložce (zvláště světlé barvy) nejsou nijak nápadné. Sliny jsou pro forenzní zkoumání rovněž velice vhodným materiálem, protože je v nich obsaženo velké množství buněčného materiálu (epiteliální buňky ze sliznice dutiny ústní). Sliny společně s krví tvoří největší skupinu zkoumaného biologického materiálu v rámci genetiky.

Pot je výměšek potních žláz a společně s uvolněnými částmi pokožky (epiteliálními buňkami) má rovněž velký význam pro identifikaci osob pomocí analýzy DNA. Stopy potu a epiteliálních buněk se nejčastěji vyskytují jako šupinaté otěry, nebo jako drolivé částice. Mohou být jak latentní tak viditelné, protože díky vysokému obsahu solí mohou na oděvu vytvořit skvrny s bělavými okraji. Velmi často jsou však na materiálním nosiči jen obtížně rozeznatelné.

Moč je odpadní produkt organismu vylučovaný ledvinami v podobě průhledného vodnatého roztoku světle žluté až jantarové barvy. Jelikož moč většinou obsahuje pouze odpadní látky z těla (nikoli buňky organismu), není její využití pro analýzu DNA příliš velké. Lze ji použít pouze tehdy, pokud je v ní obsažena i část jiného biologického materiálu, např. krev nebo uvolněné epiteliální buňky ze stěn močového měchýře.

Stolice (lejno, exkrement) je konečný produkt vyprazdňování tlustého střeva. Obsahuje nestravitelné, nebo nestrávené zbytky potravy, neabsorbovanou vodu, případně střevní parazity a mikroorganismy. Stejně jako moč je i stolice pro analýzu DNA málo využitelná, neboť obsahuje především odpadní látky z potravy a nikoli buňky těla

vlastní. Přítomná DNA navíc podléhá rychlé degradaci působením různých inhibitorů (enzymy, bakterie, plyny – např. methyl mercaptan apod.). Využití stolice pro analýzu DNA je možné v případě, že obsahuje příměs buněk pocházejících z organismu (krev, nebo uvolněné epiteliální buňky ze stěn tlustého střeva).

Ejakulát je výměškem mužských pohlavních žláz. Je to bělavě zakalená hustá kapalina, která je tvořena spermii a semenným plazmatem (kyselé fosfatázy, cukry, soli, ionty a ostatní organický a neorganický materiál). Ejakulát je vhodný ke zkoumání díky přítomnosti spermií a má velkou důkazní hodnotu při identifikaci osob mužského pohlaví. Stopy ejakulátu se nejčastěji vyskytují v zaschlém stavu jako jasně ohraničené skvrny škrobovitého charakteru, bílé, bíložluté až šedavé barvy. V tekutém stavu se nejčastěji vyskytují společně s poševním sekretem.

Poševní sekret je tělní tekutina vyměšovaná ženskými pohlavními orgány. Je to bělavá hustá kapalina obsahující enzymy, sacharidy, lipidy, organické látky atd. Má vysokou důkazní hodnotu pro identifikaci osob ženského pohlaví. Ve většině případů se v praxi vyskytuje ve směsi, převážně s ejakulátem.

Trichologický materiál představují nejen lidské vlasy a chlupy, ale do této skupiny jsou rovněž zařazeny chlupy a štětiny zvířat.

Z hlediska kriminalistiky je vlas významný v procesu identifikace jedince. Je vhodný k analýze DNA, ale pouze v případě, že obsahuje vlasový kořínek, který lze najít především u samovolně vypadlých, nebo vytržených vlasů a chlupů. Ke zkoumání není vhodný trichologický materiál, který byl zajištěn bez vlasového kořínku (odstřížený).

Části lidské tkáně se ve forenzní kriminalistice vyskytují poměrně často. Jedná se především o tkáně kůže, svalů, vaziv, zřídka kdy se setkáváme s tkáněmi vnitřních orgánů. Lidské tkáně jsou velmi náchylné k degradaci (proces hniloby). Tedy i vhodnost materiálu předloženého ke zkoumání je nutno posuzovat podle stáří tkáně a probíhajícího procesu hniloby. Platí zde přímá úměra: čím je lidská tkáň starší, tím je méně vhodná ke genetickému zkoumání. S oddělenými částmi lidských tkání se lze nejčastěji

setkat u případů vražd (kdy pachatel oddělí různé části lidského těla), dopravních nehod, teroristických útoků apod.

Zuby jsou nejméně častým objektem forenzního zkoumání. Je to především díky malému obsahu látek vhodných k analýze DNA a zejména pak z důvodu celkové tvrdosti zubu, kdy před samotnou analýzou musí dojít k jeho rozmělnění (pomletí) na prášek.

Kosti a kosterní nálezy jsou častým objektem zkoumání. Kosti jsou nejtvrďší pojivovou tkání v těle, jsou velmi stálé a v některých případech nedegradují ani za velmi dlouhou dobu. Vzhled kostí a kosterních nálezů je zcela typický a nezaměnitelný s jinými objekty. Problémy s jejich rozpoznáním mohou nastat pouze v případě drobných úlomků. Z hlediska využití kostí a kosterních nálezů pro analýzu DNA jsou za použití současných metod a přístrojů postačující pouze fragmenty (úlomky) kostí. V některých případech, především u velmi starých a degradovaných vzorků kostí, ale nelze předem zaručit úspěšný výsledek analýzy DNA.

2.2 Biologický srovnávací materiál

Srovnávací vzorek (bukální stěr) je biologický materiál získaný od konkrétní osoby za účelem srovnání jejího profilu DNA s profily DNA ze stop uložených v ND DNA¹⁴. Následným porovnáním stopy a srovnávacího vzorku můžeme buď potvrdit, nebo vyloučit potencionálního původce biologické stopy z místa události. Vzorky biologického srovnávacího materiálu jsou zajišťovány především od osob obviněných nebo odsouzených za spáchání trestného činu, dále pak od osob podezřelých, nebo poškozených. V malém procentu případů jsou zajišťovány biologické srovnávací vzorky také od tzv. „domácích osob“.

Biologický srovnávací materiál je nejčastěji zajišťován tzv. bukálním stěrem, setřením povrchu vnitřní plochy ústní dutiny, pomocí jednoduché sterilní *odběrové soupravy* (viz. Obr. 6,7), která byla vyvinuta a navržena ve spolupráci s KÚP tak, aby splňovala hygienické požadavky a požadavky normy kvality EN ČSN ISO/IEC 17 025.

¹⁴ čl. 2, písm. h) ZP PP č. 88/2002 ze dne 29. května 2002 – k naplňování, provozování a využívání Národní databáze DNA



Obr. č. 6, 7. Odběrová souprava k odběru biologických srovnávacích vzorků používaná u Policie ČR¹⁵.

¹⁵ Prezentace KÚP „Správné zajištění stop a srovnávacích vzorků“, vytvořená dne 2. 11. 2006

METODIKA

3. Analýza DNA, vyhodnocení a interpretace

Od devadesátých let se v celém světě pro identifikační forenzní zkoumání ustálila prakticky jediná metoda – stanovení STR polymorfizmů. Tato metoda využívá variabilitu v opakování krátkých sekvencí nukleotidů v určitých úsecích DNA (STR – Short Tandem Repeat). Pro dosažení vysoké rozlišovací schopnosti, je vyšetřováno více STR polymorfizmů najednou.

3.1 Metody izolace DNA ze stop

Izolace DNA je prvním krokem většiny molekulárně genetických technik. Účelem je vyizolovat z biologické stopy DNA v dostatečném množství a kvalitě pro další analýzu. Izolační postupy umožňují odstranit pokud možno veškeré ostatní nežádoucí látky, příp. inhibitory, které by bránily dalším analýzám. O použité metodě izolace rozhoduje oprávněný pracovník při ohledání vzorku na základě svých zkušeností a vlastností jednotlivých izolačních kitů pro daný typ stopy.

První krok při izolaci DNA je dezintegrace (lýza) buněk. Při dezintegraci buněk dochází k rozrušení buněčných membrán kombinovaným působením enzymů a detergentů, které jsou obsaženy v extrakčním (lyzačním) pufru. Po destrukci buněčných membrán se DNA uvolňuje do extrakčního (lyzačního) pufru. Druhý krok je promývání extrakčního pufru s DNA. Promývání se provádí vhodnými promývacími roztoky s obsahem ethanolu, nebo izopropanolu. Třetím krokem je vyluhování DNA z promývacího roztoku do vhodného speciálního (elučního, neboli vyluhovacího) roztoku.

3.1.1. Silikagelové membrány

Izolace pomocí silikagelové membrány je založena na jednoduchém procesu vazby DNA na silikagelovou membránu v přítomnosti chaotropních solí (solí zvyšujících iontovou sílu, např. guanidin hydrochlorid), její promytí a následné uvolnění do roztoku.

Nejprve je tedy vzorek inkubován extrakčním činidlem (pufrem). Poté je přidán pufr s obsahem chaotropních solí a ethanol. Suspenze je převedena do zkumavky se

silikátovou kolonkou, která je následně promývána pomocí promývacích pufrů, čímž dochází k odmytí ostatních nežádoucích látek (inhibitorů), přičemž DNA zůstává zachycena na silikátové membráně. Samotná DNA je po promytí z povrchu silikagelové membrány uvolněna elučním pufrém.

Tento princip umožňuje vyizolovat DNA i ze znečištěných stěrů a částečně rozložených tkání, neboť účinně eliminuje PCR inhibitory a extrahuje velké množství DNA. Izolace pomocí silikagelových kolon je nenáročná, pohodlná, rychlá a ekonomicky relativně výhodná.

V současné době se na pracovištích Policie ČR k tomuto účelu používají komerčně vyráběné kity QIAamp, firmy Qiagene.

3.1.2. Magnetické částice

Izolace pomocí magnetických částic, nečastěji ve tvaru kuliček, je založena na navázání cílových molekul DNA na tyto magnetické částice.

Vzorek je nejprve inkubován s lyzačním pufrém, přičemž délka inkubace závisí na typu vzorku. Při inkubaci dochází k lyzaci vzorku a uvolnění DNA do lyzačního pufru. Po lyzaci je k lyzačnímu roztoku s obsahem DNA a různých nežádoucích příměsí přidána suspenze magnetických částic s pryskyřicí navázanými částmi silikátu. Na tuto suspenzi se naváže DNA (stejným principem jako u silikagelů). Přiložením vhodného prostředku s magnetickým polem (magnetický stojánek) dojde k migraci a přichycení magnetických částic s navázanou DNA k jedné boční straně zkumavky, tam kde je umístěn magnetický stojánek. Tímto lze bezpečně a snadno odebrat lyzační pufr ze zkumavky. Poté dochází k promytí magnetických částic pomocí promývacích pufrů, stejným způsobem jako při odstranění lyzačního pufru. Samotná DNA je z magnetických částic získána elučním pufrém.

Izolace pomocí magnetických částic umožňuje vyizolovat DNA v optimalizovaném poměru. Při velkém množství DNA ve vzorku tato metoda umožňuje izolovat maximálně okolo 1ng/μl, při malém množství DNA ve vzorku naopak dochází k velmi efektivnímu vychytávání veškeré DNA na magnetické částice. Metoda je tedy vhodná k izolaci znečištěných stěrů a částečně rozložených tkání. Jedná se o jednoduchou, pohodlnou, časově nenáročnou a ekonomicky relativně výhodnou izolační metodu.

V současné době se na pracovištích Policie ČR k tomuto účelu používá komerčně vyrobený kit DNA IQ™ System, firmy Promega

3.1.3. Chelex® 100

Izolace chelatačním činidlem Chelex® 100 (styren-divinylbenzenový kopolymer, mesh 100-200) je založena na účinné inaktivaci (vyvázání) kationtů (hlavně Mg^{2+} a Ca^{2+}), které fungují jako kofaktory DNA nukleáz, spolu s inaktivací těchto DNA nukleáz tím, že vzorky jsou během izolace vystaveny vysoké teplotě v prostředí s nízkou iontovou silou.

Nejprve jsou buňky převedeny do hypotonického roztoku (dd H_2O) a následnou centrifugací ve zkumavce zůstanou přichyceny na dně v podobě sedimentu. K sedimentu je poté přidána 5% suspenze chelatačního činidla Chelex® 100 s proteinázou „K“. Tato směs je pak inkubována za teploty $56^{\circ}C$ po dobu minimálně 20 minut, přičemž dochází k lyzaci buněk a uvolnění DNA do roztoku. Po inkubaci se provádí denaturace vzorku s chelatačním činidlem a proteinázou „K“ při teplotě okolo $100^{\circ}C$. Následuje centrifugace vzorku, při níž se usadí zbytky chelatačního činidla na dně zkumavky. V roztoku je obsažena analyzovatelná DNA, ale často i celá řada inhibitorů reakce PCR.

Jedná se o velmi jednoduchou, rychlou a v současné době i nejlevnější metodu, která se používá u vzorků krve, slin, čerstvé tkáně a případně stěrů, které nejsou znečištěny a kde se předpokládá velké množství vstupní DNA.

V současné době se na pracovištích Policie ČR používá komerčně vyráběné chelatační činidlo Chelex® 100, firmy Biorad.

3.1.4. Diferenciální lýza

Princip této izolační metody je založen na vyšší odolnosti spermií vůči proteolýze a umožňuje tedy do značné míry oddělení ženské a mužské frakce extrahované DNA, které jsou pak analyzovány odděleně.

Smíšený vzorek mužských a ženských buněk (spermie a poševní epiteliální buňky) se v první fázi lyzuje hypotonickým roztokem (dd H_2O) a následně centrifuguje. Vytvořený sediment obsahuje zatím neporušené spermie a zbylý hypotonický roztok obsahuje uvolněnou DNA z poševních epiteliálních buněk spolu s nežádoucími inhibitory. Ve druhé fázi dochází k oddělení sedimentu od hypotonického roztoku a tím tedy

k oddělení mužské a ženské frakce. Následná izolace obou frakcí probíhá odděleně za pomoci některé z výše zmíněných izolačních metod. K mužské frakci se navíc přidává dithiotreitol (DTT), který napomáhá rozrušení odolných buněčných stěn spermií.

Diferenciální lýza je jednou ze složitějších izolačních metod. Její využití je velmi specifické a používá se hlavně k izolaci smíšeného biologického materiálu, zejména poševních stěrů u případů znásilnění nebo všude tam, kde je předpokládán současný výskyt mužského a ženského biologického materiálu. Tato metoda je náročná časově, jelikož izolace poté probíhá ve dvou na sobě nezávislých procedurách.

3.2. Kity ke speciálním metodám izolace

V kriminalistických laboratořích jsou běžně používány komerční kity založené na výše uvedených metodách izolace. Přesto se však lze v praxi setkat i se stopami a z nich odebranými vzorky, které nejsou za použití běžných a standardně používaných kitů dobře izolovatelné, nebo výtěžnost pomocí standardních kitů je velmi nízká, až nulová. Z těchto důvodů jsou v kriminalistických laboratořích využívány i méně běžné kity, které jsou specifické, pouze pro určitý druh biologického materiálu (např. vlasy, chlupy, nehty, kosti, poševní stěry se spermatem, apod.).

3.2.1 Tissue & Hair Extraction Kit

Kit založený na principu izolace pomocí magnetických částic. Jeho nevýhodou je čas potřebný k uvolnění DNA ze vzorku do lyzačního roztoku, než dojde k samotnému přidání magnetických částic. Tento kit se hodí k izolaci vzorků obsahujících velké množství keratinů (vlasy, nehty).

3.2.2 Differex system

Kit založený na metodě diferenciální lýzy. Jeho principem je oddělení mužské a ženské frakce DNA z lyzačního roztoku s extrahovanou DNA.

Tato metoda se používá u vzorků, kde se předpokládá směsný výskyt epiteliálních buněk a spermií. Využívá se dvou následných extrakcí, kdy při první (s SDS a proteinázou K) jsou narušeny epiteliální buňky, epiteliální frakce je odebrána a teprve v druhém extrakčním roztoku (s SDS, proteinázou K a dithiothreitem - DTT) jsou narušeny spermie.

3.3 Metody izolace z bukálních stěrů

Izolace DNA z bukálních stěrů probíhá v současné době především na principu metody silikagelových membrán. DNA je selektivně adsorbována na silikátovou membránu v přítomnosti vysoké koncentrace chaotropních solí. V prostředí s $\text{pH} < 7,5$, je zpravidla adsorbováno kolem 95% DNA a zbytky buněk, proteiny a další kontaminanty jsou odstraněny promývacími pufrů pomocí vakuového odsávání. Optimální podmínky pro navázání DNA na membránu a zvýšení její čistoty jsou zajištěny přidáním ethanolu. Extrahovaná DNA je poté v alkalickém prostředí a za nízké koncentrace solí uvolněna z membrány pomocí elučního pufru.

V KÚP je tato metoda izolace prováděna na přístroji BioRobot Universal system firmy Qiagene.

3.4 Metody kvantifikace

Jednou z podmínek úspěšného výsledku PCR je optimální množství vstupní matricové DNA a nepřítomnost inhibičních látek v reakční směsi. Množství izolované DNA je možné kvantitativně stanovit metodou Real-Time PCR (PCR v reálném čase).

Metoda Real-time PCR je založena na klasické PCR jen s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstek DNA během každého cyklu, na rozdíl od klasické PCR, kde detekce probíhá až ve finální fázi. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Data jsou shromažďována během celého procesu PCR.

Pro přesnou a vysoce specifickou detekci templátu se používá tzv. TaqMan sonda, fungující na bázi 5' exonukleázové reakce s použitím specifického fluorescenčního značení.

Hlavní výhodou této metody je možnost kvantifikace během procesu, vysoká specifita a citlivost reakce.

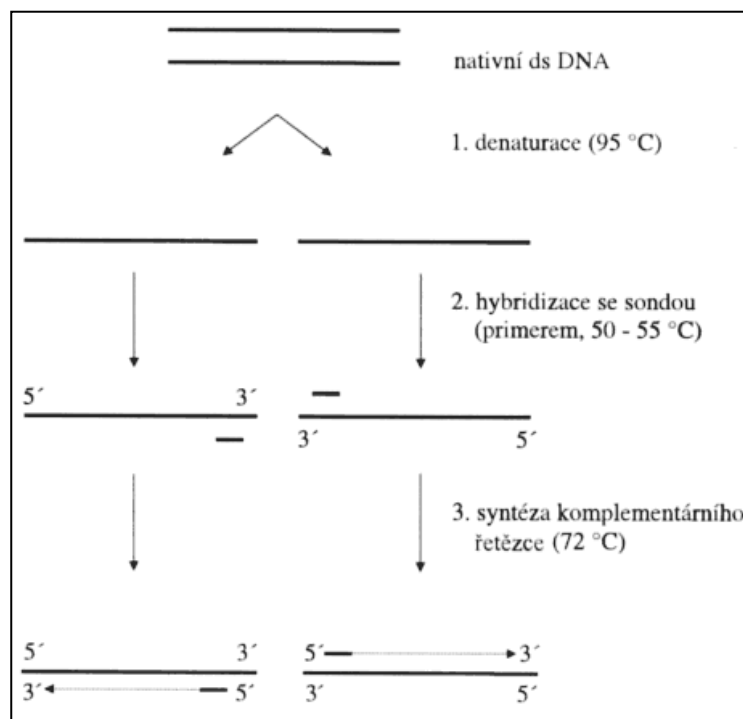
Metoda kvantifikace je na KÚP prováděna na přístroji ABI Prim 7900HT od firmy Applied Biosystems a nově také na přístroji Light Cycler 480 od firmy Roche.

3.5 Metody amplifikace

V současné době je využívána pouze metoda PCR reakce, neboli polymerázová řetězová reakce (z anglického názvu „**P**olymerase **C**hain **R**eaction“)¹⁶. Podstatou PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že 3'OH-konce směřují proti sobě. Primery jsou synteticky připravené krátké oligonukleotidy o délce cca 10-20 bází, které jsou na jednom konci označeny fluorescenčním barvivem. Po přidání DNA- polymerázy a nukleotidů tak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. Reakce je katalyzovaná termostabilní DNA polymerázou, např. „*Taq DNA polymerázou*“ izolovanou z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. PCR tedy umožňuje specifické a selektivní namnožení i minimálního množství cílových úseků DNA a zároveň vysokou citlivost detekce nukleové kyseliny ve vzorku, a proto je vhodná právě ke kriminalisticko-genetickému zkoumání. Obvykle se provádí při reakčním objemu vzorku 12,5-25 µl. V tomto reakčním množství (směsi polymerázy, izolátu, primerů a specifického pufru) je potřeba docílit toho, aby v něm bylo obsaženo přibližně 0,5 – 1 ng DNA. Z tohoto výchozího množství poskytuje polymerázová řetězová reakce až 10¹⁰ násobné namnožení cílového úseku DNA při 34 cyklech během 2 - 3 hodin. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři různé děje s odlišnými nároky na teplotu:

- 1) Denaturace – v tomto kroku dochází ke krátkému zahřátí na teplotu 94-98 °C trvajícím 20-30 sekund. Dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a následně k jejímu rozvolnění. Výsledkem je jednořetězová DNA.
- 2) Annealing (hybridizace) - v tomto kroku dochází ke snížení teploty na 45 – 60°C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primeru se poté váže DNA polymeráza.
- 3) Extenze – v tomto kroku dochází k syntéze samotné DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA při teplotě 70 – 75°C.

¹⁶ KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, ISBN 978-80-7013-450-4, str. 95



Obr. č. 5 - PCR¹⁷

Počet těchto cyklů (zpravidla 30 nebo 40) závisí na koncentračních poměrech v reakční směsi, požadovaném výtěžku a životnosti enzymu. Cyklickým opakováním kroků dochází k syntéze úseku definovaného primery, který tvoří hlavní produkt reakce.

Standardně jsou genotypovány markery amplifikované pomocí kitu **PowerPlex® 16 System** od firmy Promega, tj. systémy vWA, D16S539, D8S1179, TPOX, FGA, D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, PentaE, D5S818, D13S317, D7S820, PentaD, CSF1PO a amelogenin (určení pohlaví specifickým průkazem segmentu lidského X-chromozomu a Y-chromozomu).

Mimo to se genotypování markerů provádí také pomocí kitu **AmpFISTR® Identifiler™** od firmy Applied Biosystems s nímž jsou amplifikovány markery vWA, D16S539, D8S1179, TPOX, FGA, D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D2S1338, D5S818, D13S317, D7S820, D19S433D, CSF1PO a amelogenin a pomocí kitu **AmpFISTR® SEfiler Plus™** od firmy Applied Biosystems, který amplifikuje markery

¹⁷ af.czu.cz/~zouhar/diagnostika/Amplifikace_DNA_PCR.ppt

D3S1358, vWA, D8S1179, TH01, FGA, D21S11, D18S51, amelogenin, SE33, D2S1338, D16S539 a D19S433.

Pro účely analýzy Y-chromozómu jsou genotypovány markery amplifikované pomocí kitu **AmpFISTR® YFiler Kit**, tj. DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS393, DYS390, DYS385, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS456, DYS458, DYS635, Y GATA H4 a DYS448.

3.6 Elektroforéza DNA

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám. Principem elektroforézy je pohyb nabitých molekul DNA, které mají vlivem přítomnosti aniontových fosfátových skupin PO_4^{3-} celkově negativní elektrický náboj, v elektrickém poli. Z tohoto důvodu se molekuly DNA pohybují při elektroforéze směrem k anodě (kladně nabitě elektrodě). Elektroforéza využívá k analýze DNA odlišnou pohyblivost molekul ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost molekul DNA je závislá na koncentraci gelu, velikosti náboje, velikosti molekuly, dále pak na podmínkách prostředí a síle elektrického pole. Různě velké a různě nabitě molekuly se budou pohybovat odlišnou rychlostí.

V současné době se na pracovištích KÚP a OKTE používá tzv. kapilární elektroforéza. U kapilární elektroforézy probíhá separace fluorescenčně značených fragmentů DNA v kapiláře, která je naplněna polymerem, a oba její konce jsou umístěny v elektrolytu (pufu). Kapilára může být různě dlouhá (od několika cm do jednoho metru), avšak o vnitřním průměru v rozsahu desítek či stovek mikrometrů (většinou v rozmezí 25 – 50 μm). Fluorescenční barvičky navázané na jednotlivých namnožených fragmentech DNA jsou při průchodu kapilárou excitovány laserem a emitované záření je snímáno CCD kamerou. Data jsou následně vyhodnocována pomocí specializovaného softwaru. Přednosti kapilární elektroforézy oproti horizontální spočívají především v minimální spotřebě vzorku, rychlosti a snadné vizualizaci výsledného profilu DNA.

V rámci pracovišť oddělení genetiky OKTE a KÚP se k tomuto účelu využívají plně automatizované přístroje ABI PRISM 310, ABI PRISM 3130 a ABI PRISM 3130xl.

3.7 Speciální analýzy DNA

Ve forenzní genetice se na prvním místě využívá analýza jaderné DNA (DNA obsažené v buněčném jádře). V kriminalistice se ovšem vyskytují i případy, kdy použití jaderné DNA ke genetické analýze není možné (např. z důvodu degradace biologického materiálu), nebo je potřeba genetickou analýzu jaderné DNA doplnit o další analýzu z důvodu bližšího určení původu biologické stopy. Toho se využívá zejména u případů znásilnění, kdy je z biologického materiálu (poševní stěr + ejakulát) stanoven smíšený profil dvou osob (ženy a muže). V takovém případě lze pomocí doplňující analýzy „Y“ chromozómu určit Y haplotyp, který je specifický pouze pro muže. Při kriminalistické genetické expertíze jsou využívány dvě speciální analýzy DNA. Jednou je již zmiňovaná analýza „Y“ chromozómu a druhou je analýza mitochondriální DNA (mtDNA).

3.7.1 Analýza „Y“ chromozómu

„Y“ chromozóm je jedním ze dvou („XY“) pohlavních chromozómů v buňce člověka. Tento chromozóm se vyskytuje **pouze u mužů**, a tudíž se dědí výhradně z otce na syna (tzv. dědění po meči). Jeho převážnou část tvoří úseky nekódující DNA. Analýza „Y“ chromozómu se v kriminalistické genetice využívá jako doplňující informace při stanovení neúplného profilu osoby z jaderné DNA, dále při stanovení mužského „Y“ profilu ze smíšené stopy, nebo při testování příbuzenských vztahů (např. u pohřešovaných osob, obětí živelných katastrof, ve výzkumu apod.). Stanovení DNA profilu „Y“ chromozómu však neumožňuje individuální identifikaci.

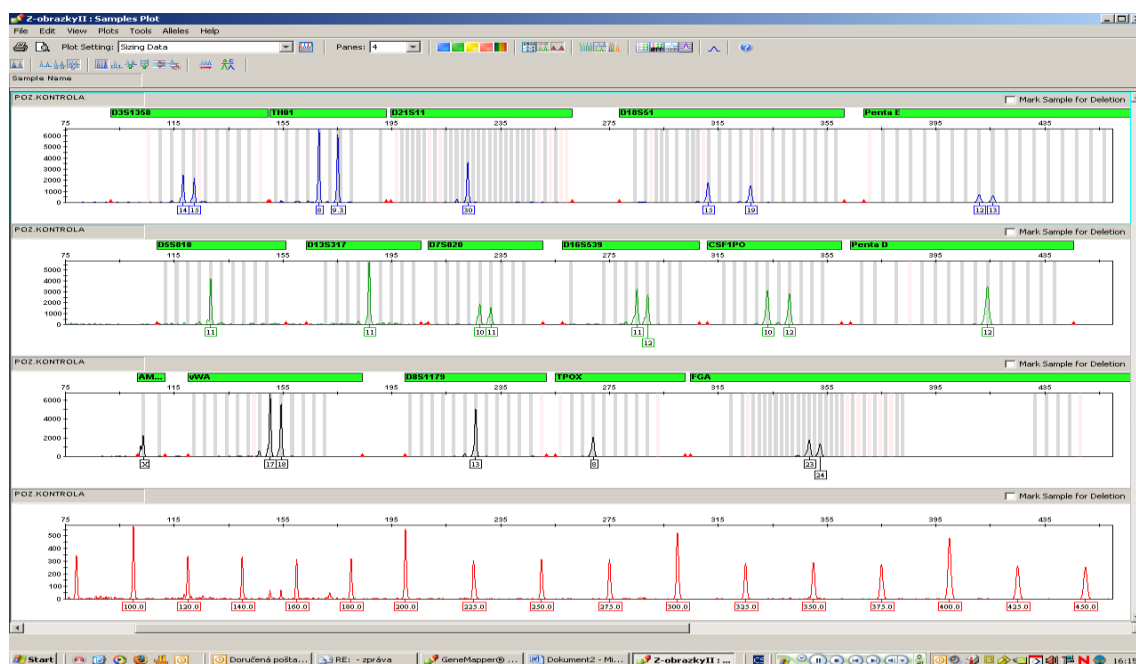
3.7.2 Analýza Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) se nachází v mitochondriích, což jsou buněčné organely a jejich DNA tvoří součást mimojaderné genetické informace. Molekula mitochondriální DNA je cirkulární a svým charakterem je na rozdíl od jaderné DNA velmi podobná DNA bakterií. Genetický kód využívaný v mitochondriích je odlišný od kódu jaderného. Obvykle je mtDNA přítomna v několika stech kopiích na mitochondrii. V případě mtDNA dochází k tzv. maternální dědičnosti, neboť drtivá většina mitochondriální genetické informace je děděna pouze po matce (po přeslici). Této skutečnosti se rovněž využívá při kriminalistické genetické analýze, zejména při identifikaci a hledání pohřešovaných osob a dále pokud je vzorek značně degradován nebo obsahuje velmi

malé množství DNA, které nestačí na analýzu jaderné DNA (např. vlasy, kosti, zuby). Tato analýza také slouží pouze jako doplňující a neumožňuje individuální identifikaci.

3.8 Vyhodnocení a interpretace výsledků analýzy DNA

Aby bylo možné provádět porovnání biologického materiálu stop a srovnávacích vzorků (nebo stop navzájem), je potřeba výstup z elektroforézy, tzv. „elektroforetogram“ (viz. Obr. 9) převést na alfanumerické hodnoty a určením genotypů jednotlivých markerů stanovit tzv. **DNA profil**. Délky jednotlivých fragmentů DNA jsou vyhodnocovány porovnáváním s definovaným vnitřním standardem (soubor fragmentů o známé délce), který je součástí každého analyzovaného vzorku a s tzv. alelickým ladderem (soubor všech známých fragmentů pro dané markery), který běží na elektroforéze současně se zkoumanými vzorky. Toto vyhodnocování se provádí pomocí speciálních analyzačních softwarů GeneMapper (Applied Biosystems), nebo GeneMarker (SoftGenetics).



Obr. č. 9. Elektroforetogram – výstup z genetického plně automatického sekvenátoru ABI PRISM 3100, zpracovaný počítačovým programem GeneMapper

| Lokus | Genotypy |
|---------------|----------|
| D3S1358 | 15/17 |
| THO1 | 7/9 |
| D21S11 | 29/31 |
| D18S51 | 17/18 |
| Penta E | 5/13 |
| D5S818 | 12/13 |
| D13S317 | 8/11 |
| D7S820 | 9/10 |
| D16S539 | 12/12 |
| CSF1PO | 11/12 |
| Penta D | 12/13 |
| AME - pohlaví | XY |
| vWA | 17/18 |
| D8S1179 | 12/14 |
| TPOX | 8/9 |
| FGA | 19/24 |

Obr. č. 10. Vyhodnocovací tabulka systému Power Plex[®]16[®] (příklad hodnot převedených z grafického výstupu foretogramu)¹⁸

Výsledkem celého výše popsaného laboratorního procesu je DNA profil, který se poté porovnává s DNA profily stanovenými z dalších stop nebo srovnávacích materiálů. Cílem forenzní genetiky je **individuální identifikace**. Statistická pravděpodobnost výskytu shodného DNA profilu, tvořeného kombinací 20 - 32 alel v 10 - 16 navzájem nezávislých lokusech, je mimořádně malá a pohybuje se v rozmezí hodnot řádově 10^{-10} , 10^{-20} , popř. i nižších. Za těchto podmínek lze riziko misidentifikace, tj. možnosti, že nalezený DNA materiál patří jiné než označené osobě, zanedbat a pozitivní nálezy v závěrech genetické analýzy DNA interpretovat jako individuální shodu¹⁹.

¹⁸ www.cak.cz/files/182/BA_02_04.pdb

¹⁹ Prezentace KÚP „Interpretace závěrů genetického zkoumání“, vytvořená dne 30. 3. 2010

Analýza DNA nám umožňuje provést porovnání mezi jednotlivými DNA profily navzájem. Při tomto porovnání zjišťujeme, zda DNA profil stanovený z konkrétní biologické stopy zanechané na místě trestné činu, je shodný s DNA profilem stanoveným z jiné biologické stopy, zanechané buď na stejném, nebo na jiném místě trestného činu. V tomto případě mluvíme o shodě typu **stopa-stopa**.

V případě shody DNA profilu stanoveného z biologické stopy nalezené na místě činu s DNA profilem stanoveným ze srovnávacího vzorku osoby se jedná o shodu typu **stopa – osoba**.

Je možné také konstatovat shodu typu **osoba – osoba**, a to tehdy, pokud se shodují dva, nebo více DNA profilů od jedné osoby. Tuto shodu můžeme zjistit v případě, že dojde k odebrání bukalního stěru u stejné osoby opakovaně, neboť využívá změněnou identitu.

4. Národní databáze DNA

Národní databáze DNA (ND DNA) je počítačový informační systém složený ze dvou vzájemně oddělených elektronických databází. Obsahuje jednak DNA profily stanovené z různých typů vzorků (např. stop z neobjasněných případů trestné činnosti, pachatelů trestných činů, mrtvol neznámé totožnosti, ale také eliminačních vzorků pracovníků genetických laboratoří apod.) a jednak příslušné informace a údaje k těmto DNA profilům.

První část ND DNA tvoří databázový systém INFO – DNA. V něm jsou vedeny osobní údaje ke srovnávacím vzorkům a informace o zpracovaných biologických stopách, jejichž DNA profily jsou v databázi uloženy. Druhou část ND DNA tvoří elektronický databázový systém CODIS (**C**ombined **D**NA **I**ndex **S**ystem). V tomto systému jsou evidovány profily DNA získané:

- ze stop z dosud neobjasněných případů trestné činnosti,
- od osob obviněných, nebo odsouzených,
- z těl mrtvol neznámé totožnosti,
- od osob pracujících v laboratořích, případně osob přicházejících do styku se zkoumaným biologickým materiálem (tzv. eliminační vzorky).

Software umožňuje mimo jiné ukládání dat, vyhledávání shod mezi profily podle různých kritérií, import a export dat a generování různých výstupních sestav.

System CODIS se Kriminalistickému ústavu Praha podařilo získat na základě doporučení Rady Evropy č. 193/1997²⁰ v roce 2001 a Česká republika se tak stala jednou z prvních zemí bývalého východního bloku, která uvedený systém instalovala.

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Profily vložené do ND DNA | |
| Pachatelé | 57 005 |
| Oběti | 290 |
| Neznámé mrtvoly | 430 |
| Neztotožněné stopy z místa TČ | 11 574 |
| Eliminační vzorky | 392 |
| Cekem | 75 087 |

Obr. č. 11. Statistické údaje o počtu genetických profilů v ND DNA ke dni 13. 5. 2010

5. Další využití genetiky

Genetická analýza se v kriminalistice uplatňuje jak při přímé identifikaci osob (hledáme shodu mezi stopami z místa činu a srovnávacími vzorky osob), tak v určování příbuzenských vztahů (identifikace neznámých mrtvol).

Dalším uplatněním je identifikace obětí hromadných přírodních katastrof a teroristických útoků. Asi k největšímu využití došlo v roce 2001 při identifikaci obětí teroristického útoku ze dne 11. září 2001 na World Trade Center v New Yorku. Během tohoto útoku bylo 2749 lidí zabito.

Mezi přírodní katastrofy lze zařadit asi nejznámější vlnu tsunami z období Vánoc roku 2004, která způsobila v jihovýchodní Asii katastrofu nebývalých rozměrů, přispěly k celosvětovým aktivitám na vytváření týmů odborníků na identifikaci zemřelých, tzv. **DVI** týmy (Disaster Victim Identification).

²⁰ Rezoluce Rady Evropy č. 193/1997 – o výměně výsledků rozborů DNA

Závěr

V práci jsem se snažila o krátký, ale ucelený popis zpracování biologického materiálu, který je podroben různým genetickým metodám tak, aby z tohoto materiálu byla získána DNA v dostatečném množství a kvalitě pro potřeby analýzy v rámci kriminalisticko - genetického zkoumání. V práci je popsáno, jak dochází ke zpracování biologického materiálu na pracovištích oddělení genetiky v rámci Policie České republiky, pro kterou je analýza DNA již nezbytným pomocníkem při odhalování trestné činnosti a dalších kriminalisticky relevantních událostí, jako jsou např. teroristické útoky, letecké a jiné havárie či katastrofy. Za velmi krátké působení v rámci kriminalistiky si analýza DNA vydobyla jedno z předních míst, a to především díky své přesnosti, možnosti práce s minimálním množstvím biologického materiálu a především díky tomu, že výsledky analýzy DNA umožňují vyslovit závěry individuální identifikace. Přičemž individuální identifikace je jedním ze stěžejních bodů kriminalistiky. Genetická expertíza společně s daktyloskopickou expertízou má bezprostřední vztah k člověku a jeho vlastnostem. Biologický materiál, lidského původu, zejména odráží vnitřní vlastnosti jeho vylučovatele. Ačkoli současná praxe v rámci Policie České republiky neumožňuje v rámci genetické expertízy stanovit vnější vlastnosti člověka (kromě stanovení pohlaví), jako např. barva očí, vlasů, kůže, apod., je otázkou krátké budoucnosti, kdy se tak stane a bude možné typovat osoby (pachatele, oběti) podle těchto vlastností.

Přestože genetická expertíza v rámci kriminalistiky patří k jednomu z nejmladších oborů, je velmi hojně využívána a v posledních několika letech zaznamenala výrazný vzestup v počtu zpracovaných vzorků, kdy na některých odděleních genetiky Policie České republiky došlo k jejich přehlcení tak, že nebylo možno splňovat požadavky dožadujících policejních orgánů. To i přesto, že genetická expertíza je finančně, technicky, personálně a časově náročná, kdy zpracování jednoho nejjednoduššího vzorku v optimálních podmínkách trvá přibližně šest až osm hodin a stojí pouze na spotřebním materiálu okolo 1.000,- 2.000,- Kč. I přes tyto nevýhody bude zajímavé sledovat trend vývoje genetické expertízy a jejího uplatnění v rámci kriminalistiky, kdy lze především očekávat, že dojde ke zkvalitnění služeb spojených se zajišťováním stop a srovnávacích vzorků, k urychlení zpracování genetického materiálu, k vývoji nových metod (např. možnost odhalit konkrétního jedince i v kontaminovaném vzorku), k vývoji nových technických zařízení a programových nástrojů, ale i k zlevnění samotné analýzy DNA

Seznam použité literatury

- ALBERTS, B., a kol. *Základy buněčné biologie*. Překlad z angličtiny Espero Publishing, ÚSTÍ NAD LABEM 2001, s. 660
- BENDA, V., BABŮREK, I., KOTRBA, P. – *Základy biologie*. Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, PRAHA 2006, s. 167
- BUTLER, J. T. *Forensic DNA typing, second edition*. Elsevier academic press, 2005, s. 660
- HLAVÁČEK, J. – PROTIVINSKÝ, M., a kol. *Praktická kriminalistika*. KÚP Praha, PRAHA 2006, s. 131
- KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. BRNO 2007, s. 33-137
- Kriminalistický sborník č. 1/1993*. Vydala Ústředna kriminální policie Policejního prezidia ČR, MAGNET – PRESS s. p., PRAHA 1993, s. 24-34
- Kriminalistický sborník č. 2/2002*. Vydal Kriminalistický ústav Praha, PRAHA 2002, s. 3-7
- Kriminalistický sborník č. 3/2002*. Vydal Kriminalistický ústav Praha, PRAHA 2002, s. 70
- Kriminalistika v príkladoch. Zborník z I. odborného seminára*. Vydal Kriminalistický a expertízny ústav policajného sboru SR, BRATISLAVA 2005, s. 54-55
- MUSIL, J. – KONRÁD, Z. – SUCHÁNEK, J. *Kriminalistika, 2. přepracované vydání*. C. H. Beck, PRAHA 2004, S. 169-179
- Odborná sdělení Kriminalistického ústavu č. 4/1999*. Vydal Kriminalistický ústav Praha, PRAHA 1999, s. I-VII
- OREL, V. *Gregor Mendel a počátky genetiky*. Academia, PRAHA 2003, s. 240
- PRŮŠA, R. *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. PRAHA 1997, s. 48
- RAK, R., a kol. *Biometrie a identita člověka ve forezních a komerčních aplikacích*. Grada Publishing a.s., PRAHA 2008, s. 535-561
- ROZSYPAL, S., a kol. *Molekulární genetika*. Státní pedagogické nakladatelství n. p. v Praze, PRAHA 1983, s. 1-19

- ROZSYPAL, S., a kol. *Úvod do molekulární biologie*. Státní pedagogické nakladatelství n. p. v Praze, PRAHA 1983, s. 9-19
- RUMLOVÁ, M. – PAČES, V. – RUMML, T. *Základní metody genového inženýrství*. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, s. 55
- ŠMARDA, J. – DOŠKAŘ, J. – PANTŮČEK, R. – RŮŽIČKOVÁ, V. - KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně, BRNO 2005, s. 7-110
- VODRÁŽKA, Z., *Biochemie*. ACADEMIA, BRNO 2006, s. 95-106
- WATSON, J. D. – TOOZE, J. – KURTZ, D. T. *Rekombinantní DNA*. ACADEMIA PRAHA, 1988, přeložili VELEMÍNSKÝ, J. – ANGELIS, K. J. – ŠATAVA, J., s. 30-63

Seznam použitých internetových stránek

<http://www.vpsmvbrno.cz/muzeumzla/lubas/lubas.html> (cit. 2010-05-12)

<http://www.cssfg.org/cz/1017/forezní-genetika/> (cit. 2009-05-12)

http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA

(cit. 2009-9-19)

<http://sites.google.com/site/biomachgbn/> (cit. 2010-3-9)

http://cs.wikipedia.org/wiki/D%C4%9Bjiny_objevu_a_v%C3%BDzkumu_DNA

(cit. 2009-3-6)

<http://biologie.upol.cz/metody/Struktura%20nukleovych%20kyselin.htm>

(cit. 2009-6-3)

<http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola04.pdf>

(cit. 2010-2-5)

<http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/casopisy/kriminalistika/2005/04/makovec.html>

(cit. 2009-6-12)

<http://www.21stoleti.cz/view.php?cislociklanku=2003102127> (cit. 2009-11-29)

http://analytika.upol.cz/workshopy/PrCa_01_2008.pdf (cit. 2009-11-29)

<http://abicko.avcr.cz/cs/2006/5/04/klic-k-identite-bioinformatika-a-forezni-vedy.html>

(cit. 2009-12-3)

<http://www.gate2biotech.cz/dna-na-stope-zlocinu/> (cit. 2010-2-13)

www.gymnazium.ji.cz/docs/sipvz/chemie/vyssi/.../27nukleo.ppt (cit. 2010-2-13)

www.ncbr.chemi.muni.cz/~evaf/c7925/parovani.ppt (cit. 2010-2-13)