

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra antropologie a genetiky člověka

Diplomová práce

Analýza aDNA ze zubů a kosterního materiálu
s využitím miniSTR lokusů

(Ancient-DNA analysis of teeth and skeletal
remains with utilization of miniSTR loci)

Bc. Dana Kvítková

Praha 2010

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Brouček

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou prací na téma: „Analýza aDNA ze zubů a kosterního materiálu s využitím miniSTR lokusů“ vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze dne

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala zejména vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jaroslavu Broučkovi z Kriminologického ústavu Praha za velkou ochotu, trpělivost a především za velice cenné rady, které mi během zpracovávání této diplomové práce věnoval. Ráda bych také poděkovala i všem kolegům v laboratoři, a to především za poskytnuté rady a podporu.

V neposlední řadě patří mé velké poděkování mým nejbližším - rodině a přátelům, za vytvořené zázemí, bez kterého by tato práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Během uplynulých dvaceti let došlo v oblasti analýzy DNA z historického materiálu k nesmírnému pokroku. Tato analýza se vzhledem k možnostem zachování jednotlivých tkání provádí především ze vzorků získaných z kostí a zubů. Výjimečně je možná analýza měkké mumifikované tkáně. Limitujícími faktory těchto analýz je vysoký stupeň degradace a malé množství DNA izolované z tohoto materiálu. První výzkumy byly zaměřeny pouze na krátké úseky především mitochondriální DNA. Dnes je již možná analýza celých mitochondriálních genomů současných i vyhynulých druhů živočichů. V případě analýz prováděných z lidských ostatků jsou mnohem cennější úseky jaderné DNA, které nám mohou pomoci určit pohlaví jedince, ale i možné příbuzenské vztahy jedinců pocházejících například z jednoho hrobu.

Zásadním krokem celé analýzy DNA je její extrakce z buněk. V každé laboratoři, kde se pracuje s historickou DNA, využívají pravděpodobně jinak modifikovaný extrakční protokol. Hlavním požadavkem na extrakční metody je to, aby poskytovaly DNA v takovém množství a čistotě, aby mohla být využita během dalších kroků analýzy. Vzhledem k vysoké fragmentaci DNA je nutné tomuto faktu přizpůsobit všechny kroky analýzy - především její izolaci a amplifikaci. V neposlední řadě je důležité během práce (nejen) s historickou DNA dodržovat všechna opatření, která by měla zabránit kontaminaci způsobenou novodobou DNA a tak zničit výsledky celé analýzy.

Náplní této práce byla analýza DNA jedinců pocházejících z několika pohřebišť různého stáří. Metoda byla nejprve ověřena na vzorcích, u kterých nedošlo k úspěšné analýze DNA dříve používanou metodou. Pro izolaci jsme vybrali protokol založený na adsorpci DNA na silikát. U získané aDNA jsme amplifikovali STR lokusy, přičemž jejich primery byly speciálně navrženy tak, aby výsledné produkty syntézy byly co nejkratší, tedy použitelné pro analýzu degradované DNA. Získané STR profily jsme důkladně porovnávali s profily osob, které by mohli být zdrojem vnější kontaminace. Při zpracovávání této práce jsme dosáhli úspěšnosti analýzy přesahující 50%.

Klíčová slova: historická DNA, adsorpce na silikát, miniSTR, kost, zub.

Abstract

During the last twenty years, immense progress occurred in the area of analysis of DNA extracted from historical material. Considering the common level of preservation of tissue material, this analysis is usually executed on samples procured from bones and teeth. The analysis of soft mummified tissue is possible only in rare cases. Limiting factor of these analyses is a high degree of degradation and small amount of DNA extractable from this kind of material. First researches concentrated only on short sections of mainly mitochondrial DNA. Today, the analysis of the complete mitochondrial genome of both contemporary and extinct organisms was made possible. In case of analyses conducted on human remains, sections of nuclear DNA are far more valuable, because they can reveal information including not only subject's sex, but also possible kinship between subjects found e.g. in the same grave.

Fundamental component of the whole analysis is the process of extracting DNA from cells. Probably every laboratory working with historical DNA uses a differently modified extract protocol. The main requirement for methods of extraction is to secure enough DNA with such a level of purity that would allow its use for following steps of the analysis. Taking in consideration high fragmentation of DNA, it is necessary to optimize all parts of the analysis to this factor - including its isolation and amplification. Last but not least, while working with (not only) historical DNA, it is important to abide by the precautions preventing contamination of the sample with recent DNA and consequently destroying the result of the analysis.

The objective of this thesis was the analysis of DNA extracted from individuals from several burial-grounds belonging to different historical periods. First, this method was verified on samples, at which previous method of DNA analysis failed. For isolation of aDNA, we chose protocol based on silica extraction. On aDNA procured with the use of this method, we amplified STR locus with primers modified in a way making the resulting product of the synthesis usable for analysis of degraded DNA. Procured STR profiles were thoroughly compared with profiles of people, who might have been the source of external contamination. While working on this thesis, the analysis was successfully rendered in more than 50% of cases.

Key words: historical DNA, silica based extraction, miniSTR, bone, teeth.

Obsah

1 SEZNAM ZKRATEK	8
2 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2.1 CÍLE PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1 JADERNÁ DNA.....	11
3.2 MITOCHONDRIE A MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	18
3.3 STARODÁVNÁ DNA	19
3.4 HLAVNÍ ZDROJE ADNA.....	24
3.5 ANALÝZA VZORKU	27
3.6 DEKONTAMINAČNÍ OPATŘENÍ PŘI ANALÝZE ADNA	45
4 MATERIÁL A METODY.....	48
4.1 SPOTŘEBNÍ MATERIÁL	48
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	48
4.3 POUŽITÉ TECHNICKÉ VYBAVENÍ	50
4.4 MATERIÁL.....	51
4.5 METODY.....	55
5 VÝSLEDKY	72
5.1 METODA IZOLACE DNA A STANOVENÍ STR PROFILU U ZKUŠEBNÍCH VZORKŮ	72
5.2 OPTIMALIZACE MINIÝ PENTAPLEXŮ I A II.....	73
5.3 STANOVENÍ AUTOZOMÁLNÍCH STR PROFILŮ U VZORKŮ OBSAHUJÍCÍCH ADNA.....	76
5.4 AMPLIFIKACE STR NALÉZAJÍCÍCH SE NA CHROMOZOMU Y.....	80
5.5 POROVNÁVÁNÍ MORFOLOGICKY A GENETICKY ZÍSKANÉHO POHLAVÍ	85
5.6 ÚSPĚŠNOST ANALÝZY ADNA.....	85
5.7 OVĚŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	85

6	DISKUSE	87
6.1	DEKONTAMINAČNÍ OPATŘENÍ	87
6.2	IZOLACE DNA	87
6.3	AMPLIFIKACE DNA	89
6.4	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	89
7	ZÁVĚR	92
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	93
9.1	PROTOKOLY POUŽÍVANÉ NA KÚP K IZOLACI DNA Z KOSTÍ A ZUBŮ	103
9.2	ELIMINACE: STR PROFILY	105
9.3	KVANTIFIKACE - MNOŽSTVÍ DNA VE VZORKU	107
9.4	FAMILY TREE DNA - SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ	108
	SEZNAM TABULEK	110
	SEZNAM OBRÁZKŮ	112

1 Seznam zkratek

A	adenin
aDNA	starodávná DNA
bp	páry bází
C	cytosin
CE	kapilární elektroforéza
dH ₂ O	ultračistá destilovaná voda bez nukleáz
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ddNTP	dideoxyribonukleotid trifosfát
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
EtBr	ethidium bromid
FTDNA	Family Tree DNA
G	guanin
GuSCN	guanidinium thiokyanát
KÚP	Kriminalistický ústav Praha
mtDNA	mitochondriální DNA
nDNA	jaderná DNA
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPi	pyrofosfát
PVP	polyvinyl pyrrolidon
PVPP	poly(vinyl-polypyrolidon)
PTB	polypyrimidine tract-binding protein
RT - qPCR	kvantitativní Real – time PCR
rpm	otáčky za minutu
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
STR	krátká tandemová repetice
SDS	sodium dodecylsulfát (laurylsíran sodný)
T	thymin
TE pufr	pufr obsahující především Tris a EDTA
Tris	tris(hydroxymethyl)aminometan, 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

2 Úvod a cíle práce

V průběhu několika posledních desetiletí zaznamenala věda obrovský krok dopředu. Výzkumy, které byly ještě před nedávnem nepředstavitelné jsou dnes běžnou praxí. Touha člověka poznávat stále nové věci se tak může plně realizovat. Pátrání po biologickém i geografickém původu člověka probíhá již řadu desítek (možná i stovek) let. V tomto pátrání nám v současné době výrazně napomáhá i analýza DNA z ostatků lidí, kteří žili v době i před několika tisíci lety.

V současné době se lidé neustále snaží porozumět veškerým informacím, které do své struktury zakódovala molekula DNA během tisíců let své existence. Aby však bylo možné tyto informace zpracovávat, je potřeba je nejprve ze struktury DNA získat. Rozvoj molekulární biologie však nabízí každým dnem nové nástroje, které současné analýzy zdokonalují a pomáhají tak v objevování stále nových poznatků.

Jedním ze zásadních kroků v poznání naší minulosti byl objev možnosti zachování molekuly DNA i velice dlouhou dobu po smrti jedince. Nezáleží přitom na tom, zda se jednalo o ostatky lidské, nebo zvířecí. První objevy tohoto druhu byly učiněny již v polovině osmdesátých let minulého století - nejprve se jednalo o několik set let staré ostatky vyhynulého druhu zebry - *quagga* (Higuchi et al., 1984), v dalších letech se pak začalo i se zkoumáním ostatků lidských (Hagelberg et al., 1989; Pääbo, 1985). Touha po odhalování minulosti tím dostala nový rozměr. K velkému rozvoji genetického zkoumání zaměřeného nejen do minulosti přispělo i objevení metody PCR (Saiki et al., 1985). Do dnešní doby jsme již díky těmto objevům zjistili mnoho cenných informací o naší minulosti, mnoho nám jich však zůstává stále skryto. K odhalení zatím nezodpovězených otázek by mohlo přispět zdokonalení především izolačních a amplifikačních metod. Nejpoužívanější jsou pro výzkum historické DNA (aDNA) dnes izolační metody využívající principu adsorpce na silikát, která byla poprvé publikována v roce 1993 (Höss and Pääbo, 1993). Od této chvíle uplynulo již mnoho času a tato metoda doznala velkého rozvoje a modifikací. Stále se však ukazuje jako neúčinnější při extrakcích z materiálů s malým obsahem DNA (Lee et al., 2010).

Analýza DNA z materiálu, který obsahuje jen velmi malé množství této molekuly, případně DNA vysoce degradovanou vlivem okolního prostředí, je velice obtížná. DNA

může být poškozena například působením vysoké teploty při ohoření ostatků nebo dlouhodobým působením kyselého/zásaditého pH půdy. Možností vzniku poškození v molekule aDNA je samozřejmě celé řada, výsledkem je ale vždy fragmentace a degradace aDNA, která znemožňuje některé běžně používané kroky analýzy recentní DNA. Speciálně pro tyto případy, kdy je aDNA již poškozena a fragmentována, byly vytvořeny miniSTR lokusy. MiniSTR lokusy nám umožňují analýzu menších fragmentů aDNA a tím zvyšují pravděpodobnost úspěchu analýzy degradované aDNA.

Velkým problémem při výzkumu degradované aDNA je její kontaminace pocházející z vnějšího okolí. K této kontaminaci může dojít prakticky při každém kroku analýzy. Rozpoznání vnější kontaminace, zvláště pokud se jedná o několik málo buněk, bývá většinou velice obtížné. Důležité je proto striktní dodržování opatření, která riziko vzniku kontaminace minimalizují.

2.1 Cíle práce

Cílem této práce je ověřit účinnost nově publikovaných protokolů ve srovnání s protokoly dříve používanými při izolaci DNA z kosterního a zubního materiálu. Ověřování bude probíhat nejprve na recentním materiálu a v případě úspěšné izolace DNA z těchto vzorků, i na materiálu datovaném přibližně od 2 tisíciletí př. n. l. po 17. století n. l. Genotypizace úspěšně analyzovaných jedinců bude prováděna miniSTR lokusy (v případě získání kvalitní DNA bude ověřena možnost využití i komerčních kitů obsahujících klasické STR lokusy). V případě získání úspěšného izolačního protokolu bude tento následně zaveden do forenzní praxe.

3 Teoretická část

3.1 Jaderná DNA

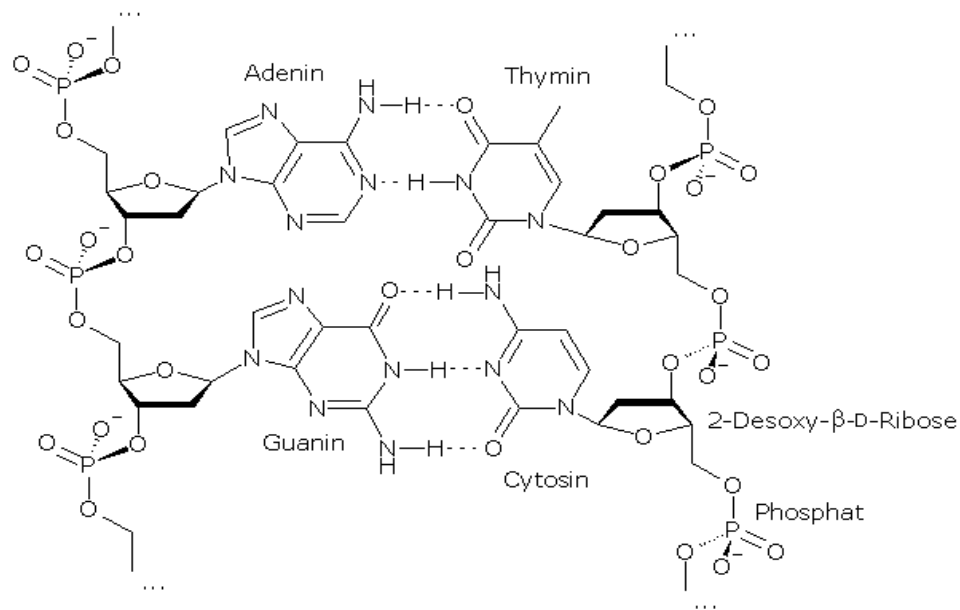
Lidské tělo se skládá z mnoha miliard buněk. V každé z těchto jednotlivých buněk se nachází organizační centrum - jádro - ve kterém se nalézají vždy stejná genetická informace. Výjimku mohou tvořit například zralé erytrocyty, které již jádro neobsahují. Buněčné jádro je jednou z nejdůležitějších organel eukaryotických buněk. V jádře se nalézají většina genetické informace, kterou má buňka k dispozici a která slouží k řízení pochodů v rámci buňky a následně i celého organismu. Tato genetická informace je zakódována uvnitř molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA). DNA v sobě nese informaci pro replikaci buňky i pro syntézu proteinů a enzymů nezbytných v procesech, které v buňce neustále probíhají. DNA je v jádře dobře chráněna od okolního buněčného prostředí pomocí jaderných obalů. Kromě DNA, která se nalézají v jádře je v buňce možné najít také tzv. mimojadernou DNA nacházející se v mitochondriích (viz dále), případně v plastidech v buňce rostlinné.

DNA nacházející se v jádře buňky nese genetickou informaci, která je předávána v rámci rozmnožovacího procesu z jedné generace na generaci další. Při pohlavním rozmnožování si nově vzniklý jedinec ve svém genomu nese jednu polovinu genetické informace získané od otce a jednu polovinu získanou od matky. Jaderný genom je tedy děděn podle Mendelových zákonů. Tento způsob dědičnosti v sobě nese díky kombinaci jednotlivých genomů možnost lépe čelit změnám okolních podmínek a lépe se jim přizpůsobit. Nezastupitelnou roli hraje tento fakt i při určování příbuzenských vztahů.

Základní strukturu DNA tvoří polymer složený z jednotlivých nukleotidů - jedná se o molekulu složenou z dusíkaté (pyrimidinové, případně purinové) báze, cukerného zbytku (deoxyribozy) a fosfátu. Samotnou kostru DNA tvoří cukerný zbytek deoxyribozy a fosfát. Jednotlivé dusíkaté báze poté vedou k variabilitě uvnitř DNA - jsou možné celkem 4 varianty - adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G). Různé kombinace v pořadí za sebou jdoucích nukleotidů vedou k rozmanitosti uvnitř jednotlivých živočišných druhů i mezi nimi. Lidé mají uvnitř své jaderné DNA okolo 3 miliard nukleotidů.

Jelikož je DNA dvouřetězcovou strukturou je nutné, aby byly jednotlivé řetězce spojeny. K tomuto spojení dochází mezi jednotlivými bázemi a je realizováno pomocí

vodíkových můstků (H-můstků). Báze se navzájem párují následovně - A s T pomocí dvou H-můstků a C s G pomocí tří H-můstků (viz obrázek č. 1). Z tohoto vyplývá že spojení mezi C - G je silnější než v případě vazby mezi A - T. Dva řetězce DNA, které jsou navzájem spojeny pomocí vodíkových můstků, jsou navzájem orientovány antiparalelně, tzn. opačně, kdy se 5'konec jednoho řetězce páruje s 3'konce řetězce druhého (čísla udávají pozici uhlíku v deoxyribozovém zbytku). Sekvence DNA je, při procesech probíhajících v buňce, vždy čtena ve směru od 5' konce k 3' konci.



Obrázek č. 1 Vzájemné párování bází v antiparalelních řetězcích DNA. Převzato z www.onlinekolagen.pl

Spojení mezi dvěma antiparalelními řetězci DNA je možné rozrušit během procesu, který se nazývá denaturace. Denuraci DNA je možné vyvolat různými způsoby, například zvýšením teploty na teplotu blízkou bodu varu nebo přidáním chemických látek jako je močovina nebo formamid. Proces denaturace je vratný a lze ho vyvolat například zchlazením DNA, jedná se o proces nazývaný renaturace DNA. Těchto dvou procesů se hojně využívá při současných metodách analýzy DNA, především při amplifikaci pomocí PCR (viz kapitola č. 3.5.5).

DNA je v jádře uspořádána do jednotlivých útvarů nazývaných chromozomy. Lidská buňka obsahuje celkem 22 párů autozomů (nepohlavních chromozomů) a 1 pár gonozomů (pohlavních chromozomů) - muži mají heterogametní sestavu gonozomů (XY)

a ženy homogametní sestavu (XX). DNA je do jednotlivých chromozomů v podstatě sbalena a celá struktura je následně chráněna pomocí speciálních proteinů, nazývajících se histony. V lidské buňce můžeme ve struktuře DNA nalézt celkem 4 různé typy histonů - H1, H2 (vyskytuje se ve dvou formách H2A a H2B), H3 a H4. DNA je „obmotána“ okolo oktameru histonů H2A, H2B, H3 a H4. Tato struktura tvoří tzv. 10 nm vlákno. Celá molekula je poté ještě více z kondenzována navinutím na histon H1. Tímto způsobem vzniká tzv. 30 nm vlákno. Úsek mezi jednotlivými histony H1 je dlouhý 146 bp (base pairs). Šířka kondenzovaného chromozomu je přibližně 700 nm, délka se u různých chromozomů liší.

Chromozomy se téměř ve všech buňkách lidského těla nacházejí v diploidní sestavě, tzn. ve dvou kopiích. Výjimku tvoří pouze buňky zárodečné, v jejichž jádře se nachází pouze haploidní počet chromozomů - 22 autozomů a 1 gonozom (X nebo Y). Při oplození vajíčka spermií dojde k opětovnému obnovení diploidního počtu chromozomů v jádře buňky a tento stav je poté předáván během vývoje celého organismu dělením jednotlivých buněk dále.

Během života téměř každé buňky dochází k jejímu dělení pomocí mitozy. Při mitoze dochází k replikaci - zdvojení - genetické informace a následně k rozdělení do dvou samostatných buněk. Po dokončení mitozy mají nová (dceřinná) i mateřská buňka diploidní počet chromozomů a nesou stejnou genetickou informaci. V některých případech, kdy dojde k chybě při replikaci případně při rozchodu jednotlivých chromozomů do buněk, není genetická informace mateřské a dceřinné buňky naprosto shodná.

Při jiném typu dělení buněk, nazývaném meioza, dochází k redukci počtu chromozomů v jádře buňky na polovinu. Během meiotického dělení vznikají buňky pohlavní. Z jedné mateřské buňky vznikají, narozdíl od mitotického dělení, čtyři buňky dceřinné. To je umožněno dvěma po sobě následujícími mitotickými děleními buňky, první dělení je dělení redukční, kdy dojde ke vzniku haploidní sestavy chromozomů a při druhém dělení již vznikají nové haploidní buňky.

V DNA můžeme najít kódující oblasti a oblasti nekódující. V oblastech kódujících se nacházejí exony genů - oblasti DNA, z nichž je přepisována genetická informace do mRNA během transkripce a následně překládána v procesu translace - vznikají proteiny, enzymy, kódují se látky důležité pro fungování samotné buňky. V oblastech kde

se geny nenalézají, k přepisu informace většinou nedochází a tyto oblasti jsou místem, kde může častěji docházet k mutacím - jedná se o nekódující oblasti DNA. Vyššího výskytu mutací v nekódujících částech genomu se v současné době hojně využívá například ve forenzní genetice při individuální identifikaci jedince. Geny samotné tvoří přibližně 5% sekvence DNA a skládají se z exonů a intronů. Introny nejsou během procesu translace ve většině případů do konečné sekvence proteinu zahrnuty. Pozice ve které se nachází určitá sekvence v molekule DNA je označována jako lokus. Každý gen pro určitý protein se vždy nalézá ve stejném lokusu v obou kopiích daného chromozomu (pokud v tomto místě nedojde k mutaci). Sekvence, která se nalézá v daném lokusu na chromozomu získaném od matky a od otce může, ale nemusí být stejná. Jednotlivé varianty v sekvenci DNA v daném lokusu se nazývají alely. Jednotlivé alely se v genomu nalézají v heterozygotní (rozdílné), případně homozygotní (shodné) sestavě.

V centrální oblasti chromozomu se nalézá centromera, která od sebe odděluje jeho krátké (p) a dlouhé raménko (q). Podle poměru mezi krátkými a dlouhými raménky rozlišujeme několik typů chromozomů - metacentrické, submetacentrické a akrocentrické. U některých chromozomů můžeme zaznamenat absenci krátkých ramének, tyto chromozomy se nazývají telocentrické. V lidském karyotypu telocentrické chromozomy ale nenajdeme. Na centromeru se také váží vlákna, účastníci se rozestupu chromozomů při vlastním dělení buňky. Na konci každého z ramének se nachází oblast označovaná jako telomery. Tato oblast chrání chromozom proti zkracování při replikaci. Jednou z teorií jak udělat buňku nesmrtelnou je i zamezení zkracování telomer. Zda by tato teorie fungovala i v praxi zůstává zatím otázkou.

3.1.1 DNA polymorfismy

Variabilita v DNA mezi jedinci téže populace je založena na kombinaci jednotlivých alel nacházejících se v daných lokusech. Jednotlivé varianty - polymorfismy - v DNA mohou být zkoumány na dvou základních úrovních - na úrovni polymorfismů sekvenčních a délkových.

Při zkoumání sekvenčních polymorfismů se zaměřujeme na pořadí jednotlivých bází v daném lokusu. Mezi sekvenční polymorfismy patří např. SNP (single nucleotide polymorphism; jednonukleotidové polymorfismy) a hypervariabilní oblasti

v mitochondriální DNA (mtDNA). Tyto především jednobodové záměny jsou po genomu hojně rozšířené a lze jich využít např. v populační, evoluční, ale i forenzní genetice.

U zkoumání polymorfismů délkových se zaměřujeme na počet opakování dané sekvence v určitém lokusu. Mezi tyto délkové polymorfismy řadíme VNTR (variable number of tandem repeats) - minisatelity, které jsou zkoumány pomocí metody RFLP (restriction fragment length polymorphism) a STR (short tandem repeats) - mikrosatelity.

První, kdo pozoroval délkové polymorfismy, byl v polovině 80. let 20. století Alec Jeffreys na univerzitě v Leicesteru. Jeffreys se však zpočátku nezabýval přímo polymorfismy samotnými, ale zkoumal svalový protein myoglobin a geny, které tento protein kódují u různých savců. Geny pro tento protein hledal v celé genetické informaci na základě repetitivních nukleotidových sekvencí, které se nacházejí v okolí tohoto genu. Zjistil, že pozice genu je u různých druhů živočichů různá. Další pokusy, ze kterých následně získal výsledky byly již pouze z lidské DNA - zvolené opakující se sekvence se nacházely na různých místech lidského genomu, a navíc se lišily mezi jednotlivci. Postupem času zjistil, že není v podstatě možné nalézt dva jedince, kteří by měli stejný „vzorec“ poskládaný z analýzy těchto repetitivních sekvencí (Jeffreys et al., 1985). Této skutečnosti se následně začalo využívat v kriminalistice při určení pachatele trestného činu. VNTR se nejvíce využívaly především v 90. letech, dnes už je tato metoda ve forenzní genetice spíše raritou.

V současné době se celosvětově jednoznačně nejvíce pro individuální identifikaci jedince ve forenzní a archeogenetice používá analýza STR lokusů. STR lokus je místo, kde se opakuje několik nukleotidů dlouhý motiv (např. TATC, AAAGA apod.). Počet opakování se na jednotlivých chromozomech může lišit v určitém rozsahu, například mezi 10 a 20. Tyto repetitivní sekvence můžeme nalézt hojně rozptýlené po celém genomu.

Kombinace počtu jednotlivých opakování se používá pro určení původu materiálu od daného jedince. Pro analýzu jsou vybírány takové lokusy, které jsou v populaci vysoce polymorfní, aby bylo dosaženo i při celkem malém počtu získaných STR vysoké pravděpodobnosti vyloučení náhodné shody v populaci - řádově stačí desítky markerů, abychom mohli potvrdit, nebo vyloučit shodu. Například jedinec, který má na jednom chromozomu v daném lokusu 12 opakování určité sekvence a na chromozomu druhém opakování 16 - má heterozygotní sestavu alel „12/16“. Tyto údaje jsou nezbytné při

individuální identifikaci jedince. Kombinací většího počtu jednotlivých STR lokusů získáváme při porovnávání několika vzorků větší pravděpodobnost, že biologický materiál pochází z daného jedince.

3.1.2 Nomenklatura STR

Od roku 1994 má označování jednotlivých STR lokusů svá pevně daná pravidla (Bar et. al., 1994). Pokud se lokus nachází uvnitř, nebo poblíž určitého genu, je označení tohoto genu zahrnuto i do názvu příslušného STR - např. TH01, vWa, CSF1PO. Jestliže se lokus nachází mimo genovou oblast, je označen podle pozice, kde se na chromozomu nachází. Pro názornost několik příkladů: D5S818 - D označuje, že se jedná o DNA, následující číslo označuje na kterém chromozomu se daný lokus nalézá, písmeno S označuje jedno-kopiovou (single copy) sekvenci a poslední číslo označuje pořadí lokusu, ve kterém byl na daném chromozomu popsán. Označení gonozomu se provádí písmenem určujícím daný chromozom, např. DYS19 (lokus se nachází na chromozomu Y) případně DXS679 (lokus se nachází na chromozomu X).

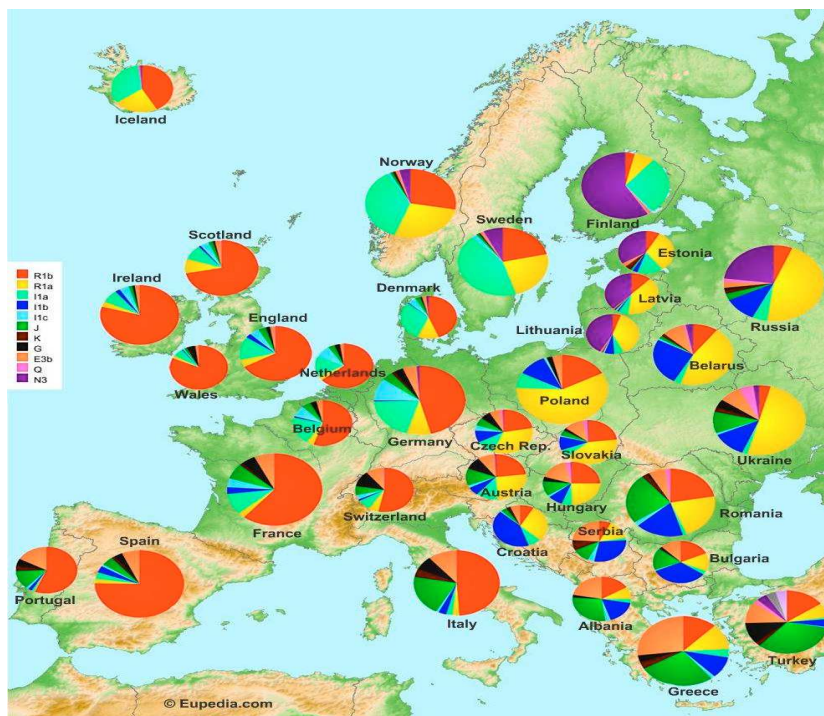
3.1.3 Chromozom Y

Lidský chromozom Y patří mezi nejmenší chromozomy celého našeho karyotypu. Strukturně můžeme Y chromozom rozdělit na dvě části. První z nich je částí menší, která se účastní rekombinace s homologním úsekem chromozomu X. Druhá je pak částí větší (cca 95%), která se rekombinace neúčastní - část nonrekombinantní. Tento nonrekombinantní úsek je vždy předáván v nezměněné podobě po mužské linii z otce na syna. Výjimku v tomto pravidle tvoří mutace, které v DNA chromozomu Y vznikají de-novo.

Výzkum struktury Y chromozomu se využívá v mnoha vědních oborech - forenzní genetice, genealogii a v neposlední řadě i ve výzkumu evoluce a migrace člověka v průběhu minulých tisíciletí. Velká výhoda, kterou je pro genealogické studie přenos z otce na syna, je zároveň například pro forenzní genetiku velkou nevýhodou - tím, že nedochází k rekombinaci, jsou předávány stále stejné geny (a jejich alely), ve kterých nedochází ke změnám. Stejný Y chromozom tak můžeme teoreticky nalézt u všech mužských potomků daného jedince po mnoho generací (Jobling and Tyler-Smith, 1995).

Stejně jako v případě autozomů je možné studium polymorfismů chromozomu Y na úrovni délkové - Y-STR a sekvenční - Y-SNP. Bez znalosti shody autozomálních STR však nemůžeme ani při velkém počtu shodných Y-STR potvrdit, že biologický materiál pochází z jedné osoby.

Prostřednictvím analýz chromozomu Y můžeme studovat vývoj a migraci moderního člověka. Každého muže můžeme podle kombinace alel na jeho chromozomu Y zařadit do určité haploskupiny. V rámci každé haploskupiny můžeme najít několik sekvenčně si podobných haplotypů. Jednotlivé haploskupiny jsou od sebe odděleny nějakou významnou změnou - mutací - ve struktuře chromozomu Y a jsou označovány velkými písmeny A - R. Haplotypy jsou poté značeny číslicemi a malými písmeny (při označování dochází k jejich střídání, např. R1a1). Pro podrobnější určování jednotlivých haplotypů se v dnešní době využívá spíše Y-SNP. Při základních analýzách se standardně využívá jen několik málo Y-STR z celkového počtu přibližně 400 (Hanson and Ballantyne, 2007) - v roce 1997 bylo ustanoveno 9 Y-STR lokusů, které by měly tvořit tzv. jádro „minimální haplotyp“ a vyskytovat se při každé analýze - DYS19, DYS389 I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 a DYS385 a/b a YCAII (Kayser et al., 1997). V roce 2003 byly tyto lokusy doplněny ještě o dva další - DYS438 a DYS439. Pro detailní určení Y- haploskupiny je výhoda znát velké množství alel jednotlivých Y-STR lokusů.



Obrázek č. 2 Rozšíření jednotlivých haploskupin chromozomu Y v Evropě. (Převzato z www.stormfront.org)

3.2 Mitochondrie a mitochondriální DNA

Mitochondrie je jednou z cytoplazmatických organel eukaryotické buňky. Je hlavním sídlem oxidačního metabolismu eukaryot - nacházejí se v ní enzymy citrátového cyklu, enzymy oxidace mastných kyselin a enzymy a redoxní proteiny, podílející se na transportu elektronů a oxidační fosforylaci. Velikost a počet samotných mitochondrií je proměnlivá v závislosti na jejich tkáňovém původu a momentálním metabolickém stavu (Voet and Voet, 2004). Obvykle jsou oválného tvaru o rozměrech v řádu μm .

Mitochondrie je semiautonorní organelou s vlastním genomem, která vznikla pravděpodobně pohlčením cyanobakterie jinou buňkou. Obal mitochondrie tvoří dvě membrány - vnější a vnitřní. Mezi oběma membránami se nachází intermembránový prostor. Vnitřní membrána vybíhá uvnitř mitochondrie ve vchlípeniny, tzv. kristy. Prostor uvnitř mitochondrie ohraničený vnitřní membránou je vyplněn mitochondriální matrix.

Počet mitochondrií v lidské buňce se liší především podle typu tkáně, ve které se buňka nachází. V odlišných buněčných typech může buňka obsahovat desítky, stovky až tisíce mitochondrií (Robin and Wong, 1988). Průměrný počet mitochondrií na jednu buňku byl experimentálně stanoven na 107. I samotná molekula mtDNA se v mitochondrii většinou nachází ve více kopiích. Počet kopií mtDNA se variabilně pohybuje od jedné do patnácti, průměrná hodnota byla experimentálně stanovena na 4,6 mtDNA v jedné mitochondrii. Tento počet dává po vynásobení průměrným počtem mitochondrií na jednu buňku přibližný počet kopií mtDNA v jedné buňce 500 (Sato and Kuroiwa, 1991). Tato skutečnost se stává výhodou při izolaci DNA ze vzorků obsahujících jen malé množství biologického materiálu, jako jsou kosterní a zubní pozůstatky.

Lidská mtDNA má na rozdíl od DNA jaderné, která se vyskytuje ve formě chromozomů, kruhovou strukturu o délce 16 569 bp a kóduje celkem 37 genů - geny pro 12S a 16S rRNA, 22 genů pro tRNA a 13 genů pro proteiny potřebné během oxidační fosforylace a energetické produkce v buňce (Anderson et al., 1981). Ostatní proteiny, potřebné během procesu oxidativní fosforylace a pro fungování mitochondrie, jsou kódovány nDNA, syntetizovány v cytoplazmě a následně transportovány do mitochondrie.

Kruhová molekula mtDNA je stejně jako jaderné chromozomy tvořena dvoušroubovicí DNA, která obsahuje čtyři typy nukleotidů - A, C, T a G. Molekula mtDNA obsahuje dva typy řetězců - řetězec těžký a řetězec lehký. Těžký řetězec nese ve své sekvenci více G než řetězec lehký. Guanin má ze čtyř typů nukleotidů největší molekulární hmotnost, proto se řetězec označuje jako těžký (Butler, 2005). Co do funkce můžeme na molekule mtDNA rozlišit kódující a nekódující oblast. Okolo 90% nekódující oblasti mtDNA se skládá z tzv. kontrolního úseku (Displacement loop, D - smyčka), což je 1 100 bp dlouhý úsek zahrnující replikační počátek - ori - těžkého řetězce (Anderson et al., 1981).

Pro analýzu lidské mtDNA se obvykle využívá jen 610 bp z celkového počtu 16 569 bp. Jedná se o tzv. hypervariabilní regiony nacházející se v D - smyčce mtDNA. Hypervariabilní region I je 342 bp dlouhý úsek nacházející se mezi nukleotidy 16 024 - 16 365. Hypervariabilní region II je 268 bp dlouhý úsek mezi nukleotidy 73 - 340. V některých případech se navíc využívá ještě analýza hypervariabilního regionu III, což je 137 bp dlouhý úsek mezi nukleotidy 438 - 474 (Lutz et al., 2000).

3.3 Starodávná DNA

aDNA v sobě nese spoustu informací, které se v průběhu času naučil člověk číst a využívat. Tyto informace nám mohou sloužit v nejrůznějších oborech - archeologii, antropologii, archeogenetice, paleontologii, genealogii, populační genetice, a mnoha dalších. Ve všech těchto oborech pomáhá odpovídat na některé otázky, které postupem rozvoje vědy a techniky vyvstávají.

Samotná analýza DNA pocházející z historického materiálu je poměrně mladým oborem. Počátky tohoto oboru sahají do poloviny 80. let 20. století, kdy došlo k masivnímu rozvoji technologií v oblasti molekulární biologie. V této době se začala rozšiřovat oblast výzkumu DNA i na archeologický materiál. Termín, který se pro DNA izolovanou z archeologického materiálu hojně po celém světě rozšířil je „ancient DNA“ (starodávná DNA, aDNA). První úspěšná izolace aDNA byla publikována v roce 1984 - jednalo se o analýzu již vymřelého druhu zebry - *quagga* (Higuchi et al., 1984). První izolace aDNA z lidského materiálu byla poté publikována v roce 1985, analýza byla provedena u 5 000 let staré egyptské mumie (Pääbo, 1985). V následujících letech se začalo objevovat

mnoho prací, které se zabývaly aDNA (například Hagelberg et al., 1989, Hagelberg et al., 1991). I když je v současné době věrohodnost mnoha z těchto analýz často zpochybňována, především pro velkou pravděpodobnost výskytu kontaminace, byly tyto práce nesporně velkým krokem v oblasti molekulární genetiky. Dalším důležitým a revolučním krokem v analýze aDNA je vynalezení metody amplifikace pomocí PCR (Saiki et al., 1985). Pomocí PCR je teoreticky možné vytvořit i několik milionů kopií určitého úseku DNA jen z jedné jediné molekuly DNA (viz kapitola 3.5.5). Tato skutečnost umožnila analýzu vzorků, kde je přítomno jen několik málo buněk, v extrémních případech jen jedna jediná buňka.

V živých buňkách dochází v molekule DNA vlivem působení nejrůznějších enzymů k neustálým poškozením a následným opravám. Pokud však k opravě nedojde včas, zafixuje se tato změna do struktury DNA - vznikne mutace. Po smrti organismu již k opravným mechanismům nemůže docházet - buněčné kompartmenty se začnou rozpadat a jejich obsah se dostane do buněčné cytoplazmy. Následně začne pod vlivem působení enzymů docházet i k postupnému rozpadu genetické informace. Tento proces je zahájen prakticky ihned po smrti buněčnými enzymy zvanými endonukleázy (enzymy štěpící DNA). Díky endonukleázám dochází k poměrně rychlému štěpení molekuly DNA na menší úseky - k tzv. fragmentaci. Činnost endonukleáz může být zpomalena, případně úplně zastavena ve velmi specifických podmínkách - jedná se především o rychlé vysychání tkáně a nízkou teplotu, případně je DNA absorbována do minerální matrix. V delším časovém horizontu ovlivňují proces rozpadu DNA především fyzikální a chemické faktory vnějšího okolí. Těmito faktory mohou být například oxidace a/nebo hydrolýza, kyselé/zásadité pH půdy, chlad/vysoká teplota, apod. Při změnách ve struktuře molekuly DNA dochází samozřejmě k nevratné ztrátě části informace, kterou ve své struktuře nesla.

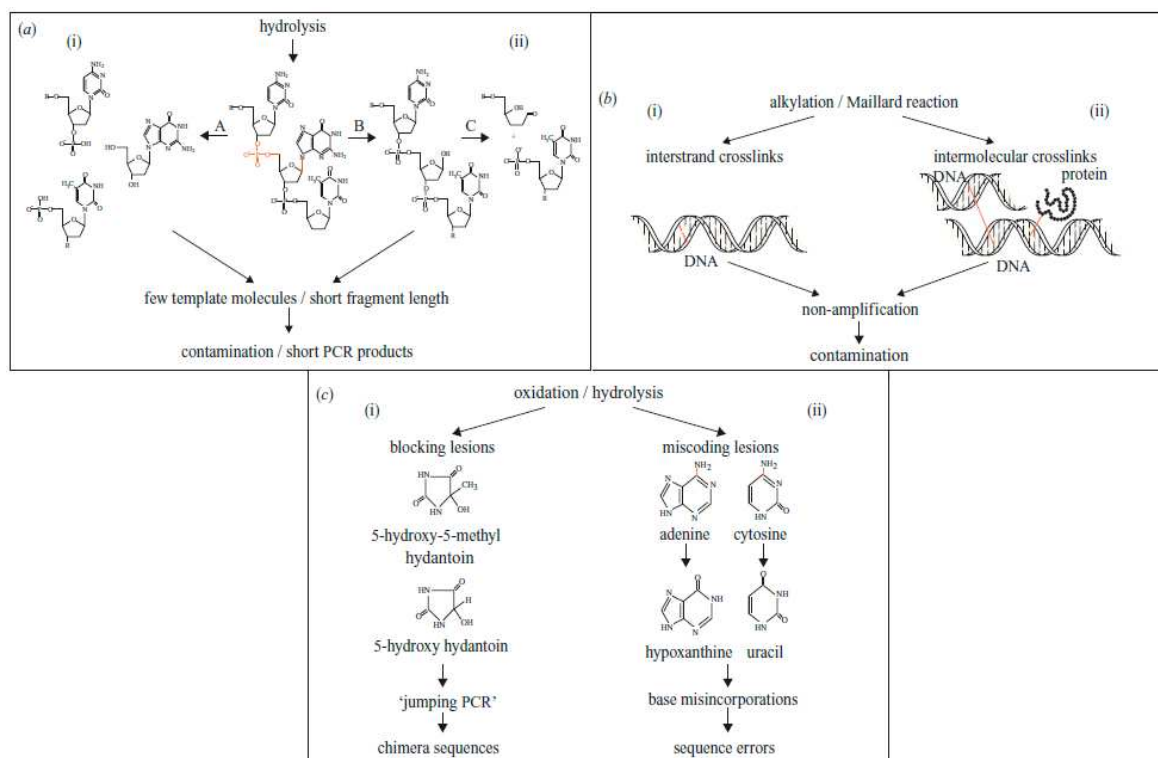
Rozpad DNA na malé fragmenty nastává relativně brzy po smrti a dále postupuje jen velice pomalu. V archeologických vzorcích je díky této skutečnosti možné ve většině případů nalézt jen fragmenty o délce mezi 100 až 500 bp, nejčastěji je to do 300 bp (Handt et al., 1996; Höss et al., 1996; Pääbo, 1989; Pääbo et al., 1989). Jen velice výjimečně se vyskytují i fragmenty delší než 1 kbp. Experimenty, které v roce 1989 prováděl Pääbo, prokázali přítomnost stejně dlouhých fragmentů DNA (okolo 300 bp) v kostech starých 4 000 a 13 000 let (Pääbo et al., 1989).

Fragmentace nastává, jak již bylo zmíněno výše, vlivem enzymatických procesů, které začínají působit téměř ihned po smrti organismu, ale i díky neenzymatickému hydrolytickému „lámání“ fosfodiesterových vazeb mezi cukernou a fosfátovou složkou kostry DNA (Lindahl, 1993a). Tímto způsobem vznikají zlomy pouze na jednom z vláken molekuly DNA. Ke zlomům způsobených hydrolýzou může také docházet v oblasti glykosidické vazby mezi dusíkatou bází a cukernou kostrou DNA. V takovémto případě dochází následně k výskytu tzv. abazických míst (Lindahl, 1993b). Jakmile je jednou nukleotid z DNA uvolněn, zvyšuje se na tomto místě rychlost výskytu dalších změn, především zlomů (Friedberg et al., 1995). Fragmentace aDNA je jedním z hlavních důvodů nemožnosti amplifikace delších úseků DNA.

V mnoha případech není překážkou amplifikace DNA jen přítomnost zlomů, nebo chybění bází, ale výskyt poškození, které způsobují blok při elongaci DNA pomocí Taq polymerázy. Tato poškození vznikají nejčastěji působením volných radikálů (především peroxidového, hydrogen peroxidového a hydroxy radikálů), které jsou důsledkem vnější radiace. Vlivem oxidativních procesů vznikají produkty nazývané se hydantoiny (Höss et al., 1996), které brání elongaci DNA při její amplifikaci pomocí PCR. Pokud je ve vzorku přítomno větší množství dvou oxidovaných pyrimidinů - 5-hydroxy-5-methyl hydantoinu a 5-hydroxy hydantoinu - je amplifikace pomocí PCR prakticky téměř nemožná.

Dalším typem poškození v aDNA jsou tzv. cross - linky (Poinar et al., 1998), které také blokují polymerázu při elongaci vznikajícího řetězce DNA.

Mnoho dalších poškození se známým i neznámým způsobem vzniku se může vyskytovat v aDNA. Tato poškození nemusí způsobovat nemožnost amplifikace, ale mohou vést např. k chybnému zařazení báze a následně k chybnému určení sekvence. Nejčastěji se vyskytuje hydrolytická ztráta amino skupiny adeninu, cytosinu, 5-methylcytosinu a guaninu, což vede ke vzniku hypoxanthinu, uracilu, thyminu a xanthinu (Friedberg et al., 1995). Tyto změny způsobují špatné zařazení bází - A místo G a C namísto T, v obou případech se jedná o transici. Tato skutečnost způsobuje zkreslení získaných výsledků. Vyšší výskyt transicí v degradované DNA je přisuzován vysoké rychlosti hydrolytické deaminace cytosinu a 5-methyl cytosinu na uracil respektive thymin (Gilbert et al., 2003a, 2003b).



Obrázek č. 3 Některé post mortem vzniklé modifikace DNA. (převzato z Willerslev and Cooper, 2005; upraveno)

Všem výše uvedeným skutečnostem je třeba přizpůsobit další postup zkoumání aDNA - především typ použitých izolačních a amplifikačních metod. Ostatní kroky analýzy aDNA jsou shodné s metodami populační, či forenzní genetiky.

Během let výzkumu aDNA bylo navrženo i několik metod, které by měly umět odhalit změny, které v DNA nastaly až post-mortem a zvýšit tak kvalitu i kvantitu amplifikované aDNA a věrohodnost následné sekvenace. Jedním z takovýchto postupů je použití Uracil - N - glykosylazy, která při amplifikaci aDNA ukončí prodlužování řetězce v místě, kde se nachází produkt vznikající při deaminaci cytosinu - uracil. Amplifikace daného úseku probíhá pouze podle druhého vlákna, kde je zařazen sekvenčně správný nukleotid. Tento postup je jedním z možných způsobů jak omezit výskyt falešných výsledků, způsobených chemickými změnami v aDNA (Hofreiter et al., 2001a; Gilbert et al., 2003a).

Všeobecně se předpokládá, že míra degradace DNA závisí především na vnějších faktorech, zatímco časový úsek, který uplynul od smrti je až druhořadým ukazatelem. DNA molekula nemůže pravděpodobně přežít déle než 10 000 let v mírném (temperate) klimatu a déle než 100 000 - 500 000 let ve specifických podmínkách, jako je rychlé

vysušení, nízká teplota a anaerobní prostředí (Willerslev and Cooper, 2005). Ukazuje se, že dlouhodobě stálá nízká teplota je pravděpodobně klíčovým faktorem pro zachování DNA (Hofreiter et al., 2001b; Smith et al., 2001; Willerslev et al., 2004). Dřívější práce předpokládaly možnost izolace aDNA i z ostatků starších více jak 1 000 000 let (Golenberg et al., 1990; Soltis et al., 1992), později se však ukázalo, že tyto odhady byly zkresleny přítomností novodobé kontaminace ve vzorcích (Pääbo and Wilson, 1991; Young et al., 1995).

Jako jedna z možností jak určit zachovalost aDNA vzorku se v minulosti ukázala analýza míry racemizace aminokyselin (Poinar et al., 1996). Při delším časovém úseku uplynulém od smrti jedince mohou degradační procesy poškodit integritu různých biomolekul a tak ovlivnit reliabilitu metod používaných pro analýzu aDNA. V lidském těle vznikají přirozenou cestou pouze L-aminokyseliny (enantiomery), D-aminokyseliny se hromadí v tkáních s velice pomalým metabolismem - například v dentinu a kostech. Po smrti dochází k dalšímu neenzymatickému vzniku směsi L- a D- enantiomerů., vzniká tak opticky neaktivní racemická směs (poměr enantiomerů 1:1). Podle poměru L- a D- forem aminokyselin lze určit dobu uplynulou od smrti jedince.

Pro tyto výzkumy se používá především kyselina asparagová, (Dobberstein et al., 2008; Ritz et al., 1993). Je možné ale i využití dalších aminokyselin - glutaminu, nebo glutamové kyseliny, serinu, threoninu, argininu a alaninu (Griffin et al., 2008).

Dobberstein (Dobberstein et al., 2008) určoval míru racemizace asparagové kyseliny v dentinu u jedinců, kteří měli rozdílný post mortem interval - 3 dny, 2 měsíce, 8, 400, 700 a 1 700 let. Stejně jako Ogino (Ogino et al., 1985) prokázal, že aplikace této metody na jedince, kteří jsou po smrti jen krátkou dobu (cca do 50 let) není v podstatě možná. Rozdíly v poměru L- a D- enantiomerů jsou u těchto jedinců, vzhledem k tomu, že je degradace proteinů a na ní závislá rychlost racemizace aminokyselin ihned po smrti velice nízká, tak zanedbatelné, že není možné přesné určení doby smrti. V případě delších post mortem intervalů závisí míra racemizace na i specifických vnějších podmínkách. Pokud nebyly okolní podmínky tak extrémní, aby zvýšily (vysoká teplota), nebo naopak snížily (permafrost) rychlost degradace biomolekul (například kolagenu), může být tato metoda použita pro přibližné určení post mortem intervalu. Největší rozdíly v míře racemizace, které se významně zvyšují s rostoucím post mortem intervalem, byly zaznamenány v případě kolagenu.

3.4 Hlavní zdroje aDNA

Jako nejčastější zdroje aDNA slouží díky větší pravděpodobnosti zachování DNA především kosterní a zubní pozůstatky. Tyto typy tkání obsahují větší podíl anorganické složky a molekula DNA je v buňkách těchto tkání daleko lépe chráněna před působením vlivů okolního prostředí. Tyto typy tkání také nepodléhají hnilobným procesům, jako je tomu u tkání měkkých a tak je možné jejich zachování po velice dlouhou dobu. V některých specifických případech však je možné, např. při rychlém vysušení materiálu, že se zachová aDNA i v měkkých tkáních - především v kůži a svalech - po dobu i několika tisíců let (Pääbo, 1985).

3.4.1 Kostní tkáň

Kost je specializovaným typem pojiva obsahujícím mezibuněčnou hmotu - matrix - a tři typy kostních buněk - osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Pro efektivní přenos látek ve zvápenaté matrix jsou všechny kostní buňky navzájem propojeny buněčnými výběžky. Kosti jsou na zevním a vnitřním povrchu opatřeny vazivovou vrstvou - periostem (zevní vrstva) a endostem (vnitřní vrstva).

Anorganická hmota tvoří přibližně 50% suché hmotnosti kostní matrix. Nejvíce zastoupenými prvky jsou vápník a fosfor, které vytvářejí krystaly hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dalšími ionty mohou být: uhličitany, citráty, hořčík, draslík a sodík. Velké množství anorganických látek pomáhá chránit buňky i po smrti organismu.

Organickou hmotu kostní matrix tvoří z 95 % kolagen I a amorfni matrix s glykosaminoglykany navázanými na proteiny. Odvápněná kost obsahuje velké množství kolagenu, a proto si i po dekalifikaci zachovává svůj tvar.

Buněčnou složku kosti tvoří:

- Osteoblasty, které jsou uloženy na povrchu kostní tkáně těsně vedle sebe a jsou navzájem propojeny cytoplazmatickými výběžky, syntetizují organické součásti kostní matrix (kolagen I, proteoglykany a glykoproteiny). Pokud jsou osteoblasty životaschopné, zajišťují ukládání

anorganických komponent - díky polarizaci buňky se tak děje pouze na stranu přivrácenou ke kosti. Osteoblasty se po zalití do nově vytvořené matrix přemění v osteocyty.

- Osteocyty jsou umístěny v lakunách vzniklých ukládáním kostní matrix okolo osteoblastů. V jedné lakuně je vždy umístěn jen jeden osteocyt, který je se sousedními osteocyty propojen pomocí cytoplazmatických výběžků.
- Osteoklasty jsou velké, mnohjaderné, bohatě rozvětvené a pohyblivé buňky, které resorbují kostní tkáň. Vývojově osteoklasty nepatří k osteoklastům a osteocytům. Vzhledem k tomu, že obsahují více jader, obsahují i více genetické informace a tak jsou vhodné k analýzám aDNA.

Makroskopicky lze pak kostní tkáň rozdělit na kompaktní a spongiózní (houbovitou). Kompaktní tkáň je pevná a tvrdá, tvoří souvislou hmotu. Spongiózní kostní tkáň je tvořena sítí kolagenních trámečků. Při mikroskopickém pozorování je však patrné, že oba typy mají stejnou základní histologickou stavbu. Pro analýzu aDNA je obecně vhodnější kompaktní tkáň, ve které je obsaženo více buněk a je větší pravděpodobnost jejich zachování.

Na těle člověka rozlišujeme několik typů kostí - kosti dlouhé, krátké, ploché a nepravidelného tvaru. U dlouhých kostí jsou středy kostí tvořeny spongiózní (s kompaktní vrstvičkou na povrchu) a proximální a distální konce kostí kompaktní (s malou oblastí spongiózy sousedící s kostní dřevinou). Krátké a nepravidelné kosti jsou většinou vyplněny spongiózou a kryty kompaktní. Ploché kosti mají dvě vrstvy kompakty a mezi nimi jednu vrstvu spongiózy. Dutinky spongiózních kostí a dutiny dlouhých kostí jsou vyplněny hematopoetickou kostní dřevinou.

3.4.2 Zubní tkáň

Zubní tkáň obsahuje různé typy buněk a zubní hmotu - zubovinu (dentin). Spodní část zubu je kryta cementem, horní část sklovinou (email). Dutina uvnitř zubu je vyplněna dřevinou. Zub je upevněn závěsným aparátem v alveolárním výběžku čelisti. Chrup zdravého

dospělého člověka tvoří 32 zubů (8 řezáků, 4 špičáky, 8 zubů třenových, a 12 stoliček). Dětský (mléčný) chrup obsahuje jen 20 zubů. Základní stavba všech typů zubů se neliší.

Jednotlivé složky zubu a buňky vyskytující se v nich:

- Nejpodstatnější složkou skloviny jsou vápenaté soli (přes 95%), z nichž většinu tvoří hydroxyapatit. Organické látky tvoří jen asi 0,5% a představují je hlavně amelogenin a enamelin. Při odvápnění se sklovina rozpadne, protože na rozdíl od kosti neobsahuje žádný kolagen. Sklovina zubu je tvořena činností vnitřních buněk ameloblastů. Ameloblasty jsou nově tvořenou sklovinou posouvány směrem k povrchu zubu a při prořezávání zubů se z povrchu zubu samovolně odstraní. Z tohoto důvodu je sklovina pro analýzu aDNA nevhodným vzorkem, má vzhledem ke své pevnosti však nezastupitelnou funkci v ochraně buněk nacházejících se pod ní.
- Zubovina (dentin) vytváří základní tvar zubu, má mezenchymální původ a je produktem odontoblastů, které jsou uloženy na rozhraní dentinu a dřene zubu. Dentin je měkčí než sklovina, obsahuje asi 80% anorganických (hydroxyapatit) a přibližně 20% organických (kolagen I) látek.. Tvorba dentinu pokračuje, na rozdíl od skloviny, i po ukončení vývoje zubu.
- Kořen zubu je kryt zubním cementem. Svou strukturou se zubní cement nejvíce podobá kosti. Cement, obvykle na úzkém pruhu, v krajině zubního krčku překrývá ukončení skloviny, řidčeji končí právě na její hranici. Buňky tvořící cement se nazývají cementocyty a jsou, stejně jako osteocyty v kosti, uloženy v dutinkách tvořených sekundárním cementem.
- Dřeň je tvořena jemným vazivem, které vedle charakteristických buněk, vláken a základní amorfní hmoty obsahuje bohaté cévní a nervové pleteně. Dřeň vyplňuje dutinu zubu a kořenového kanálku. Buňkami zubní dřene, vedle charakteristicky uspořádaných odontoblastů, jsou především fibroblasty.

3.5 Analýza vzorku

3.5.1 Primární vizuální analýza

Tohoto prvotního kroku se účastní většinou jen forenzní antropologové, odontologové, případně pracovníci archeologického výzkumu. Hlavním cílem je určení původu ostatků - lidský, případně zvířecí. V případě, že to stav ostatků dovoluje, provádí se i odhad věku a pohlaví daného jedince.

Následné kroky analýzy jsou již prováděny v genetické laboratoři.

3.5.1.1 Výběr místa pro odebrání vzorku

Jelikož je zubní tkáň jednou z nejtvrdějších tkání nacházejících se v lidském těle je vysoká pravděpodobnost jejího zachování. V případě nálezů zubu je možné vzorek pro analýzu odebrat z dentinu nebo ze zubní dřevě. Dřeň ale bývá velice často působením vnějších podmínek vysoce degradovaná a odebrání vzorku se tedy provádí jen z dentinu, který je pod vrstvou skloviny lépe chráněn (Shimora et al., 2004).

Pokud je nutné zachování některých morfologických charakteristik zubu je dentin odebírán odontology (Edson et al., 2004). Dentin je pro vzorky odebírán především ze zubního kořene. Vzorky po odebrání mohou vážit okolo 0,1 - 0,5 g (Sampietro et al., 2005).

Dřeň, pokud se zachová, se odebírá ze dřevěné dutiny uvnitř zubu. Na oddělení korunky a kořene je možné použít např. diamantový řezací kotouč. Kořen je poté diamantovým kotoučem ještě rozříznut po střední linii aby bylo možné odebrat tkáň dřevě (Pfeiffer et al, 1998; Mörnstad et al., 1999).

U kosterního vzorku je v optimálním případě proveden odběr z dlouhých kostí - kosti stehenní (femuru), kosti pažní (humeru), kosti holenní (tibiie) (Anslinger et al., 2001). V některých případech je možný i odběr ze žeber (Stone and Stoneking, 1998). Ve většině případů se odebírá kousek kosti z jejího středu, kde je kost více kompaktní a proto obsahuje i více buněk. Pro odběr se většinou vybírá takové místo, aby nedošlo k celkovému poškození kosti a ta mohla být následně využívána k dalším analýzám prováděným archeology, nebo antropology.

3.5.2 Očištění a příprava vzorku

Jedním za zásadních kroků při práci s aDNA je očištění vzorku. Na povrchu kosti/zubu se nachází nejvíce „látek“, které by při následné izolaci aDNA mohly být zdrojem kontaminace - novodobá DNA pracovníků např. archeologického výzkumu, zvířecí, případně bakteriální DNA. Tuto vrstvu je proto nutné co nejlépe odstranit, abychom případné kontaminaci novodobou DNA předcházeli.

Jestliže byly ostatky uloženy přímo v zemi je nutné kosti/zuby nejprve očistit od zeminy, případně zbytků měkkých tkání a až následně pokračovat v dalším hlubším čištění (Hagelberg and Clegg, 1991). Toto prvotní očištění je možné provádět například vysterilizovaným skalpelem.

Následně je možné několik postupů - očištění povrchu vzorku ještě pomocí maceračních a chemických metod - používá se například omytí v destilované vodě, bělicím roztoku chlornanu (Mörnstad et al., 1999; Stone et al., 2001), popř. je možno účinek chlornanu zvýšit použitím ultrazvukové lázně (Nelson and Melton, 2007) a ethanolu, jehož koncentrace se může pohybovat mezi 70 - 100% (Pfeiffer et al., 1998; Nelson and Melton, 2007; Davoren et al., 2007). Vysušení vzorku se může provádět přirozeně vzduchem (Edson et al., 2004) nebo při zvýšené teplotě okolo 50°C (Davoren et al., 2007).

Nezastupitelnou úlohu má mechanické čištění povrchu vzorku, které je možné provádět několika způsoby - používají se nejrůznější brusky, skalpely, nebo i smirkový papír (Steadman et al., 2006; Davoren et al., 2007). Při čištění se odstraní horní vrstva kosti o tloušťce přibližně 2 - 3 mm (Davoren et al., 2007). Množství odstraněné kosti samozřejmě závisí na zchovalosti a dostupném množství kostní tkáně. Pokud se na odebraném vzorku nachází prasklina, vyřízne se okolo ní kousek kosti pro dokonalé očištění vzorku (Edson et al., 2004).

Po očištění se vzorek rozdrťí na jemný prášek, který se poté umístí do izolačního roztoku. Vzorek se na prášek rozmělní pomocí kostního nebo mineralogického mlýnku, nebo je možné využít třecí vibrační zařízení (Stone and Stoneking, 1998). Na rozdrčení kosti je také možné použít třecí misku s těrku (Steadman et al., 2006). Před rozemletím v mineralogickém mlýnku je možné vzorek nejprve zmrazit pomocí tekutého dusíku (Bender et al., 2000). V současné době se nejvíce využívá mletí ve speciálním mlýnku,

ve kterém dochází ve střídavém magnetickém poli k rozdrčení vzorku již dříve zmrazeného v tekutém dusíku (Lee et al., 2010).

Existuje i několik chemických a maceračních postupů pro očištění kosti. Například Steadman (Steadman et al., 2006) testoval vliv různých maceračních a chemických technik na zachování DNA ve vzorku kosti. Jako vzorky byla ve studii použita prasečí žebra. Techniky lze v jeho práci rozdělit do šesti základních skupin: bakteriální macerace ve vodě s pokojovou teplotou, bakteriální macerace v teplé vodě (teplota okolo 37°C), macerace varem (voda projde přes 100°C, případně zahrnuje použití mikrovln), chemická macerace (bělení chlornanem sodným, nebo peroxidem vodíku), enzymatická macerace (zahrnuje především papain, pepsin a trypsin, někdy se používá i prací prášek) a macerace s bezobratlými živočichy. Každá z výše uvedených technik je jinak časově náročná a má jiné účinky na kost (více viz Steadman et al., 2006). Tato studie ukázala, že nejšetrnější macerační metody pro extrakci DNA z kosti a následnou amplifikaci jsou ty, při kterých se pouze na nutnou dobu zvýší teplota, tedy macerace horkou vodou, macerace varem, použití mikrovln a použití detergentu/uhličitanu sodného.

3.5.3 Extrakce DNA

Dalším zásadním krokem analýzy aDNA je její izolace z buněk. Základním principem izolace je, že se připravený - rozdrčený - vzorek vystaví směsi organických činidel, která separují DNA od zbylého biologického materiálu, např. proteinů. Směs se poté stočí na centrifuze a DNA zůstane rozptýlena v horní vrstvě. Ostatní biologický materiál zůstane ve spodní organické vrstvě nebo na rozhraní obou vrstev. Horní vrstva se poté odfiltruje a zkoncentruje. DNA se pročistí a připraví k následné amplifikaci

Metody izolace DNA z kosterního a zubního materiálu je možné rozdělit podle několika kritérií, nejzákladnější z nich je podle používaných reagensů:

- Metody založené na phenol/chloroformové izolaci a následné alkoholové precipitaci (Hanni et al., 1995; Ricaut et al., 2005)
- Metody využívající silikátové mikropartikule (Höss and Pääbo, 1993; Rohland and Hofreiter, 2007; Yang et al., 1998)

Objevily se i práce, kde se využívali nejrůznější konvenční i méně konvenční postupy - použití Chelexu 100 (chelatační styren-divinylbenzenová pryskyřice) (Faerman et al., 1995; Faerman et al., 1998), Dextranu Blue (Kalmár et al., 2000) i například Coca Coly (Scholz and Pusch, 1998).

V dnešní době je nejvíce využívanou metodou dekalifikace vzorku pomocí EDTA a proteinázy K, která naštěpením proteinů napomáhá uvolnění DNA, a následná izolace silikou. Metoda izolace pomocí směsi phenol/chloroform je již na ústupu, ale stále se ještě v některých novějších pracích vyskytuje (Ricaud et al., 2005)

3.5.3.1 Extrakční pufr

Pro uvolnění DNA z kosterního/zubního vzorku je nutné použití extrakčního pufru. Jeho základní složení bývá vždy stejné, ale může se mírně lišit podle jednotlivých protokolů. Nejobvyklejší složení extrakčního pufru obsahuje 10 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% SDS (Davoren et al., 2007; Edson et al., 2004; Pfeiffer et al., 1998) a proteinázu K (20 mg/ml). Proteináza K se používá především pro její schopnost štěpení proteinů, které pocházející hlavně z kostní matrix. Množství extrakčního pufru se pohybuje od 400 μ l (Foran, 2006) až po 3 ml (Edson et al., 2004) podle použitého protokolu a je samozřejmě závislé na množství rozdrceného vzorku. Vyskytují se i různé modifikace složení extrakčního pufru: Anslinger (Anslinger et al., 2001) popsal extrakční pufr složený z 1 M Tris, 1 M KCl, 10% SDS a 0,5 M EDTA, obsahující navíc 0,4 M DTT a proteinázu K. Na 0,5 g kosti bylo v jeho práci použito 2 ml extrakčního pufru a 2 mg proteinázy K a inkubováno po dobu 2 dnů při teplotě 56°C.

3.5.3.2 Fenol - chloroformová izolace DNA

Vzorek se v extrakčním pufru (viz výše) nechává inkubovat nejčastěji přes noc při zvýšené teplotě 56°C (Pfeiffer et al., 1998; Rennick et al., 2005; Foran, 2006; Edson et al., 2004). Po inkubaci se realizuje vlastní extrakce uvolněné DNA - ke vzorku se přidá směs fenol:chloroform:isoamylalkohol, jednotlivé složky jsou ve směsi v poměru 25:24:1. Po protřepání vzorku vznikne horní vodná a dolní organická vrstva. Isoamylalkohol napomáhá zvyšování rozpustnosti fenolu v chloroformu. Mezi oběma vrstvami - vodné

a organické - dojde k vytvoření prstence sražených proteinů. K dokonalému oddělení fází dojde až po centrifugaci. Postup je nutné opakovat až do úplného vyčištění vzorku od proteinů, poté následuje promytí n - butanolem (Pfeiffer et al., 1998; Edson et al., 2004), nebo promytí jen chloroformem a isoamylalkoholem v poměru 24:1 pro odstranění veškerého fenolu ze vzorku (Davoren et al., 2007).

Po izolaci je možné ještě zkoncentrování pomocí mikrokonzentrátoru (například Centricon - 100[®]).

3.5.3.3 Adsorpce na silikát

Základním principem této metody je, že se DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na povrch silikátových mikroparticulí - k roztoku obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic (vyrobené z dioxidu křemíku). Při protřepávání (vortexování) směsi dochází ke snadnějšímu ulpívání DNA na částice. Zbylý buněčný obsah zůstává rozptýlen v roztoku a lze jej následně jednoduše odstranit - částice se nechají usadit, nebo se může usazení urychlit centrifugací, odsaje se supernatant nad částicemi a samotné částice se znovu propláchnou novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovné centrifugaci a odsátí supernatantu zůstane na částicích adherovaná čistá DNA. Tu pak lze z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který již chaotropní soli neobsahuje. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimiž je čistý roztok DNA. Ten se následně přesune do nové zkumavky.

Pro aplikaci základního principu adsorpce DNA na silikát existuje více postupů.

První z těchto postupů byl popsán v roce 1993 Hössem a Pääbem (Höss and Pääbo, 1993). Při tomto postupu se k rozdrčenému kostnímu vzorku přidá extrakční pufr složený z 10 M 0.1 M Tris - HCl pH 6.4, 0.02 M EDTA pH 8.0 a 1.3% Triton X - 100 obohacený o guanidinium thiokyanát (GuSCN). GuSCN působí jako chaotropní činidlo, které napomáhá denaturaci proteinů a zároveň napomáhá vytvoření vysoce specifické vazby DNA a silikátových mikroparticulí. Po inkubaci při teplotě 60°C po dobu jedné až několika hodin a následné centrifugaci se odebraný supernatant nechá znovu inkubovat v extrakčním pufru se suspenzí silikátových částic, a to po dobu 10 min při pokojové teplotě. Poté se silikátový pelet dvakrát promyje pufrům složeným z 10 M GuSCN

a 0,1 M Tris - HCl, pH 6,4, dvakrát v 70% ethanolu a jedenkrát v acetonu. Po vysušení peletu při teplotě 56°C se DNA vymyje pomocí 65 µl vody nebo TE pufru. V případě delší časové prodlevy mezi izolací a následnou amplifikací se vzorek DNA skladuje při -20°C (Höss and Pääbo, 1993).

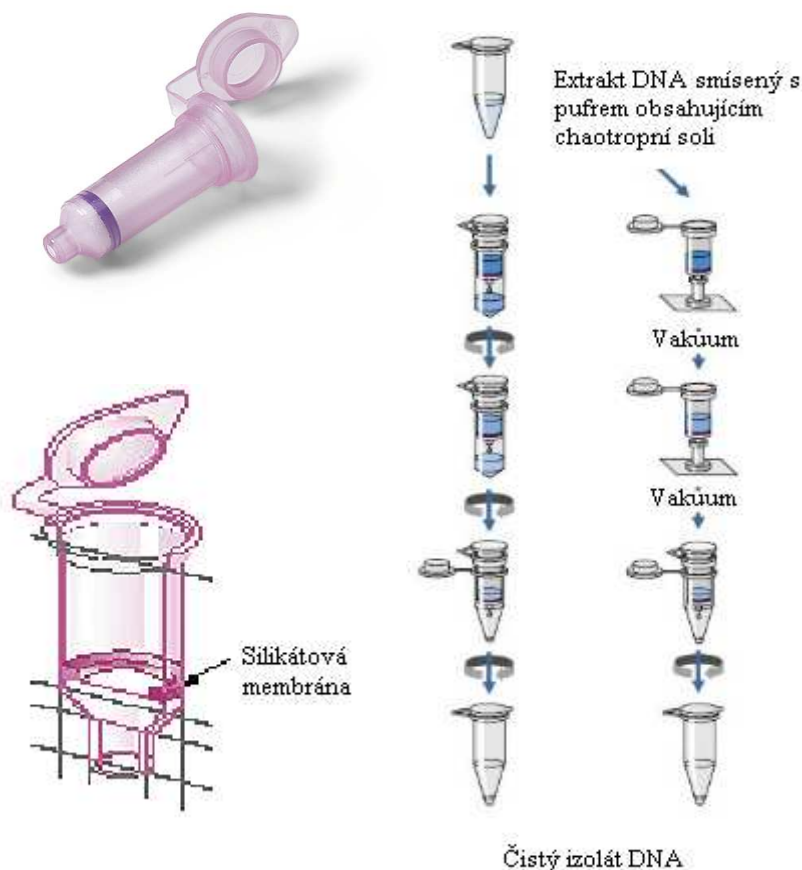
Metoda má kromě nesporných výhod, jako jsou vysoká extrakční výnosnost, snadnost a rychlost i několik nezanedbatelných nevýhod. Jednou z možných nevýhod je především to, že silikátové mikropartikelky mohou být inhibitory následné PCR, proto je nutné dokonalé vyčištění extraktu.

V roce 2007 vyšla práce Rohlanda a Hofreitera (Rohland and Hofreiter, 2007) upravující původní Hössovu metodu. Při tomto postupu se kostní prášek přidá do extrakčního pufru obsahujícího 0,45 M EDTA, pH 8,0, 0,5% A - lauroylsarcosin, 1% PVP, 50 mM DTT, 2,5 mM PTB a 0,25 mg/ml proteinázy K. Po inkubaci přes noc při teplotě 37°C ve tmě a centrifugaci následuje odebrání supernatantu, který se přidá k vazebnému pufru obsahujícímu 5 M GnSCN, 25 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0 a 15 µl suspenze silikátových mikropartikelk. Inkubace probíhá po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Po centrifugaci se supernatant odstraní a pelet se jedenkrát promyje vazebným pufrům, který je již bez obsahu silikátových mikropartikelk a jedenkrát pomocí NewWASH roztoku (složení viz Rohland and Hofreiter, 2007). Následně se pelet vysouší při 56°C po dobu 7 minut a DNA se nakonec vymyje pomocí 50 µl TE pufru při teplotě 56°C po dobu 10 minut. Po centrifugaci se vodný roztok přemístí do nové zkumavky.

V současné době je již klasická adsorpce na silikátové mikropartikelky na ústupu a je používána především izolace pomocí promývání přes komerčně dodávané kolonky, které mají silikátovou membránu (viz obrázek č. 4). Extrakt obsahující DNA se smísí s pufrům obsahující chaotropní soli. Po důkladném promíchání dochází při promývání této směsi (centrifugací, nebo s použitím vakua) přes kolonku k ulpívání DNA na membránu. Kolonka je následně pročištěna pufrům obsahujícím mimo jiné 96% ethanol. Z membrány je DNA uvolněna pufrům, který neobsahuje chaotropní soli, případně je možné použít i čistou destilovanou vodu.

Výhodou této modifikace je především to, že již není potřeba odstraňovat silikátové mikropartikelky ze vzorku a nehrozí tak jimi způsobená inhibice následné amplifikace.

Tato metoda byla popsána v mnoha pracích, zabývajících se izolací aDNA například Yangem (Yang et al., 1998), Anderungem (Anderung et al., 2008) nebo Davorenem (Davoren et al., 2007). Více viz příslušná literatura.



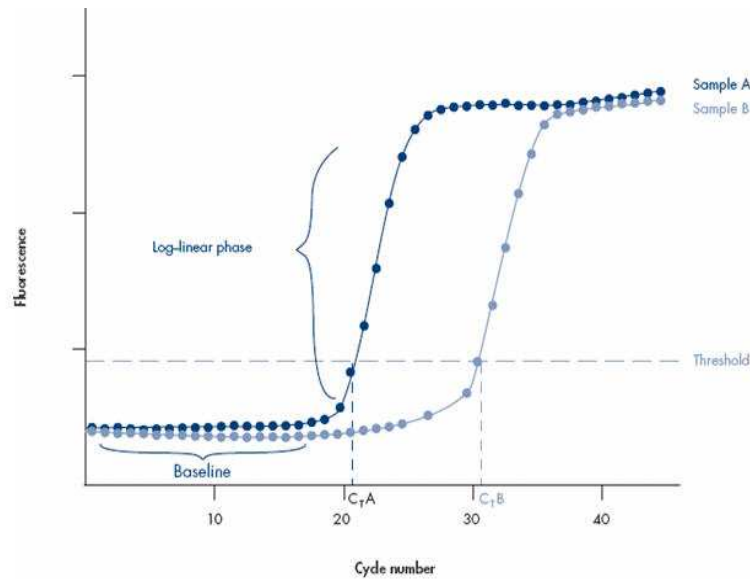
Obrázek č. 4 Kolonka pro izolaci/purifikaci DNA se silikátovou membránou; postup při promývání směsi DNA/pufr obsahující chaotropní soli. (Převzato z MinElute[®] Handbook, upraveno)

3.5.4 Kvantifikace DNA

Kvantifikace DNA v izolátu se provádí hned z několika důvodů - abychom mohli posoudit účinnost izolační metody, a abychom mohli správně provádět další kroky analýzy DNA. Především pro následující krok - PCR - je nutné znát množství DNA obsažené v získaném izolátu. Kvantifikaci je možné provádět mnoha způsoby - spektrofotometrií, s využitím interkalačních barviv, pomocí Real - time quantitative PCR (RT - qPCR) - například s využitím TaqMan sondy, případně barviva SYBR[®] Green.

- Spektrofotometrie - tato metoda je založena na rozdílné absorpci světla při rozdílné koncentraci roztoku (směsi). Při procházení paprsků o určité vlnové délce dochází v homogenním prostředí k pohlcování fotonů. Celý tento proces se provádí v přístroji - spektrofotometru, kde jsou údaje následně i vyhodnocovány. Spektrofotometrie je v současné době poměrně nespolehlivou metodou, proto se již pro stanovené množství DNA v izolátu téměř nepoužívá.
- Interkalační barviva - nejčastěji používaným barvivem se schopností se vmezeřit do struktury DNA byl v minulosti jednoznačně ethidium bromid (EtBr). Toto interkalační barvivo po osvětlení UV světlem emituje viditelné světlo růžovo-oranžové barvy. EtBr se často využíval při gelové elektroforeze ve spojení s 1,5 - 2% agarozovým gelem. Tento způsob má však tu nevýhodu, že EtBr zanechává na agarozovém gelu stopy, což znemožňuje detekci velmi malých množství DNA. I z tohoto důvodu není EtBr vhodný pro práci s aDNA. EtBr navíc patří mezi látky s teratogeními účinky, proto je jeho používání v současné době nahrazováno jinými interkalačními barvivy (Například SYBR[®]Green, viz níže).
- RT - qPCR - nejpoužívanější a pravděpodobně v dnešní době nejpřesnější metodou pro zjištění množství DNA ve vzorku je RT - qPCR. Při této metodě je snímána fluorescence přímo během amplifikace DNA (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993) - tedy v reálném čase.

Celý RT - qPCR proces je charakterizován křivkou (viz obrázek č. 5), kterou lze rozdělit na tři hlavní oblasti: oblast exponenciálního množení, lineární fázi a fázi plateau, ve které už prakticky nedochází k další amplifikaci vzorku (je to způsobeno vyčerpáním některé z reakčních komponent). Pro zhodnocení množství DNA ve vzorku je důležitá tzv. C_t hodnota, tedy místo, kdy došlo k detekci fluorescence nad určitou hranici (threshold). Čím větší je počátení množství DNA ve vzorku, tím dříve dojde k detekci fluorescence a následně nastane i fáze plateau. Rychlost amplifikace jednotlivých vzorků je srovnávána s rychlostí amplifikace standardu o známé koncentraci.



Obrázek č. 5 Křivky znázorňující závislost průběhu RT - qPCR na vstupním množství DNA. (Převzato z www.qiagen.com)

- TaqMan sonda - krátký oligonukleotid, který je na 5'konci označen fluorescenčním barvivem (reporter) a na 3'konci má navázaný tzv. zhášec fluorescence, tedy molekulu, která brání v emitování fluorescenčního záření do okolí. Tento oligonukleotid (sonda) se váže do oblasti mezi dvojicí primerů pro amplifikaci daného úseku. TaqMan sonda funguje na bázi 5' exonukleázové reakce, což znamená, že jakmile dojde polymeráza při elongaci řetězce na místo, kde je navázána sonda, „odštípne“ 5'konec s navázaným reportérem. Toto odštěpení reportéru umožní detekci fluorescenčního barviva navázaného na odštěpeném 5'konci (Holland et al., 1991).
- SYBR[®]Green - interkalační fluorescenční barvivo, které se stejně jako EtBr vmezeřuje do struktury DNA. SYBR[®]Green se nespecificky váže na dsDNA, čímž umožňuje její detekci při RT - qPCR (Morrison et al., 1998; Skeidsvoll and Ueland, 1995).

3.5.5 Amplifikace DNA pomocí PCR

Dnes již nepostradatelnou metodou využívanou při analýze DNA v nejrůznějších vědeckých odvětvích je její amplifikace. Pro amplifikaci DNA je využívána polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al., 1985), díky které je možné uměle „vyrobit“ i z velice malého množství DNA miliony kopií stejné sekvence. PCR je v podstatě *in vitro* replikace určitého úseku DNA pomocí DNA polymerázy. Daný úsek DNA, který se má namnožit, musí být na počátku a na konci ohraničen primery (úseky DNA dlouhé i několik desítek bází, důležité pro nasednutí polymerázy) a v reakci musí být mimojiné přítomny všechny čtyři typy nukleotidů pro prodlužování nově vznikajícího řetězce.

První, kdo objevil PCR byl v roce 1983 Kary Mullis (který za to o deset let později získal Nobelovu cenu za chemii). První publikace věnovaná PCR však vyšla až o dva roky později v časopise Science (Saiki et al., 1985).

Během průběhu PCR se střídá několik na sebe navazujících kroků - v prvním kroku je DNA denaturována, tj. řetězce dvoušroubovice DNA se zahřátím na určitou teplotu oddělí. Templáty - oddělené řetězce - poté slouží k výrobě nových DNA řetězců. Nové řetězce se tvoří působením enzymu - polymerázy, která kopíruje stávající řetězec. Při PCR se nejčastěji využívá Taq polymeráza - termostabilní enzym izolovaný z bakterie *Thermus aquaticus*. Taq polymeráza je tak ideální pro PCR, během které musí polymeráza odolávat rychlým změnám teplot a musí být funkční i při vyšších teplotách. Proces je mnohokrát opakován a teoreticky se během každého cyklu počet kopií zdvojnásobí. V konečné fázi je vytvořeno i několik milionů kopií (Isenberg and Moore, 1999).

PCR se v dnešní době provádí v přístroji - termocykleru, ve kterém jsou v kovové destičce vzorky střídavě zahřívány a ochlazovány i o několik desítek stupňů během několika sekund podle nastaveného protokolu. V době před zavedením termocyklerů se PCR prováděla pomocí zahřívání vzorku a následného ochlazování ve vodní lázni.

Jako optimální množství DNA pro amplifikaci pomocí PCR je používáno 200 - 1 000 pg (Edson et al., 2004). Při tomto množství probíhá PCR optimálně a nedochází k inhibici reakce způsobené použitím nadměrného množství DNA. Teoreticky je však možná amplifikace DNA i z jedné jediné buňky. Jedné buňce odpovídá množství

DNA okolo 6,6 pg (Anoruo et al., 2007), toto množství je ale již pro využití ve forenzní a archeogenetice příliš malé.

Při PCR se pro každou sadu reakcí používá amplifikační - negativní - kontrola, neboli blank, tedy všechny použité reagensie bez přidaného vzorku DNA (v praxi se využívá místo vzorku přidání destilované vody) pro vyloučení případné vnější kontaminace. Zároveň se používá i standardní komerčně vyráběná DNA o známé sekvenci a koncentraci - pozitivní kontrola - pro ověření správně proběhlé PCR.

PCR se provádí v několika cyklech opakujících se z následujících tří kroků. Počet těchto cyklů se obvykle pohybuje okolo 30. Při vyšším počtu cyklů se zvyšuje pravděpodobnost výskytu artefaktů a účinnost PCR klesá:

- Denaturace - DNA se po dobu průměrně 20 - 30 sekund zahřívá na teplotu 94 - 98°C. Při této teplotě se díky rozrušení vodíkových můstků rozvolňuje dvoušroubovice DNA. Oddělená vlákna jsou tak připravena pro nasednutí primerů.
- Nasednutí primerů - anealing - během tohoto kroku se teplota sníží na 50 - 65°C, což umožní nasednutí primerů na specifická místa DNA (daná sekvencí primerů). Jednotlivé primery mívají i odlišná teplotní optima pro své nasednutí na komplementární úsek DNA. Na primery se poté naváže polymeráza, která začne syntetizovat nové vlákno DNA.
- Elongační fáze - teplota používaná při tomto kroku závisí hlavně na použitém typu DNA polymerázy. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity okolo 72°C. Při tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno, které je komplementární k původní molekule DNA - polymeráza prodlužuje řetězec za 3' koncem primeru. Na konci elongační fáze by měla být každá námi požadovaná část DNA zreplikována.

Jak již bylo zmíněno výše, je pro PCR možné určitě rozpětí teplot, při kterých se jednotlivé kroky provádějí. Stejná variabilita platí i v rozsahu doby trvání jednotlivých kroků - při denuraci a elongaci závisí doba trvání na délce úseku, který je amplifikován.

3.5.5.1 Hot-start PCR

Běžná DNA polymeráza vykazuje určitou činnost i mimo své teplotní optimum (Taq polymeráza má teplotní optimum okolo 72°C). Díky tomu se mohou primery nnespecificky navázat na templátovou DNA a mohou se začít tvořit nnespecifické produkty různých délek a sekvencí. Při nízkých teplotách může také docházet k vzájemnému „slepení“ dvou primerů za vzniku tzv. dimerů. Tyto nnespecificky vzniklé sekvence způsobují problémy při samotné PCR - díky své malé délce dochází k jejich preferenční amplifikaci především na úkor delších sekvencí, které jsou ale předmětem našeho zájmu. Těmto nepříjemným jevům lze předcházet iniciací samotné PCR reakce až při zvýšené teplotě - hot-start PCR. Hot-start PCR může být provedena tak, že se až při dosažení určité teploty do reakce přidá polymeráza, případně jiná důležitá složka reakce. Při tomto postupu se však musí otevřít zkumavky se vzorky, které jsou blízko sebe a mnohonásobně se zvyšuje riziko kontaminace mezi vzorky. Proto byla vyvinuta modifikovaná Taq DNA polymeráza, která začíná syntetizovat nová vlákna DNA až po aktivaci určitou teplotou.

Modifikovaná Taq DNA polymeráza vyžaduje zahřátí na 95°C většinou po dobu 10 - 11 min pro svou aktivaci. Chemická modifikace, která brání funkčnosti polymerázy za pokojové teploty, je při pH okolo 7,0 odstraněna a enzym znovu získá svou plnou funkčnost. pH Tris pufru se během PCR reakce mění spolu s teplotou - při 25°C je pH 8,3, při 95°C se sníží na 6,9, což umožní aktivaci DNA polymerázy. Iniciační denaturace umožní plné denaturování přítomné dsDNA, včetně dimerů, které mohly nnespecificky vzniknout za pokojové teploty. Až po denaturaci se do celého procesu zapojí polymeráza, která již může amplifikovat námi požadovaný lokus.

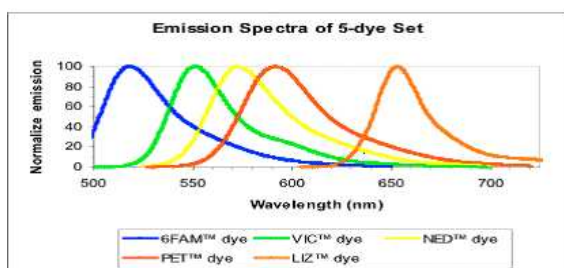
V současné době jsou již na trhu i polymerázy, které pro svou aktivaci potřebují jen 1 - 2 minuty. Tento krok je spíše pro urychlení celého procesu PCR, než pro zvýšení výnosů amplifikace.

3.5.5.2 Multiplex - PCR

V době počátků PCR bylo možné amplifikovat pouze jeden lokus v jedné PCR reakci. Dnes je již možná amplifikace dvou a více lokusů najednou - multiplex PCR.

Multiplex PCR reakce obsahuje shodné všechny základní komponenty jako monoplex PCR reakce. Rozdíl je pouze v počtu párů primerů, které reakce obsahuje. Důležitými podmínkami pro multiplex PCR jsou vzájemná kompatibilita různých párů primerů, tedy stejná nebo hodně podobná teplota annealingu (nasednutí na templát) a to, aby mezi sebou primery netvořily dimery. Při tvorbě multiplex PCR reakcí je potřeba klást velký důraz na vyváženost amplifikace různých lokusů, tzn. aby nedocházelo k preferenční amplifikaci jednoho lokusu na úkor lokusu jiného, obvykle s delším amplikonem. Vyvážená by měla být amplifikace také v případě heterozygotního výskytu alel.

Pro rozlišení jednotlivých STR lokusů při detekci se při multiplex PCR využívá fluorescenční značení primerů (značí se pouze forward primer). Je také nutné, aby mezi jednotlivými amplikony označenými jednou barvou byly dostatečné rozestupy a navzájem se nepřekrývaly. V dnešní době, kdy je možné detekovat až 5 fluorescenčních barev zároveň (značení například podle obrázku č. 6), je možné amplifikovat i 20 STR lokusů během jedné PCR reakce. Klíčovými kroky bývá optimalizace koncentrace jednotlivých primerů a hořčičných iontů. Všechny tyto problémy bývají již vyřešeny v komerčně dostupných multiplex PCR kitech - vyváženost píků v jednotlivých STR lokusech, koncentrace primerů i optimální teplota pro nasednutí primerů.



Obrázek č. 6 Možné značení primerů v případě použití 5 fluorescenčních barev. (Převzato z www.appliedbiosystems.com)

3.5.5.3 Nested PCR

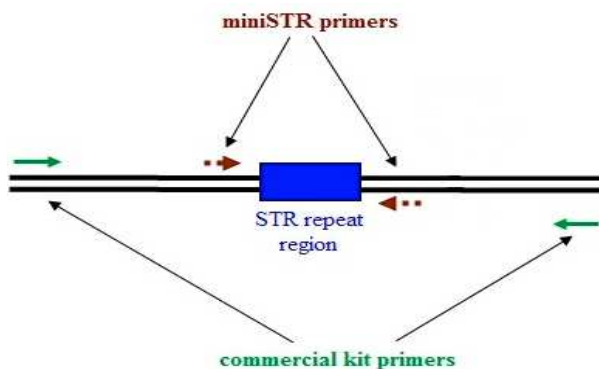
Jednou z mnoha možných variant vycházejících z klasické PCR je tzv. nested PCR, která by měla snížit riziko nechtěné nespecifické amplifikace úseku DNA za neočekávanou vazebnou sekvencí pro příslušný primer. Jako častý problém klasické PCR se vyskytuje navázání primerů na chybné sekvence a následná amplifikace jiných úseků DNA. Tato chybná sekvence může vzniknout například mutací v samotné sekvenci DNA - vznikne obdobná sekvence té, na kterou obvykle nasedá primer. Po nasednutí primeru na tuto

chybnou sekvenci tak dojde k amplifikaci jiného úseku DNA, než který jsme chtěli amplifikovat.

Nested PCR tedy obsahuje dvě sady primerů pro dvě po sobě následující PCR reakce. Nejprve se amplifikuje úsek, ve kterém je templátem genomická DNA. Při následné PCR (nested reakce) se jako templát použije produkt z předcházející reakce. Tímto způsobem je dosaženo vysoké specifičnosti amplifikace.

3.5.5.4 MiniSTR primer sety

Jak již bylo řečeno výše, obsahuje aDNA většinou fragmenty okolo 300 bp. Komerčně vyráběné multiplexové amplifikační kity obsahují většinou i primery pro STR, které mají delší amplikon (úsek, který se má amplifikovat). Z tohoto důvodu byly vytvořeny tzv. miniSTR. Primery jsou v těchto případech více posunuty k vlastní tandemové repetici - amplifikuje se tak kratší úsek DNA (viz obrázek č. 7). Tato skutečnost je výhodou při analýzách aDNA, kde je pravděpodobnost výskytu pouze kratších fragmentů DNA.



Obrázek č. 7 Posunutí primerů blíže vlastní tandemové repetici. (Převzato z www.cstl.nist.gov/strbase/miniSTR.htm, upraveno)

Během analýz DNA v polovině 90. let 20. století se ukázalo, že kratší úseky se u degradovaných vzorků amplifikují lépe než úseky dlouhé (Lygo et al., 1994; Whitaker et al., 1995). V průběhu dalších let bylo navrženo několik prvních miniSTR primerů - první publikace se zaměřovaly spíše na jednotlivé lokusy (Yoshida et al., 1997), postupem času se již začalo publikovat více lokusů najednou (Wiegand and Kleiber, 2001). V několika posledních letech, spolu s rozvojem technického pokroku v molekulární

genetice a automatizaci mnoha procesů, došlo k navržení miniSTR primerů pro mnoho dalších STR lokusů (Butler et al., 2003; Coble and Butler, 2005; Hill et al., 2008).

Primery pro miniSTR lokusy byly navrženy tak, aby docházelo k amplifikaci co možná nejkratšího úseku DNA - vlastní STR lokus a krátkého úseku přilehlé DNA. Je ale důležité si uvědomit, že některé amplifikované úseky byly zkráceny více než jiné - záleží především na nalezení vhodného místa v okolí tandemové repetice pro nasednutí primeru. Z tohoto vyplývá, že ne všechny běžně používané STR jsou pro tvorbu miniSTR vhodné.

Oproti nesporné výhodě při amplifikaci vysoce degradované DNA je jednou, ale v některých případech výraznou nevýhodou možnost amplifikace pouze několika miniSTR lokusů během jedné PCR reakce - vzhledem ke zkrácení amplifikované části se mnoho lokusů překrývá a není možné je amplifikovat společně. I v případě komerčně vyráběného kitu MiniFiler je možné amplifikovat pouze 8 miniSTR lokusů (Mulero et al., 2008). V případě malého množství DNA v izolátu je tak možné otestovat jen omezené množství lokusů.

Mini - primery nebyly samozřejmě navrženy jen pro analýzu nDNA, zahrnující STR vyskytující se na autozomech a chromozomu Y, ale i pro mtDNA. U mtDNA dochází pomocí mini - primer setů k amplifikaci úseků okolo 150 bp (Lee et al., 2008). Využity byly například při analýze mtDNA neandrtálce (Klings et al., 1997).

3.5.5.5 Artefakty vznikající během amplifikace DNA

Při vyhodnocování jednotlivých alel daného lokusu se můžeme setkat s mnoha nežádoucími artefakty, které mohou vzniknout během PCR reakce. Mohou to být stutter píky, +A/-A píky, chybějící, nebo naopak přebývající alely.

- Stutter píky - jde o amplikony kratší o jedno opakování nukleotidového motivu, vznikající předčasným ukončením činnosti polymerázy.
- +A a -A píky - Taq polymeráza přidává na 3' konci amplikonu adenzinový nukleotid bez souvislosti se sekvencí templátu. Tento adenzin má tendenci se od amplikonu nespecificky uvolňovat, proto může docházet k tomu, že některé píky

se vyskytují ve dvou formách, lišících se o 1 nukleotid, to se projeví vznikem píku se dvěma vrcholy.

- Drop-in - při amplifikaci dojde k „objevení“ jedné alely navíc v některém z lokusů, nejedná se však o kontaminaci cizorodou DNA (v případě vnější kontaminace by došlo k amplifikaci více alel v různých lokusech).
- Drop-out - dochází k němu v situaci, kdy se jedna alela amplifikuje přednostně na úkor alely druhé. O alelickém drop-outu bychom měli uvažovat v každém případě, kdy nám při analýze vyjde jedinec v daném lokusu jako homozygot. Toto platí zejména při analýze velmi malých vstupních množství DNA.

3.5.6 Postamplifikační purifikace

Postamplifikační purifikace je přípravným krokem pro následující analýzu DNA na sekvenátoru. Purifikace se provádí pro odstranění přebytečných chemických činidel použitých pro PCR od samotného vzorku DNA. Touto cestou je možné docílit i zvýšení citlivosti celé genetické analýzy.

3.5.7 Sekvenace

Pro získání přesné informace o sekvenci amplifikovaného úseku DNA se využívá jeho sekvenace. Pro sekvenování DNA je v dnešní době možné využít několik různých metod. Jednou z nich je tzv. Sangerova metoda, neboli dideoxyterminační metoda (Sanger et al., 1977), další může být pyrosekvenční technologie.

Cyklické sekvenování (Sangerovo) má obdobný princip jako klasická PCR, ale jsou používány odlišné typy reagensí. Kromě normálních - deoxyribonukleotidových bází, které prodlužují rostoucí řetězec DNA, se používá i set terminačních - dideoxyribonukleotidových bází, které rostoucí řetězec ukončují (Sanger et al., 1977).

Principem metody je použití ddNTP - například ddTTP (2',3' - dideoxythymidin trifosfát), které mají inhibiční vliv na DNA polymerázu. Tento inhibiční vliv je vyvolán navázáním ddT místo odpovídajícího dT do prodlužujícího se oligonukleotidového řetězce. Terminační báze neobsahují 3' - hydroxylovou skupinu, která je nutná pro navázání

dalšího nukleotidu (Atkinson et al., 1969). Zvolíme-li pro reakci vhodný poměr ddNTP ku dNTP (např. 1:100), získáme při sekvenaci směs fragmentů různé délky, lišících se mezi sebou vždy o jeden nukleotid.

Pyrosekvenční analýza (technologie) je další z možností sekvenace DNA. Je založená na principu sekvenace během syntézy a nevyužívá elektroforézu ani fluorescenční značky. Výhodou pyrosekvenční technologie je její jednoduchost a rychlost.

Pyrosekvenční analýza je prováděna v jednozkumavkovém formátu, ve kterém kaskáda enzymatických reakcí umožní inkorporaci nukleotidu a uvolněný pyrofosfát (PPi) způsobí vyzáření detekovatelného světla. Světlo se produkuje po enzymatické konverzi PPi, který je vyloučen po připojení nukleotidu do řetězce. Produkované světlo je okamžitě detekováno například pomocí CCD detektoru a množství uvolněného PPi a následně světelná intenzita je proporcí k počtu inkorporovaných nukleotidů (Andréasson, 2005).

3.5.8 Detekce fragmentů

Produkty amplifikace nebo sekvenace jsou rozdělovány podle své délky za použití gelové či kapilární elektroforézy.

3.5.8.1 Gelová elektroforéza

Při gelové elektroforéze putují fragmenty gelem pod vlivem elektrického napětí od katody (-) k anodě (+). Napětí musí být zvoleno tak, aby byl průběh elektroforézy dostatečně rychlý, ale nedocházelo k přehřívání gelu. Kratší produkty procházejí gelem rychleji, zatímco delší jsou bržděny omezenou velikostí pórů gelu (závisí na hustotě gelu). Všechny vzorky mají stejnou výchozí pozici a podle rychlosti jejich průchodu póry gelu je možné určit jejich délku. Nejvíce se využívá agarozový (různé koncentrace), nebo polyakrylamidový gel.

3.5.8.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je jednou z možností jak separovat amplifikované úseky DNA. Obrovskou výhodou oproti klasicky používané elektroforéze gelové je to, že je tento způsob již plně automatizovaný. Další neopomenutelná výhoda je, že při

analýze pomocí CE dochází pouze k minimální spotřebě vzorku a je tak možné elektroforézu kdykoliv zopakovat bez nutnosti přípravy vzorku nového. Pro získání výsledků není nutné žádné fotografování nebo složité vyhodnocování bandů, výsledky jsou ihned po skončení elektroforézy dostupné v podobě elektroforetogramu. Nevýhodou dříve byla velká časová náročnost analýzy většího počtu vzorků. Dnes je již tento problém podstatně redukován díky použití vícekapilárových elektroforéz.

Hlavní součástí CE je skleněná kapilára o vnitřním průměru 50 - 100 μm a délce mezi 25 a 75 cm, ve které je speciální viskozní polymer. Dále se CE skládá ze dvou elektrod, nádobek obsahujících pufr, laseru umístěného blízko konce kapiláry a detektoru fluorescence (např. CCD kamera). Do kapiláry je nasán polymer, kterým poté prochází amplifikované fragmenty DNA z analyzovaného vzorku. Před analýzou dalšího nového vzorku dojde vždy k výměně polymeru v kapiláře.

Metod jak označit produkty amplifikace je několik - použití interkalačního barviva, fluorescenčně značených dNTPs (deoxynukleotidů), nebo primerů značených na 5'konci. Nejvyužívanější je z těchto tří metod značení primerů, je to hlavně z toho důvodu, že dojde k označení pouze jednoho řetězce DNA, druhý komplementární amplifikovaný řetězec zůstane pro detektor neviditelný. Nejčastěji se pro značení využívají fluorofory, které emitují světlo v rozmezí 400 - 600 nm (tedy ve viditelné části spektra). Dnes je již možné použití několika barev pro značení jednotlivých primerů a tak vytvoření multiplexové PCR reakce. Každé z fluorescenčních barviv použitých v multiplexové reakci musí mít své emisní maximum při jiné vlnové délce, aby bylo možné při detekci barvy rozlišit - možné značení je ukázáno na obrázku č. 6.

Při detekci fluorescenčně značených fragmentů dochází k zachycení emitovaného světla. Při detekci dojde nejprve k tomu, že foton (z laseru) napomůže excitaci elektronu fluoroforu - fluorofor se dostane do excitovaného stavu. Výsledkem celé reakce je emise světla o nižší energii (delší vlnové délce). Emitovaná světelná energie je přeměněna na elektrický signál, který je proporcí vůči množství emitovaného světla přítomnými fluorescenčně značenými molekulami (Albin et al., 1991). Detektor fluorescence (například CCD kamera) poté měří množství světla uvolněného z fluoroforu. Intenzita světla může být vyjádřena jako relativní fluorescenční jednotky (RFUs, relative fluorescence units).

Před vlastní analýzou pomocí CE se do vzorku vždy přidá vnitřní standard. Každý vnitřní standard má pevně danou délku jednotlivých fragmentů a je označen odlišným fluorescenčním barvivem. K separaci jednotlivých fragmentů dochází stejně jako v případě gelové elektroforézy pomocí rozdílné mobility různě dlouhých fragmentů - kratší fragmenty putují polymerem rychleji.

Pro vyhodnocení elektroforetogramů je důležité nejen srovnání pozice jednotlivých páků vůči vnitřnímu standardu, ale i porovnání s alelickým žebříkem. Alelický žebřík je uměle připravená směs v populaci se nejčastěji vyskytujících alel. V případě použití komerčních kitů je alelický žebřík dodáván výrobcem spolu s příslušným kitem. Alelický žebřík by měl projít analýzou vždy se vzorky (Smith, N. R., 1995).

3.6 Dekontaminační opatření při analýze aDNA

Analýza aDNA používá několik vysoce citlivých technologií. Díky tomu může dojít k úspěšné analýze i při obdržení jen několika kopií aDNA ze vzorku - pokud je vzorek extrémně zničený. Přítomnost vnější kontaminující DNA může být proto naprosto zničující pro celý proces analýzy aDNA. I jakékoliv minimální množství zanesené novodobé DNA, lidské či mikrobiální, může znamenat chybnou interpretaci pozdějších výsledků analýzy a sekvenace vzorku. Z těchto důvodů je potřeba provádět taková opatření, aby byla pravděpodobnost kontaminace co možná nejvíce minimalizována.

Ve studiích, které byly prováděny především v polovině osmdesátých a na počátku devadesátých let, nebyla ještě rutinně dodržována nutná opatření, která by vedla k prevenci před kontaminací současnou DNA. Možnost kontaminace je nutné zvážit zvláště v případech, kdy je aDNA izolována z ostatků, které jsou starší, než teoretická doba po kterou může DNA „přežít“ (tzn. starší než 0,1 - 1 Myr) (Willerslev and Cooper, 2005). V pozdějších letech se vytvořilo několik pravidel, která by se měla rutinně dodržovat při práci se vzorky obsahujícími aDNA.

Během analýzy aDNA se provádí mnoho kroků, které by měly zajistit ochranu před případnou kontaminací cizorodou DNA.

- Jedním z kroků pro zajištění autenticity výsledků je analýza DNA všech pracovníků v laboratoři. Tento krok se provádí pro případ určení zdroje případné vzniklé kontaminace.
- Samozřejmostí je použití ochranných prostředků, jako jsou rukavice, rouška, laboratorní plášť a aerosol - resistantní pipetové špičky (Handt et al., 1996).
- Pracovní prostředí by mělo být pravidelně dekontaminováno a doporučeno je i použití UV pro dekontaminaci.
- Pre - a post - amplifikační místa musí být fyzicky oddělena, aby nemohlo docházet k přenesení DNA již amplifikované na několik milionů kopií do neamplifikovaných vzorků. I stopové množství již amplifikované DNA přenesené do nově izolovaného vzorku aDNA by bylo pro celou analýzu naprosto zničující.
- Během analýzy se vždy pracuje pouze s jednou položkou. Zjišťovaný vzorek je vždy zkoumán mimo známý referenční vzorek, aby se zabránilo přenesení DNA (tzv. cross - kontaminaci) a znehodnocení získaných výsledků.
- Instrumenty, jako jsou například pipety se dekontaminují shodně jako pracovní prostředí pomocí isopropanolu, 10% bělicí lázně nebo UV záření (Handt, et al., 1996), v ideálním případě kombinací uvedených možností.

Tyto dekontaminační kroky mají největší význam v době před extrakcí a amplifikací DNA.

- Při extrakci i amplifikaci vzorku se využívá tzv. blank, neboli negativní kontrola - směs všech použitých reagentů bez přítomnosti DNA ze vzorku. Negativní kontrola projde všemi kroky jako analyzovaný vzorek. Pokud je ve výsledcích v negativní kontrole přítomna jakákoliv sekvence, je zřejmé, že došlo k zanesení cizorodé DNA do vzorků, a že je analýzu třeba opakovat.

Pozitivní kontroly obsahující známou DNA se využívají během amplifikačního a sekvenčního kroku pro monitorování správného průběhu těchto kroků. Není možné pokračovat v analýze aDNA, pokud pozitivní kontrola selže během amplifikace, při sekvenaci nebo v obou případech (Isenberg and Moore, 1999).

4 Materiál a metody

4.1 Spotřební materiál

Název (výrobce):	V textu:
Dispolab (Copan Italia)	tampon Dispolab
Microcon® YM-30 (Millipore)	Microcon 30
Microcon® YM-100 (Millipore)	Microcon 100
Zkumavka 1,5 ml (Eppendorf AG)	1,5 mml zkumavka
Zkumavka 2ml (Eppendorf AG)	2 ml zkumavka
MicroAmp® reaction tube with cap 0,2ml (Applied Biosystems)	zkumavka 0,2 ml
MicroAmp® optical 96well reaction plate with barcode (Appl. Bio.)	96 jamková destička
Tube for buffer AL (15ml) (Qiagen)	15 ml falcon zkumavka
50 ml zkumavka (Equimed®)	50 ml falcon zkumavka
MinElute™ spin columns (Qiagen)	izolační kolonka
Amicon®Ultra (Millipore)	AmiconUltra

4.2 Použité chemikálie

Water, Mol Bio grade, DNase - , Rnase - and proteinase free (5PRIME)	dH ₂ O
DNA, RNA Nucleasa - free Water (Eppendorf AG)	dH ₂ O
Proteináza K (Sigma-Aldrich Co.)	PK
Sodium dodecyl sulfate ultra pure (ICN Biomedicals, Inc.)	SDS
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate 99+% (Sigma-Aldrich Co.)	EDTA
Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories)	Chelex 100

Poly(vinyl-polypyrrolidone) (Sigma-Aldrich Co)	Poly(vinyl-polypyrrolidone)
MinElute™ PCR Purification Kit (Qiagen)	izolační kit MinElute
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Bio.)	Quantifiler Human
Quantifiler™ Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)	Quantifiler Duo
AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Bio.)	MiniFiler
AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)	YFiler
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems)	Gold DNA polymeráza
AmpFISTR® Control DNA 007 (Applied Biosystems)	standardní DNA 007
PowerPlex® Y System (Promega Corporation)	PowerPlex Y
Prototype PowerPlex® EP01-SE System (Promega Corporation)	PowerPlex EP01-SE
Prototype PowerPlex® EP02-SE System (Promega Corporation)	PowerPlex EP02-SE
PowerPlex® ESX 17 System (Promega Corporation)	PowerPlex ESX-17
PowerPlex® ESI 17 System (Promega Corporation)	PowerPlex ESI-17
Gold ST*R 10X Buffer (Promega Corporation)	pufr Gold Star
iTaq DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories)	iTaq polymeráza
9947A DNA (Promega Corporation)	standardní DNA 9947A
9948 DNA (Promega Corporation)	standardní DNA 9948
Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems)	formamid
Internal lane standard 600 (Promega Corporation)	ILS 600
CC5 internal lane standard 500 (Promega Corporation)	Orange ILS 500
GeneScan™ 500 LIZ™ size standard (Applied Biosystems)	LIZ 500
BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems)	kit BigDye XTerminator

Incidur [®] Spray (Ecolab)	Incidur Spray
DNA-Remover TM (Minerva Biolabs)	DNA Remover

4.3 Použité technické vybavení

Medezine 4000 (Medezine)	řezačka kostí
Dremel [®] model 395, Type 5, Code 32	bruska
Dremel [®] 408	brusný kotouč
Holten LaminAir model 1.5 (Holten)	laminární box
Holten LaminAir HBB2448 (Holten)	laminární box
Comfort Securitas	laminární box
Spex SamplePrep 6770 Freezer/Mill [®]	mlýnek
Thermomixer Comfort 1,5 ml (Eppendorf AG)	vyhřívaná třepačka
HIM20 (Grant Boekel)	rotační třepačka
Concentrator 5301 (Eppendorf AG)	vakuová odparka
Centrifuge 5415D (Eppendorf AG)	centrifuga
Centrifuge 5417R (Eppendorf AG)	centrifuga
Centrifuge 5810R (Eppendorf AG)	velká centrifuga
IKA [®] Vortex Genius 3 (Vitrrium [®])	vortex
ABI PRISM [®] 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Bio.)	kvantifikátor
LightCycler [®] 480 II (Roche)	LightCycler
Veriti TM 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)	thermocycler Veriti
GeneAmp [®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)	thermocycler GA9700
ABI PRISM [®] 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)	sekvenátor
36 cm kapilára s polymerem POP-4 TM (Applied Biosystems)	kapilára sekvenátoru

4.4 Materiál

4.4.1 Zkušební vzorky

Nejprve jsme testovali několik vzorků, které nám sloužily pro ověření výběru izolační metody. Tyto vzorky byly vybrány na základě již v minulosti provedené analýzy DNA pracovníky KÚP (Kriminalistický ústav Praha). Jednalo se celkem o čtyři vzorky patřící třem jedincům, od jednoho jedince jsme měli k dispozici kosterní i zubní vzorek. Tyto analýzy byly provedeny jinou izolační metodou (viz příloha 9.1). U jednoho námi vybraného vzorku byl pracovníky KUP dříve získán částečný STR profil, který byl následně srovnáván s našimi výsledky. Ve zbylých případech nebyl původní metodou ani po několika opakováních získán žádný STR profil. Tyto vzorky sloužily pro ověření účinnosti námi vybraných izolačních metod ve srovnání s metodou dříve používanou. Vzhledem k citlivým informacím souvisejícím s vyšetřováním jsou vzorky ve výsledcích označeny jako ZK01, ZK02 a ZK03.

Všechny tyto vzorky byly již očištěny a nadrceny před započítím této práce. Proto u nich neplatí postup uvedený v kapitolách 4.5.1 a 4.5.2. S těmito vzorky bylo při přípravě zacházeno standardně podle protokolů pro kosterní a zubní vzorky určené pro forenzní analýzu DNA - používaly se ochranné pomůcky (rukavice, roušky, ochranný oděv), čištění a řezání vzorků probíhalo v laminárním boxu, pro práci se používal pouze sterilní materiál.

4.4.2 Novorozenec z hradu Rokštejn

Analyzovali jsme vzorek, který jsme odebrali z femuru novorozence. Tento novorozenec byl nalezen zazděný v základech hradu Rokštejn. Díky této skutečnosti je známa i přibližná doba, kdy k pohřbení novorozence došlo - okolo roku 1280 n.l.

Femur byl na pohled v dobrém stavu, povrch byl jednolitý, nedocházelo k drobení kosti. Pohlaví vzhledem ke stáří jedince nebylo možné odhadnout a bylo předmětem námi prováděné genetické analýzy. Pro naši práci jsme po očištění (viz kapitola 4.5.1) nejprve kost rozřezali na malé kousky cca 0,5 x 0,5 cm a rozdělili na dvě části - část s větším podílem kompaktní tkáně a druhou s větším podílem tkáně spongiozní. Tyto dvě části jsme následně analyzovali každou zvlášť pro vzájemné porovnání výsledků.

4.4.3 30 jedinců z různých nalezišť v Praze a okolí

Převážně zubní vzorky 30 jedinců jsme získali od Mgr. Pavla Kubálka ze společnosti Labrys s.r.o. Jedná se o vzorky pocházející z různých pohřebišť a tedy i různé datace. Vzhledem k unikátním podmínkám na každém pohřebišti nebylo možné dopředu odhadnout, zda bude analýza úspěšná u mladších či starších vzorků.

Všechny vzorky byly odebírány přímo při archeologickém výzkumu na místě pohřebiště a dodány v samostatných uzavíratelných sáčkích. Další manipulace se vzorky - čištění, drcení - byla již prováděna výhradně v laboratořích KUP. Z pracovníků společnosti Labrys s.r.o. přišel do styku se vzorky pouze Mgr. Pavel Kubálek, od kterého byl odebrán vzorek DNA ve formě bukalního stěru na tamponu Dispolab. Tento vzorek byl analyzován a vyhodnocen pro srovnání s výsledky analýzy vzorků aDNA a pro vyloučení případné kontaminace při manipulaci se vzorky na místě nálezů.

U vzorků jsme nejprve obdrželi pouze číselné označení každého jedince, abychom nemohli být při analýzách a vyvozování závěrů ovlivněni. Údaje o přibližném stáří a lokalitě pohřebiště, věku jedinců a morfologicky odhadnutém pohlaví jsme obdrželi až ve chvíli, kdy byly analýzy hotové a bylo známo pohlaví geneticky určené. Všechny tyto dodatečně získané údaje jsou uvedeny v tabulce č. 1. Jedinci jsou uvedeni pod číselným označením 1 – 30. Jelikož jsme měli k dispozici převážně zubní vzorky, jsou výsledky analýzy aDNA těchto jedinců v kapitolách 5.3.2, 5.4, 9.3 a 9.4 zaznamenány pod označením zub + číslo příslušného jedince.

Pohlaví a přibližný věk byl u každého jedince odhadnut pracovníky společnosti Labrys s.r.o. V případě úspěšné analýzy DNA byl tento odhad srovnáván s geneticky určeným pohlavím daného jedince. Jen v případě vzorků č. 27 - 30 nebylo vzhledem k dětskému věku jedinců pohlaví odhadnuto a bylo předmětem námi prováděné genetické analýzy.

vz. č.	Lokalita	Hrob č.		Sex	Věk	datování	vzorek
1	P-Jinonice, Zámeček 2005	1		F	20-30	?	zub
2	Praha 6 - Řepy (sonda III)	18		F?	14	asi 17.st.	zub
3	Praha 6 - Řepy (sonda III)	27		?	7	asi 17.st.	zub
4	Praha 6 - Řepy (sonda III)	14		F	>60	asi 17.st.	zub
5	Praha 6 - Řepy (sonda III)	45		M	40-60	asi 17.st.	zub
6	Praha 6 - Řepy (sonda III)	44		M	40-60	asi 17.st.	zub
7	Praha 6 - Řepy (sonda III)	52		F	20-30	asi 17.st.	zub
8	Praha 6 - Řepy (sonda III)	51		M	20-30	asi 17.st.	zub
9	Líbeznice 2009	383/H4	A	M	30-40	4000 BP	zub
10	Líbeznice 2009	383/H4	B	?	30-40	4000 BP	zub, kost
11	Líbeznice 2009	615/H5		M	40-50	?(14C)	zub
12	P-Břevnov 2009	1		M	40-50	12.st.	zub
13	P-Břevnov 2009	2		M	40-51	12.st.	zub
14	P-Břevnov 2009	2	P	M	?	12.st.	zub
15	P-Břevnov 2009	3		M	>60	12.st.	zub
16	Zbuzany 2008	374	B	M	30-40	10-12.st.	zub
17	Zbuzany 2008	386		F	>60	10-12.st.	zub, kost
18	Zbuzany 2008	388	A	M	50-60	10-12.st.	zub
19	Zbuzany 2008	374		M	30-40	10-12.st.	zub
20	Zbuzany 2008	376		M	>60	10-12.st.	zub
21	Zbuzany 2008	385		M?	30-40	10-12.st.	zub
22	Zbuzany 2008	379		?	11	10-12.st.	zub
23	Zbuzany 2008	391		F	40-50	10-12.st.	zub
24	Zbuzany 2008	381		F	30-40	10-12.st.	zub
25	Zbuzany 2008	383		F	50-60	10-12.st.	zub
26	Praha 6 - Řepy (E 1)	1		M	50-60	asi 17.st.	zub
27	P-Řeporyje, Karban 2006	25		?	6	???	zub
28	P-Řeporyje, Karban 2006	49	A	?	11	???	zub
29	P-Řeporyje, Karban 2006	49	B	?	8	???	zub
30	P-Řeporyje, Karban 2006	49	C	?	7	???	zub

Tabulka č. 1 Údaje o jedincích z pohřebišť v Praze a okolí poskytnuté společností Labrys.

4.4.4 4 jedinci z různých nalezišť na Moravě

Pro analýzu jsme vybrali dále čtyři jedince pocházející z různých nalezišť na Moravě - Blučina, Velim, Staré Město a Slatinice. Tyto jedinci byli vzhledem k různému původu i odlišné datace. Makroskopicky byly všechny kosti v dobrém stavu, povrch byl jedolný, nedocházelo k olupování ani odrolování částí kosti.

Pro analýzu jsme vždy měli k dispozici kost stehenní (femur). Kosti byly očištěny podle popsaného postupu v kapitole 4.5.1 a z každé byl odebrán vzorek o velikosti přibližně 0,5 x 1 cm, který byl následně rozdrcen a podroben všem krokům další analýzy.

Označení	Lokalita	Datace	Stáří (roky)
Kost č.1	Blučina	doba laténská 100 - 200 př.n.l.	2100 - 2200
Kost č. 2	Staré Město	800 - 900 n.l.	1100 - 1200
Kost č.3	Velim	knovízská kultura 700 - 1300 př.n.l.	2700 - 3300
Kost č. 4	Slatinice	zvoncové poháry 2000 - 2200 př.n.l.	4000 - 4200

Tabulka č.2 Označení vzorků jedinců pocházejících z Moravy, datace kosterních ostatků.

4.5 Metody

4.5.1 Příprava vzorku

4.5.1.1 Zubní vzorek

Po obdržení jsme zuby uložili v uzavíratelných sáčcích do chladničky a před dalším zpracováním jsme je skladovali při teplotě 4°C. Při čištění zubních vzorků jsme nejprve skalpelem oškrábali hlínu z povrchu zubu. Zuby jsme čistili pomocí rotační brusky Dremel a brusných kotoučků. Nejprve jsme v laminárním boxu Holten obrousili zbytky hlíny a následně cca 0,5 mm vrstvu skloviny a dentinu z povrchu. Poté jsme vyměnili brusný kotouček za nový a obrousili ještě cca 0,5 - 1 mm zubního povrchu. Ve všech případech jsme odstranili žluté, případně nahnědlé zabarvení zubu. Očištěný zub jsme uložili do 15 ml falcon zkumavky a před dalším zpracováním ponechali v chladničce při teplotě 4°C.

4.5.1.2 Kosterní vzorek

V případě čištění kosterního vzorku jsme nejprve oškrábali vrchní zabarvenou vrstvu - periost - pomocí skalpelu. Následně jsme z kosti obrousili cca 0,5 mm vrstvu. Po výměně brusného kotoučku za nový jsme ještě obrousili další 0,5 - 1 mm kostního povrchu. Z takto očištěné kosti jsme vyřízli, z jejího středu (aby nedošlo k poškození morfologie kosti), kousek o šířce cca 0,5 - 1 cm. Na tomto vyříznutém kousku kosti jsme ještě obrousili vnitřní část kosti, která byla přivrácena k dřevěné dutině. Takto připravenou kost jsme dali do 50 ml falcon zkumavky a uchovávali při teplotě 4°C v chladničce. Řez kosti jsme vždy prováděli speciální ortopedickou pilou Medezine 4000. Při řezání touto pilou dochází pouze ke kmitavému pohybu kotouče, nikoliv k jeho otáčení.

Během práce se vzorky byly vždy používány ochranné pomůcky - rukavice, ochranný oděv, navlékací rukávy, ochranná pokrývka hlavy, rouška. Veškerá manipulace se vzorky probíhala v prostorách laminárního boxu. Mezi prací s jednotlivými vzorky došlo k vyklizení prostoru laminárního boxu, setření zbylého prachu z předchozího vzorku a desinfikování pomocí přípravku Incidur Spray. Pro manipulaci s každým vzorkem byl použit minimálně jeden pár nových rukavic, aby nedocházelo k přenosu kostního/zubního prachu mezi jednotlivými vzorky.

4.5.2 Drcení vzorku

Po očištění vzorků jsme přistoupili k jejich rozdrčení. Drcení probíhalo při teplotě tekutého dusíku (-196 °C) v přístroji Spex SamplePrep 6770 Freezer/Mill[®]. Pro počáteční zchlazení přístroje jsme použili 4 - 5 l tekutého dusíku. Vzorek jsme umístili do speciální polykarbonátové „trubičky“ uzavíratelné pomocí ocelových uzávěrů. Uvnitř polykarbonátové trubičky byl spolu se vzorkem i ocelový tlouček, který po zmrazení vzorku pomocí tekutého dusíku svým pohybem ve střídavém magnetickém poli vzorek rozdrtil. Pro drcení kostního/zubního vzorku jsme použili protokol popsáný v tabulce č. 3. Po vyjmutí z přístroje byla trubička s rozdrčeným vzorkem ponechána při pokojové teplotě až do úplného rozmrazení. Rozdrčený vzorek byl poté přemístěn do 15 ml falcon zkumavky a opět uchováván při teplotě 4°C v chladničce.

počet cyklů	3
Počáteční zchlazení	10 min
Doba drcení	2 min
Chlazení	2 min
Rychlost drcení	10 CPS

Tabulka č. 3 Protokol použitý pro drcení kostních/zubních vzorků. CPS = cykly za sekundu (10 CPS = 20 pohybů tloučku za sekundu)

Mezi drcením jednotlivých vzorků byly polykarbonátové trubičky i ocelové součásti - tlouček a uzávěry důkladně očištěny a desinfikovány. Nejprve došlo k omytí tekoucí horkou vodou, aby se odstranil zbylý prach z drčeného vzorku. Poté byly součásti vydesinfikovány pomocí Incidur Spray. Následovalo použití DNA Removeru pro odstranění případné zbylé DNA a omytí dH₂O. Usušení probíhalo při pokojové teplotě v laminárním boxu. Po uschnutí byl ještě proveden stěr na tampon Dispolab pro kontrolu případné kontaminace způsobené reziduem prášku z předcházejícího vzorku.

Manipulace se vzorky - přendávání do a z polykarbonátové trubičky - probíhala výhradně v laminárním boxu za použití ochranných pomůcek - rukavic, oděvu, roušky a pokrývky hlavy. Pro manipulaci s každým vzorkem byly použity nové rukavice.

4.5.3 Izolace DNA

4.5.3.1 Adsorpce na silikát

Pro extrakci DNA pomocí adsorpce na silikát jsme použili protokol publikovaný Yangem et al., (1998). Tento protokol jsme mírně modifikovali.

- Extrakční pufr

Pro extrakci DNA z kostní i zubní tkáně jsme používali jednotný extrakční pufr složený ze směsi 0,5 M EDTA, 0,5 % SDS a 50 μ l proteinázy K (20 mg/ μ l). Extrakci jsme prováděli v 2 ml zkumavkách s kulatým dnem. K 70 - 100 mg kostního/zubního prášku jsme přidali 1 ml výše popsané směsi a inkubovali jsme při teplotě 56°C po dobu 22 - 26 hod. Po této době jsme vzorek centrifugovali rychlostí 2 000 rpm po dobu 5 min.

- MinElute™ PCR Purification Kit

Pro izolaci DNA a přečištění od případných inhibitorů jsme zvolili kit MinElute. Tento kit je primárně určen výrobcem především na post - amplifikační přečištění vzorku. Lze jej však také s vysokou výtěžností použít pro izolaci DNA (Anderung et al., 2008; Lee et al., 2010; Yang et al., 1998).

Součásti kitu:

- Pufr PB (je možné použít i pufr PBI)
- Pufr PE
- Pufr EB
- Kolonky MinElute se silikátovou membránou

Nejprve jsme přenesli do 15 ml falcon zkumavky 800 - 900 μ l supernatantu (podle množství nad usazeným kostním/zubním prachem). K tomuto supernatantu jsme přidali pětinasobné množství pufru PB obsahujícího guanidin hydrochlorid a isopropanol. Tímto postupem jsme získali celkem 4,8 - 5,4 ml směsi vzorku a PB pufru. Tuto směs jsme důkladně vortexovali po dobu cca 30 sec. Do izolační kolonky MinElute se silikátovou membránou jsme poté přenesli 500 μ l této směsi. Centrifugovali jsme při rychlosti 13 000 rpm po dobu 1 min. Odstranili jsme profiltrovanou tekutinu ze spodní části kolonky

a na kolonku opět přenesli 500 µl směsi. Takto jsme postupovali až do úplného spotřebování směsi. Následovalo promytí kolonky pomocí 700 µl pufru PE obsahujícího 96% ethanol, centrifugovali jsme opět 13 000 rpm po dobu 1 min. Tato centrifugace 13 000 rpm/1 min byla opakována pro dokonalé odstranění PE pufru z kolonky. Následně jsme vrchní část kolonky přemístili do nové, sterilní, 1,5 ml zkumavky a na membránu kolonky přenesli 50 µl pufru EB. Po 1 min při pokojové teplotě jsme centrifugovali rychlostí 13 000 rpm po dobu 1 min. Postup jsme zopakovali a celkově získali přibližně 95 µl čistého izolátu.

Koncentrace pomocí AmiconUltra

Jelikož se při opakovaném přemísťování směsi vzorek/PB pufr zvyšuje riziko kontaminace, zkoncentrovali jsme tuto směs za použití koncentrátoru AmiconUltra a promytí přes kolonku provedli pouze jedenkrát.

Nejprve jsme celých 4,8 - 5,4 ml směsi přemístili do koncentrátoru AmiconUltra. Centrifugovali jsme po dobu 4 - 8 min při rychlosti 4000 g do doby než v koncentrátoru zbylo cca 500 µl tekutiny (u každého koncentrátoru AmiconUltra to trvalo jinak dlouhou dobu). Tekutinu jsme následně přemístili do izolační kolonky MinElute se silikátovou membránou a centrifugovali při rychlosti 13 000 rpm po dobu 1 min. Odstranili jsme tekutinu ze spodní části kolonky a do kolonky přidali 700 µl pufru PE. Následující postup byl shodný s výše popsaným.

4.5.3.2 Chelex 100

Při porovnávání účinnosti metod jsme použili i izolaci pomocí suspenze pryskyřice Chelex 100 (Walsh et al., 1991). Tato metoda izolace se ve forenzní laboratoři používá především pro izolaci DNA ze vzorků s vysokým obsahem DNA - například stopy krve, nebo bukální stěry. Publikováno však bylo i úspěšné použití na tvrdé tkáně - kosti a zuby. Použili jsme dva protokoly, které byly popsány v literatuře s pozitivním výsledkem při izolaci.

Postup podle Newmana (Newman et al.,2002):

Pro izolaci bylo použito 0,3 g kostního/zubního prášku. K tomuto prášku bylo přidáno 600 µl 5% suspenze Chelex 100. Po důkladném zvortexování byl vzorek inkubován přes noc při teplotě 65°C. Následovala denaturace při 95°C po dobu 8 min. Vzorek byl zcentrifugován. DNA se měla nacházet rozptýlená v supernatantu.

Postup podle Woodwarda (Woodward et al. 1994):

0,3 g vzorku bylo inkubováno spolu s 500 µl 5% suspenze Chelex 100 při 56°C po dobu 15 min, po zvortexování po dobu 1 min následovala denaturace při 95°C po dobu 10 min. Vzorek se centrifugoval při 12 000 g po dobu 3 min.

Odstranění huminových kyselin

Při použití izolace pomocí Chelex 100 je možné současné odstranění huminových kyselin, které mohou způsobovat inhibici následné PCR. Pro odstranění huminových kyselin jsme k 500/600 µl 5% suspenze Chelex 100 (podle použitého protokolu) přidali 50 mg PVPP (Sutlovic et al., 2007) a dále postupovali podle výše popsaných protokolů.

Srovnávací vzorky - bukální stěry:

Nejprve jsme nechali tampon Dispolab s bukálním stěrem odměřet v 1 ml dH₂O po dobu 30 min. Každých 5 minut jsme zkumavku obsahující tampon vortexovali. Poté jsme tampon vyjmuli a zkumavku s lyzátem buněk centrifugovali při rychlosti 13 000 rpm po dobu 3 min. Odsáli jsme supernatant a do zkumavky přidali 200 µl 5 % suspenze Chelex 100 a 4 µl proteinázy K. Inkubovali jsme na rotační třepačce po dobu 30 min při teplotě 56°C a následně jsme DNA denaturovali po dobu 8 min při teplotě 100°C. Nakonec jsme centrifugovali při rychlosti 13 000 rpm po dobu 1 min. Izolovaná DNA se nacházela rozptýlena v supernatantu.

4.5.4 Kvantifikace

Po izolaci DNA jsme její kvantifikaci prováděli kitem Quantifiler Human nebo Quantifiler Duo. V případě prvního kitu dochází ke kvantifikaci celkové DNA pomocí sekvence na chromozomu 5, u druhého kitu se kvantifikuje celková lidská DNA pomocí sekvence na chromozomu 14 a současně její případná mužská složka (viz tabulka č. 4). Oba tyto kity jsou určeny ke kvantifikaci s využitím RT - qPCR a jsou založeny na principu TaqMan sondy. Pro každou reakci jsme použili 10,5 μ l Primer Mix, 12,5 μ l PCR Reaction Mix a 2 μ l vzorku. Každý vzorek jsme připravovali v dubletu. Vzorky jsme připravili v amplifikační destičce s 96 jamkami, překryli speciální fólií a analyzovali pomocí kvantifikátoru nebo LightCycleru.

Kit	amplifikovaná sekvence	délka amplifikované sekvence
Quantifiler Human	5p15.33	62 bp
Quantifiler Duo	14q11.2	140 bp
	Yp11.3	130 bp

Tabulka č. 4 Sekvence amplifikované kity Quantifiler Human a Quantifiler Duo.

4.5.4.1 Koncentrace vzorku

V případě, že vyšla u izolátu nízká kvantifikace, přistoupili jsme k zkoncentrování tohoto izolátu do nižšího objemu pomocí Microcon 30 nebo Microcon 100. Nejprve jsme vzorek centrifugovali po dobu 10 min při rychlosti 3000 rpm. Následně jsme na membránu nanesli 20 - 30 μ l dH₂O, nechali jsme Microcon 30 (100) 5 - 10 min stát při pokojové teplotě a po otočení košíčku microconu membránou dolů do nové, sterilní 1,5 ml zkumavky jsme centrifugovali po dobu 1 min při rychlosti 3000 rpm.

4.5.5 Amplifikace DNA

Amplifikaci jsme prováděli v termocykleru Verity a termocykleru GA 9700 se zlatým nebo hliníkovým bločkem uvnitř termocykleru. K amplifikaci jsme používali 0,2 ml mikrozkušavky. Příprava vzorku pro PCR byla prováděna v místnosti fyzicky oddělené od místa přípravy a izolace vzorků a od post - PCR zóny.

4.5.5.1 MiniFiler

DNA jsme nejprve amplifikovali pomocí komerčně vyráběného kitu MiniFiler. Tento kit umožňuje amplifikaci osmi miniSTR lokusů - CSF1PO, FGA, D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51 + detekci pohlaví jedince pomocí genu pro amelogenin.

Reakci jsme vždy prováděli v objemu 25 μ l a pro amplifikaci jednoho vzorku pomocí kitu MiniFiler jsme vždy použili 10 μ l MiniFiler Master Mix (obsahujícího i DNA Taq polymerázu), 5 μ l MiniFiler Primer Set. Zbylých 10 μ l byl v reakci izolát obsahující DNA, který byl případně doplněný dH₂O - podle výsledků kvantifikace. V případě, kdy nebyla provedena kvantifikace jsme použili 10 μ l izolátu DNA. Pro pozitivní kontrolu jsme místo vzorku použili 5 μ l DNA standardní DNA 007 a 5 μ l dH₂O, v případě negativní kontroly jsme použili jen 10 μ l dH₂O.

Na termocykleru jsme použili teplotní profil doporučený výrobcem kitu:

- úvodní denaturace: 95 °C po dobu 11 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 20 s při 94 °C,
 - nasedání primerů (annealing): 2 min při 59 °C,
 - extenze řetězce: 1 min při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 45 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

4.5.5.2 PowerPlex Y

V případě získání mužské DNA - zjištěno pomocí genu pro amelogenin v kitu MiniFiler, případně kvantifikací kitem Quantifiler Duo - jsme amplifikovali DNA kitem PowerPlex Y. Pomocí tohoto kitu je možná amplifikace 11 STR na chromozomu Y - DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390 a DYS385a/b.

Reakci jsme prováděli v objemu 25 μ l a pro přípravu každé reakce jsme použili 2,5 μ l PowerPlex Y 10X Primer Pair Mix, 2,5 μ l pufru Gold Star, 0,5 μ l iTaq DNA polymerázy, 9,5 μ l dH₂O a zbylých 10 μ l připadalo na izolát obsahující DNA, případně doplněný dH₂O. Jako pozitivní kontrolu jsme použili 0,5 μ l mužské standardní DNA 9948 a 9,5 μ l dH₂O, pro negativní kontrolu bylo do reakce použito 10 μ l dH₂O.

Na termocykleru jsme použili teplotní profil doporučený výrobcem kitu:

- úvodní denaturace:
 - 95 °C po dobu 11 min,
 - 96 °C po dobu 1 min,
- 10 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 94 °C,
 - nasedání primerů: ramp 29 % na 60 °C, poté 30 s při 60 °C,
 - extenze řetězce: ramp 23 % na 70 °C, poté 45 s při 70 °C,
- 24 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 90 °C,
 - nasedání primerů: ramp 29 % na 60 °C, poté 30 s při 60 °C,
 - extenze řetězce: ramp 23 % na 70 °C, poté 45 s při 70 °C,
 - finální extenze řetězce: 30 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

4.5.5.3 Yfiler

Druhý komerčně dodávaný kit, který jsme použili pro amplifikaci STR lokusů nacházejících se na chromozomu Y byl kit Yfiler. V tomto kitu je možná amplifikovat celkem 16 Y-STR lokusů - DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19,

DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635 (Y GATA C4), DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438 a DYS448.

Reakci jsme prováděli v objemu 25 μ l a pro přípravu každé reakce jsme použili 9,54 μ l pufru PCR Reaction Mix, 5 μ l směsi primerů YFiler Primer Set, 0,46 μ l Gold DNA Polymerázy. Zbylých 10 μ l byl izolát DNA, který byl případně doplněn dH₂O podle výsledků kvantifikace. V případě, kdy nebyla provedena kvantifikace jsme použili 10 μ l izolátu DNA. Pro pozitivní kontrolu jsme místo vzorku použili 10 μ l mužské standardní DNA 007, v případě negativní kontroly jsme použili 10 μ l dH₂O.

Na termocykleru jsme použili teplotní profil doporučený výrobcem kitu:

- úvodní denaturace: 95 °C po dobu 11 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 1 min při 94 °C,
 - nasedání primerů (annealing): 1 min při 61 °C,
 - extenze řetězce: 1 min při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 80 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

4.5.5.4 PowerPlex ESX 17 (EP01-SE) a PowerPlex ESI 17 (EP02-SE)

Pro amplifikaci pomocí kitů PowerPlex ESX 17 (EP01-SE) a PowerPlex ESI 17 (EP02-SE) jsme používali reakci v objemu 25 μ l. Pro přípravu jedné reakce jsme použili 5 μ l PowerPlex® ESX (ESI) 5X Master Mix a 2,5 μ l PowerPlex® ESX (ESI) 17 10X Primer Pair Mix. Zbylých 17,5 μ l jsme doplnili izolátem DNA, případně dH₂O. Jako pozitivní kontrolu jsme použili 0,5 μ l standardní DNA 9947A a 9,5 μ l dH₂O, pro negativní kontrolu bylo do reakce použito 10 μ l dH₂O.

Oba tyto kity amplifikují 16 autozomálních STR lokusů - D22S1045, D2S1338, D19S433, D3S1358, D2S441, D10S1248, D1S1656, D18S51, D16S539, D12S391, D21S11, vWA, TH01, SE33, FGA, D8S1179 + gen pro amelogenin určující pohlaví. Tyto lokusy jsou však v každém kitu značeny jinou fluorescenční barvou a mají i odlišně dlouhé amplikony. Při současném použití obou těchto kitů lze získat kombinací jejich výsledků

celkem 12 miniSTR lokusů. To je umožněno různou délkou amplikonů u stejných STR v jednotlivých kitech.

Nejprve jsme používali testovací prototyp kitu ESX 17 - EP01 17 a ESI 17 - EP02 17. Později jsme již pracovali se sériově vyráběnými kity ESX 17 a ESI 17.

Kity EP01 - SE a EP02 - SE mají podobný teplotní profil používaný na termocykleru, liší se pouze v teplotě pro nasedání primerů:

EP01 - SE

- úvodní denaturace: 96 °C po dobu 2 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 94 °C,
 - nasedání primerů: 2 min při 60 °C,
 - extenze řetězce: 90 s při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 45 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

EP02 - SE

- úvodní denaturace: 96 °C po dobu 2 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 94 °C,
 - nasedání primerů: 2 min při 59 °C,
 - extenze řetězce: 90 s při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 45 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

V případě kitů ESX 17 a ESI 17 je již používaný teplotní profil pro termocykler sjednocen:

- úvodní denaturace: 96 °C po dobu 2 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 94 °C,
 - nasedání primerů: 2 min při 59 °C,
 - extenze řetězce: 90 s při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 45 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

4.5.5.5 Identifiler

Kit Identifiler jsme používali pro amplifikaci bukálních stěrů, které nám sloužily jako srovnávací vzorky pro vyloučení kontaminace. Tento kit amplifikuje 16 autozomálních STR - CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA, D2S1338, D19S433 a amelogenin.

Pro amplifikaci každého vzorku pomocí kitu Identifiler jsme v souladu s pokyny popsány výrobcem použili 9,54 μ l pufru PCR Identifiler Reaction Mix, 5 μ l směsi primerů Identifiler Primer Set, 0,46 μ l Gold DNA polymerázy a 1 - 10 μ l vzorku - podle vyšší kvantifikace. Jako pozitivní kontrolu jsme použili 10 μ l standardní DNA 007, jako negativní kontrola bylo používáno 10 μ l dH₂O.

Na termocykleru jsme používali následující teplotní profil doporučený výrobcem kitu:

- úvodní denaturace: 95 °C po dobu 11 min
- 28 cyklů:
 - denaturace: 1 min při 94 °C,
 - nasedání primerů: 1 min při 59 °C,
 - extenze řetězce: 1 min při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 60 min při 60 °C,
- zchlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

4.5.5.6 Pentaplexy miniY lokusů

Pro účely analýzy degradované aDNA jsme si v naší laboratoři namíchali dva pentaplexy obsahující miniY lokusy. První pentaplex obsahoval systémy DYS446, DYS444, DYS438, DYS388 a DYS481. V druhém byly obsaženy systémy DYS426, DYS459, DYS392, DYS449 a DYS447 (Vaněk et al., 2009).

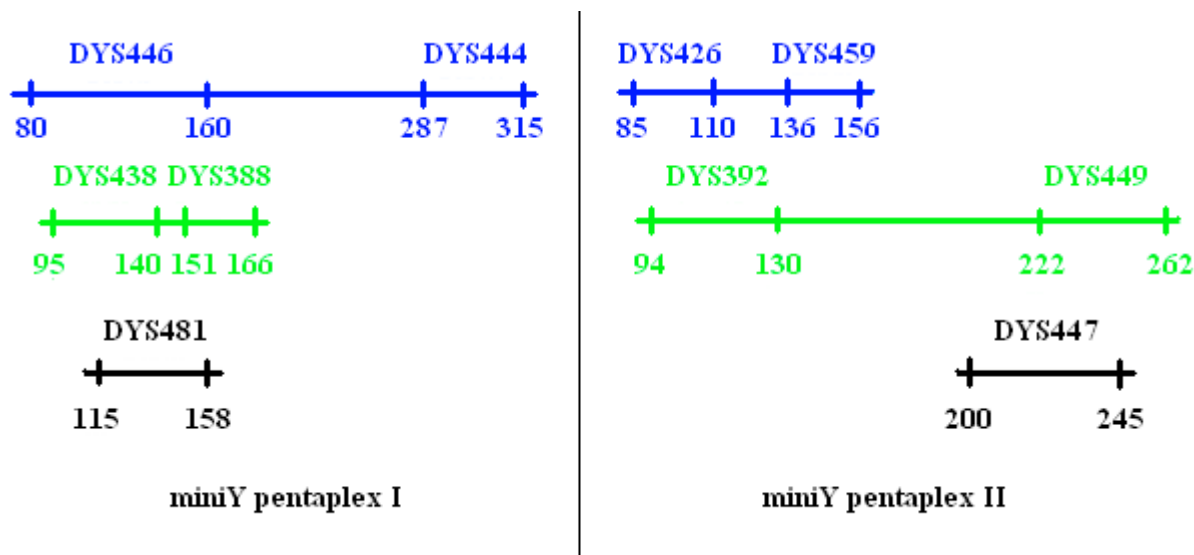
PCR reakci jsme prováděli v objemu 15 μ l. Pro každou reakci jsme použili 1,5 μ l pufru Gold Star, 1,5 μ l namíchané směsi primerů a 1,5 U Gold DNA polymerázy. Do 15 μ l jsme doplnili vzorek, případně dH₂O podle množství DNA ve vzorku stanoveném při kvantifikaci. Pro negativní kontrolu bylo používáno 10 μ l dH₂O. Jako pozitivní kontrolu jsme používali 1 μ l standardní DNA 007 a 9 μ l dH₂O.

Na termocykleru jsme použili následující teplotní profil popsany Vaňkem (Vaněk et al., 2009):

- úvodní denaturace: 95 °C po dobu 11 min,
- 30 cyklů:
 - denaturace: 30 s při 94 °C,
 - nasedání primerů: 90 s při 59 °C,
 - extenze řetězce: 90 s při 72 °C,
 - finální extenze řetězce: 90 min při 60 °C,
- chlazení a uchovávání: ∞ při 4 °C.

	Y STR lokus	primer forward a reverse	značení	citace
miniY pentaplex I	DYS446	TATTTTCAGTCTTGTCTGTC GAGACTCTGTCTGAAGAGAG	6-FAM	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS444	TCTAAGGGATCCAAAGGCAGAA GTGTGAACCATTTGGCATGTTTA	6-FAM	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS438	TGGGGAATAGTTGAACGGTAA GGCAACAAGAGTGAACTCCA	VIC	Ayub et al., 2000 Park et al., 2007
	DYS388	GAATTCATGTGAGTTAGCCGTTTAGC GAGGCGGAGCTTTTAGTGAG	VIC	Butler et al., 2002
	DYS481	AGGAATGTGGCTAACGCTGT ACAGCTCACCGAAGGTTGC	NED	Hanson and Ballantyne, 2007
miniY pentaplex II	DYS426	GGTGACAAGACGAGACTTTGTGT CTCAAAGTATGAAAGCATGACCA	6-FAM	Thomas et al., 1999
	DYS459	CAGGTGAACTGGGGTAAATAAT TTGAGCAACAGAGCAAGACTTA	6-FAM	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS392	AAAAGCCAAGAAGGAAAACAAA GAAACCTACCAATCCCATTCCTT	VIC	Schoske et al., 2003
	DYS449	CTTGCTCTTTTTCTTTCTCTCTT GCACTCTAGGTTGGACAACAA	VIC	Park et al., 2007
	DYS447	GGTCACAGCATGGCTTGGTT GGGCTTGCTTTGCGTTATCTCT	NED	Butler et al., 2002

Tabulka č. 5. Sekvence a značení forward primerů použitých v miniY pentaplexu I a miniY pentaplexu II.



Obrázek č. 8 Rozsahy (v bp) jednotlivých STR lokusů amplifikovaných miniY pentaplexem I a miniY pentaplexem II.

Optimalizace koncentrace primerů miniY pentaplexů I a II

Před použitím miniY pentaplexů I a II na „ostré“ vzorky, jsme nejprve otestovali vyváženost píků při koncentracích popsanych v literatuře. Ve dvou případech jsme byli nízkým, nebo naopak vysokým signálem jednotlivých systémů nuceni koncentraci upravit (viz tabulka č. 6).

Testování citlivosti miniY pentaplexů na standardní DNA 007 a 9948

Před použitím obou pentaplexů na vzorky obsahující aDNA jsme nejprve otestovali citlivost na standardní DNA 007 a 9948. Testovali jsme citlivost na různých koncentracích DNA - 250 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg a 12,5 pg DNA, což odpovídá přibližně 40, 15, 8, 4 a 2 diploidním buňkám - předpoklad 6,6 pg DNA na buňku (Anoruo et al., 2007).

	Y STR lokus	koncentrace použitých primerů (v pmol/μl)		citace
		popsaná literatuře	nová	
miniY pentaplex I	DYS446	4,0	4,0	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS444	10,4	10,4	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS438	2,0	1,0	Ayub et al., 2000
	DYS388	4,2	4,2	Butler et al., 2002
	DYS481	1,2	1,2	Hanson and Ballantyne, 2007
miniY pentaplex II	DYS426	0,6	3,0	Thomas et al., 1999
	DYS459	2,8	2,8	Hanson and Ballantyne, 2007
	DYS392	1,4	1,4	Schoske et al., 2003
	DYS449	5,2	5,2	Park et al., 2007
	DYS447	1,8	1,8	Butler et al., 2002

Tabulka č. 6 Koncentrace primerů používaných v miniY pentaplexu I a miniY pentaplexu II.

4.5.6 Purifikace amplifikátu

Jelikož se nám po amplifikaci pomocí pentaplexů I a II vyskytli ve výsledném elektroforetogramu artefakty způsobené nedostatečným přečištěním primerů výrobcem, začali jsme amplifikát přečišťovat.

Na přečištění amplifikátu od zbylých primerů a iontů jsme použili kit BigDye XTerminator: 10 μl amplifikátu vzniklého během PCR jsme přidali do připravené směsi 45 μl SAMTM Solution a 10 μl XTerminatorTM Solution, inkubovali 30 min za stálého třepání a centrifugovali 2 min při 2000 rpm. Celé přečišťování jsme prováděli v 96 jamkové destičce. Po přečištění se DNA nacházela rozptýlená v supernatantu a přebytečné primery, nukleotidy a ionty zůstaly nachytány na dně jamky na usazených částicích. Část supernatantu jsme poté použili pro elektroforézu na sekvenátoru.

4.5.7 Stanovení genetického profilu

Ke stanovení genetického profilu jsme použili přístroj pro kapilární elektroforézu - sekvenátor. Vzorky ke genotypizaci jsme připravovali v 96-jamkové destičce. U amplifikace pomocí komerčních kitů (viz kapitola 4.5.5.1 - 4.5.5.5) jsme použili 2 µl produktu vzniklého během PCR a 12 µl Hi-Di formamidu. U přečištěných produktů PCR vzniklých amplifikací popsanou v kapitole 4.5.5.6 jsme místo 12 µl formamidu a 2 µl vzorku použili 4 µl přečištěného vzorku a 8 µl formamidu.

Všechny vzorky jsme před vlastní genotypizací denaturovali zahřátím v termocykleru (Verity nebo GA 9700) po dobu 3 min při teplotě 95°C následovaným prudkým zchlazením v destičce s ledem. Standardní napětí při nástřiku sekvenátoru bylo 3kV po dobu od 10 s a 30 s.

Kromě produktu PCR a formamidu jsme do vzorku před elektroforézou přidali také vnitřní standard. Vnitřní standard je délkový marker, který je označen jinou fluorescenční barvou než amplifikované fragmenty DNA vzorku. Tento marker vytváří zřetelné píky reprezentující fragmenty o známém počtu bází v pevně stanovených intervalech a podle nich se pak odečítají skutečné délky zkoumaných alel. Při amplifikaci pomocí kitu PowerPlex Y jsme použili 1 µl vnitřního standardu ILS 600, u kitů od výrobce Applied Biosystems (MiniFiler, a YFiler) jsme použili 0,3 µl vnitřního standardu LIZ 500 a u kitů ESX (EP01) a ESI (EP02) jsme použili 1µl CC5 ILS 500. Výše popsané množství vnitřního standardu je vždy vztaženo na jeden vzorek. U vzorků po přečištění jsme používali vnitřní standard LIZ 500 - testovali jsme různá množství, nakonec jsme používali jen 0,02 - 0,03 µl na jeden vzorek.

Ke každému z použitých multiplexových kitů jsme v každém jednotlivém běhu sekvenátoru analyzovali také odpovídající alelický žebřík. Podle alelického žebříku jsme odečítali stanovené profily vzorků, tzn. přiřazovali jsme konkrétní alely k píkům v elektroforetogramu.

4.5.8 Vyhodnocování vzorků

Při vyhodnocování elektroforetogramů získaných z analýzy kapilární elektroforézou - sekvenátorem jsme používali software GeneScan verze 3.7.1 a

GeneMapper ID-X verze 1.1 (oba Applied Biosystems), popřípadě software GeneMarker verze 1.71 (SoftGenetics LLC). Při vyhodnocování s použitím prvního jmenovaného softwaru (GeneScan) dochází pouze k přiřazení pozice danému píku. Zbylé dva programy (GeneMapper a GeneMarker) již umožňují automatické porovnání píků s alelickým žebříkem a přiřazení čísla alely.

Každý vzorek jsme vždy vyhodnocovali podle alelického žebříku, který byl analyzován sekvenátorem spolu se vzorky a prošel tak při analýze shodnými podmínkami.

Jako potvrzenou alelu jsme brali až alely vyskytující se nejméně ve dvou nezávislých izolacích a amplifikacích pomocí daného kitu, případně miniY pentaplexu. V případě rozdílných alel ve dvou izolacích nebyly tyto alely brány jako vyskytující se v daném profilu a byly vyřazeny jako artefakty, nebo kontaminace.

Jednotlivé píky byly hodnoceny jak podle svého tvaru, tak podle velikosti. Z vyhodnocování byly vyřazeny píky, které byly zalomené, zakulacené, případně příliš úzké (spiky), neodpovídaly alelickému žebříku a stuttery. Při vyhodnocování jsme také měli nastavený detekční výškový limit pro jednotlivé píky. V případě nedosažení tohoto limitu nebyl pík hodnocen.

4.5.9 Dekontaminační opatření

Při izolaci aDNA jsme dodržovali všechny doporučené postupy pro zamezení vzniku kontaminace ve vzorcích. Při jakékoliv manipulaci se vzorky jsme používali ochranné pomůcky - rukavice, roušku, ochranný oděv a ochrannou pokrývku hlavy. V případě přípravy vzorků jsme ještě navíc používali ochranné navlékací rukávy.

Přípravu vzorku - zahrnující čištění a řezání, mletí vzorku na prášek, izolaci, kvantifikaci a přípravu PCR jsme vždy dělali ve fyzicky oddělených laboratořích. PCR a post - PCR zóna, kde jsme manipulovali s amplifikovanou DNA byla umístěna v jiném patře a přenášení amplifikovaných vzorků z post - PCR do pre - PCR zóny bylo zakázáno a tento zákaz byl striktně dodržován.

Při práci jsme používali výhradně aerosol - resistantní jednorázové, sterilní pipetové špičky a autoklávem sterilizované zkumavky - 2, 1,5 a 0,2 ml a dH₂O.

Po ukončení práce v laboratoři byl vždy povrch pracovní plochy a laminárního boxu ošetřen desinfekčním prostředkem Incidur Spray a přípravkem DNA Remover, který odstraňuje případné zbytky DNA.

4.5.10 Autentizace vzorků

I přes výše uvedená dekontaminační opatření je vznik kontaminace teoreticky možný. Z tohoto důvodu jsme se všemi nám dostupnými prostředky snažili případnou kontaminaci odhalit.

Všechny získané výsledky jsme nejprve porovnali navzájem mezi sebou, pro zjištění možných příbuzenských vztahů a pro potvrzení autenticity každého z nich. Nými získané STR profily byly dále porovnávány s STR profily antropologů, kteří přišli do styku se vzorky - Mgr. Pavla Kubálka a RNDr. Marty Dočkalové, PhD. Oba tyto STR profily jsme získali izolací bukálních stěrů výše jmenovaných antropologů. V neposlední řadě byly výsledky srovnávány s STR profily kolegů z laboratoře a s národní databází DNA pro zjištění, zda nedošlo k přenosu DNA z recentních případů řešených na KÚP do námi analyzovaných vzorků.

Při ověřování původnosti námi získaných vzorků jsme u kosti č. 1 pocházející z pohřebiště Blučina část odebrané kosti kontaminovali a zjišťovali jsme, zda je možné kontaminaci detekovat i po očištění a obroušení vzorku. Nerozemletý vzorek kosti o rozměrech cca 1 x 1 cm jsme kontaminovali pomocí 0,5 ml dH₂O obsahující 10 µl standardní mužské DNA 9948 (10 ng DNA/µl) a 0,5 ml dH₂O obsahující 10 µl izolátu bukálního stěru jednoho z kolegů v laboratoři (u této DNA nebyla známa koncentrace). Takto kontaminované vzorky jsme nechali týden při pokojové teplotě v laminárním boxu. Vzorky jsme omyli tekoucí vodou a opět nechali týden vysušit při pokojové teplotě v laminárním boxu. Následně jsme vzorky obrousili a rozdrtili v tekutém dusíku (postup viz kapitola 4.5.1 a 4.5.2). Vzorky jsme analyzovali pomocí kitů MiniFiler, ESI, Yfiler, PowerPlex Y a miniY pentaplexů I a II.

5 Výsledky

5.1 Metoda izolace DNA a stanovení STR profilu u zkušebních vzorků

Pro izolaci zkušebních vzorků jsme vyzkoušeli metodu popsanou Yangem et al. (1998) a následně Anderungem et al., (2008) založenou na principu adsorpce DNA na silikát (viz kapitola 4.5.3.1) a dva různé protokoly pro izolaci pomocí Chelex 100 (viz kapitola 4.5.3.2). Amplifikaci jsme nejprve ve všech případech prováděli kitem MiniFiler.

5.1.1 Izolace DNA pomocí Chelex 100 a poly(vinyl-polypyrolidonu)

Izolace DNA ze zkušebních vzorků pomocí 5 % suspenze Chelex nebyla ani po několika opakováních každého z obou protokolů úspěšná - při kvantifikaci, ani při PCR nedošlo ve vzorku k detekci žádné DNA. Úspěšnost izolace nezvýšilo ani přidání PVPP, který měl ze vzorku odstranit huminové kyseliny a zabránit tak inhibici následné PCR. Ověřit účinnost PVPP na odstranění huminových kyselin se nám tedy vzhledem k negativnímu výsledku izolace pomocí Chelex 100 nepodařilo.

5.1.2 Izolace kitem MinElute™ PCR Purification Kit

Izolace DNA z kosterního a zubního materiálu pomocí tohoto kitu se ukázala jako velmi účinná, jelikož se nám podařilo získat plný profil u tří ze čtyř zkušebních vzorků - dvou vzorků kostí a jednoho zubního vzorku, u kterých již byla provedena extrakce jinou metodou používanou na KÚP. U čtvrtého vzorku kosti pocházejícího od stejného jedince jako zubní vzorek bylo amplifikací kitem MiniFiler získáno celkem 6 STR lokusů. Na těchto vzorcích jsme si úspěšně ověřili účinnost námi vybrané metody na vzorky ze zubní i kostní tkáně. V následující tabulce č. 7 jsou uvedeny profily, které byly získány dříve provedenou analýzou DNA a námi stanovené STR profily. Získané profily jsou vzhledem k tomu, že se jednalo o materiál související s vyšetřováním trestných činů zveřejněny pod smyšleným označením ZK01, ZK02 a ZK03.

STR	ZK01 původní	ZK01 nový	ZK02 původní	ZK02 nový	ZK03 původní	ZK03 nový	ZK03 zub
CSF1PO	--	11/12	--	10/11	--	12	12
FGA	19	19/23	--	23/25	--	21/22	21/22
D13S317	--	12/14	--	9	--	8	8
D7S820	--	10	--	10/11	--	--	11/12
amelogenin	XY	XY	--	XY	--	XY	XY
D2S1338	--	17/19	--	23/24	--	17/24	17/24
D21S11	30	30	--	31/32.2	--	29/32	29/32
D16S539	8/11	8/11	--	10/11	--	--	9/12
D18S51	--	12/13	--	16/17	--	14/16	14/16

Tabulka č.7 Porovnání výsledků získaných po izolaci dřívě používanou metodou a izolací pomocí kitu Post PCR Purification MinElute kit a amplifikačím kitem MiniFiler.

5.2 Optimalizace miniY pentaplexů I a II

5.2.1 Koncentrace primerů v MiniY pentaplexu I a II

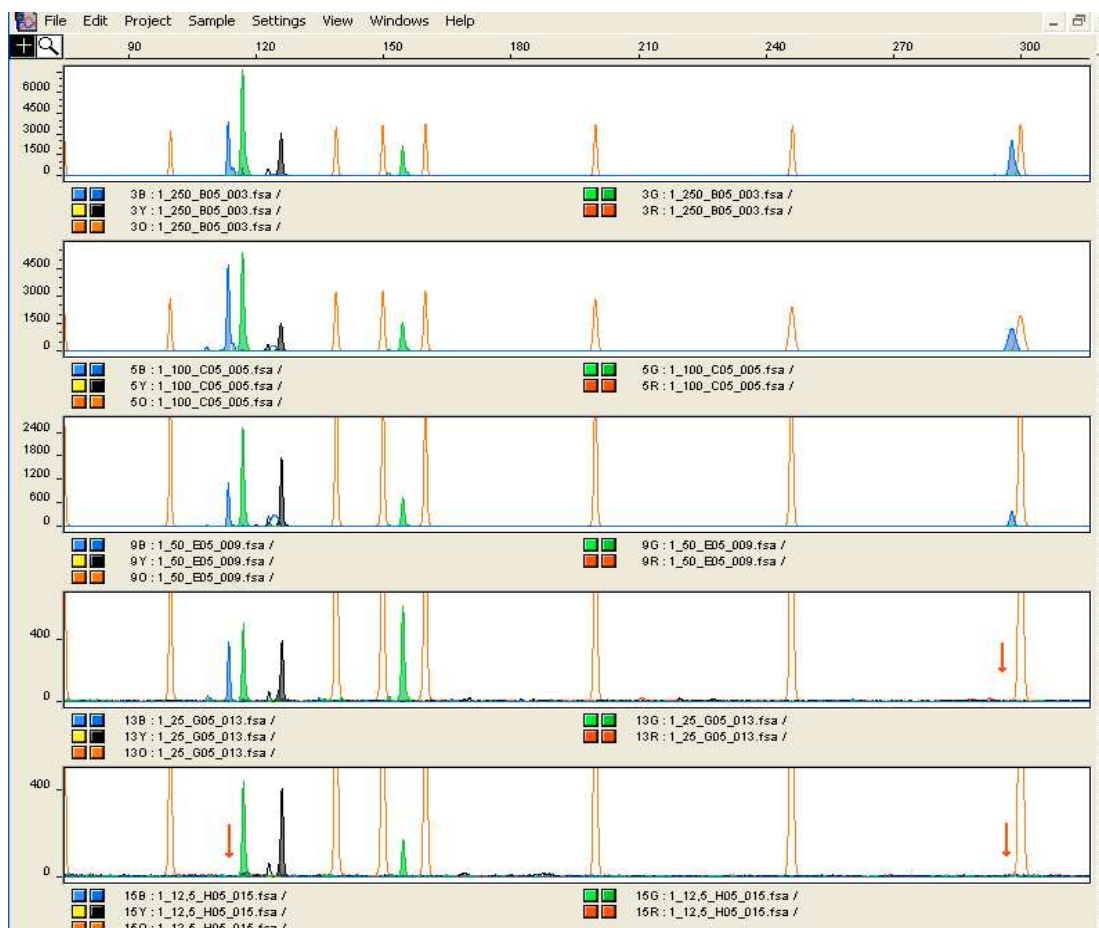
Před použitím miniY pentaplexu I a II na vzorky obsahující aDNA jsme nejprve otestovali vyváženost píků jednotlivých Y STR lokusů s použitím standardní DNA. Pro přípravu PCR reakce jsme použili koncentrace primerů popsané již dříve v literatuře (viz. tabulka č.8). U dvou STR lokusů byly signály příliš vysoké/nízké oproti ostatním STR lokusům v pentaplexu. U těchto lokusů jsme upravili koncentrace primerů, ty jsou popsány v tabulce č. 8.

Y STR lokus	koncentrace použitých primerů (v pmol/μl)	
	popsaná	nová
DYS438	2,0	1,0
DYS426	0,6	3,0

Tabulka č. 8 Upravená koncentrace primerů pro DYS438 a DYS426 v miniY pentaplexech I a II.

5.2.2 Množství DNA detekovatelné pomocí miniY pentaplexu I a II

Při určování detekčních limitů jsme u obou pentaplexů zjistili, že pro stanovení úplného profilu postačuje 50 pg DNA do jedné reakce. Při 25 pg standardní DNA již docházelo k dropoutu jednotlivých alel. Více viz obrázek č. 9.



Obrázek č. 9 Amplifikace 250 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg a 12,5 pg standardní DNA 007 pomocí miniY pentaplexu I a následné přečištění kitem BigDye XTerminator. Červenými šipkami jsou vyznačena místa alelického dropoutu.

Vzhledem k tomu, že byla pro optimalizaci použita standardní DNA, která na rozdíl od aDNA neobsahuje zlomy a jiné změny v sekvenci, používali jsme pro vzorky minimálně 100 pg aDNA. I přesto, že jsme i při 50 pg standardní DNA dostali plný profil, v případě pozitivní kontroly jsme používali také 100 pg DNA. Toto množství jsme zvolili tak, abychom vyloučili možnost vzniku alelického dropoutu a tím způsobené znehodnocení celé série vzorků, a abychom nepřesytli PCR reakci.

5.2.3 Množství amplifikátu používané pro genotypizaci

Po přečištění amplifikátu pentaplexů I a II bylo nutné upravit množství přečištěného amplifikátu dávaného do formamidu pro genotypizaci. Standardně se v laboratoři na KÚP používá 2 μl nepřečištěného amplifikátu doplněné 12 μl formamidu. Během purifikace však dojde k odstranění iontů, solí, přebytečných primerů i nukleotidů. Elektrokinetické nasávání vzorku do kapiláry sekvenátoru je tak velice usnadněno a tím pádem se zvýší i účinnost celého prvního kroku kapilární elektroforézy. Z tohoto důvodu není nutné používat tak velké množství amplifikované DNA jako při reakci bez předchozí purifikace.

Pro purifikaci jsme použili 10 μl amplifikátu a 55 μl dalších reagensů (viz kapitola 4.5.6). Při tomto rozředění amplifikátu by bylo potřeba do sekvenátoru dát 12 - 14 μl purifikovaného amplifikátu abychom dosáhli přibližně stejného množství amplifikované DNA. Toto množství se však ukázalo jako nadměrné a docházelo k tomu, že během standardně používaného 30 s a 10 s nástřiku do kapiláry sekvenátoru, signál překročil hranice detekčního systému sekvenátoru a nebylo možné výsledky vyhodnotit. Nejvýhodnější se z hlediska výšky a kvality píků ukázal poměr 4 μl přečištěného amplifikátu a 8 μl formamidu.

V případě vnitřního standardu LIZ 500 pro sekvenátor jsme, vzhledem k snazšímu elektrokinetickému nasávání vzorku kapilárou, byli také nuceni upravit množství dávané do jedné reakce. Místo 0,3 μl standardně používaných pro kity vyráběné společností Applied Biosystems jsme pro jednu reakci použili desetkrát zmenšené množství, tedy 0,03 μl . Dosáhli jsme tak vyváženějšího poměru píků vnitřního standardu a vlastního vzorku v elektroforetogramu.

5.3 Stanovení autozomálních STR profilů u vzorků obsahujících aDNA

Izolaci DNA u všech vzorků určených k aDNA analýze jsme provedli podle protokolu popsáném v kapitole 4.5.3.1. Účinnost tohoto protokolu jsme si nejprve ověřili na kontrolních vzorcích (více viz kapitola 5.1.2).

5.3.1 Koncentrace vzorku pomocí AmiconUltra

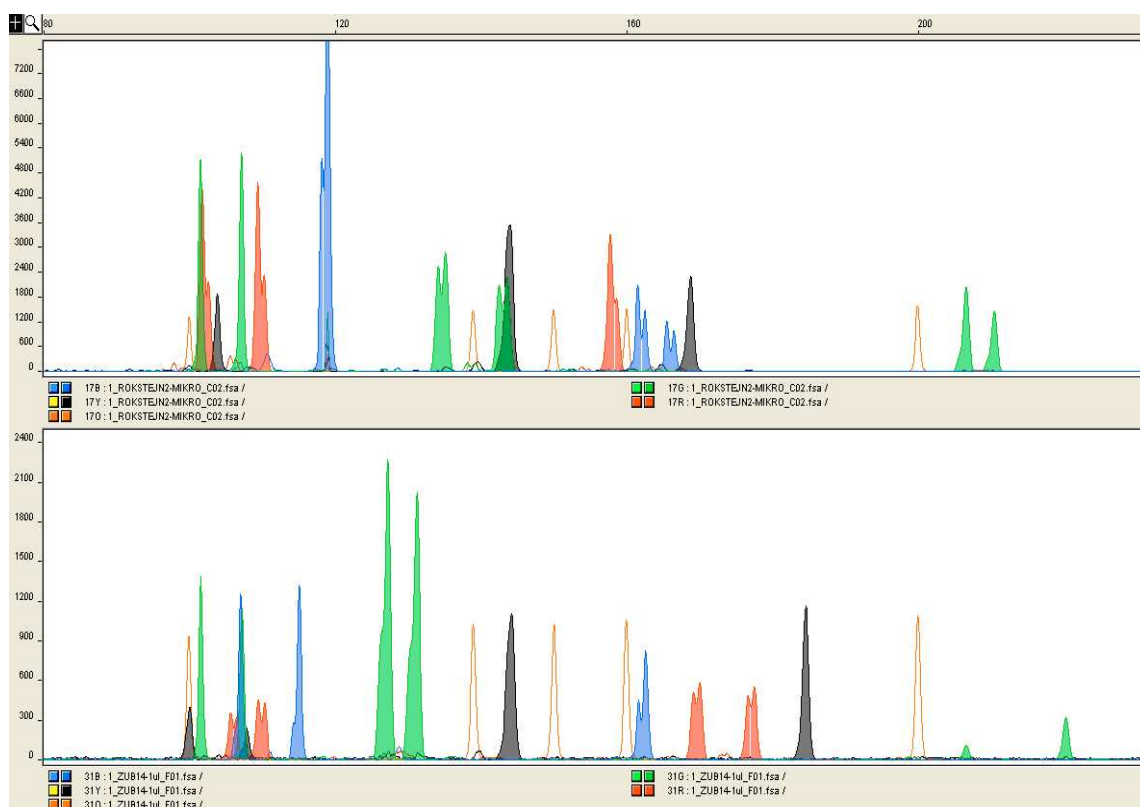
Pro urychlení práce a snížení rizika kontaminace jsme v průběhu práce zkusili použít koncentrátory AmiconUltra (postup viz kapitola č. 4.5.3.1), kterými jsme snížili objem izolační reakce z cca 5 ml na 500 μ l. Předpokládali jsme, že obsah aDNA v izolátu zůstane stejný, případně se minimálně sníží. Bohužel se tato cesta ukázala pouze jako rychlejší varianta izolace. Co se týká množství extrahované DNA, to bylo podle provedené kvantifikace DNA několikrát nižší (v průměru 5,2 krát nižší) než při použití klasického protokolu. Vzhledem k tak velkým ztrátám ve výtěžnosti aDNA nebyl tento postup při další práci využit. Výsledky kvantifikace izolátu získaného s použitím a bez použití koncentrátoru AmiconUltra jsou zaznamenány v následující tabulce č. 9. Jelikož se kvantifikace provádí vždy v dubletech pro jednotlivé vzorky, jsou vždy uvedeny obě získané hodnoty.

	Výsledky kvantifikace (hodnota Ct)	Predikované množství DNA ve vzorku
vzorek bez použití koncentrátoru	35,49 35,43	0,070 ng/ μ l 0,073 ng/ μ l
vzorek po použití koncentrátoru	38,23 37,49	0,012 ng/ μ l 0,019 ng/ μ l

Tabulka č. 9 Porovnání množství DNA po izolaci bez použití koncentrátoru AmiconUltra a s jeho použitím (jedná se o izolát z femuru novorozence z hradu Rokštejn).

5.3.2 Amplifikace vzorků obsahujících aDNA

Po izolaci vzorky prošly kvantifikací (výsledky viz příloha č. 9.3). Pokud bylo pomocí kvantifikace možné detekovat DNA následovala amplifikace vzorku. Nejprve jsme vždy prováděli amplifikaci kitem MiniFiler, který obsahuje 8 miniSTR lokusů + detekci pohlaví jedince pomocí amelogeninu. Celkem jsme izolovali aDNA ze vzorků pocházejících od 35 jedinců z různých pohřebišť (více viz kapitola 4.3). Úspěšně se nám podařilo amplifikovat aDNA u 19 z nich, kde jsme téměř vždy získali všech 8 miniSTR lokusů. V případě 4 jedinců se jednalo o ženské pohlaví, v ostatních 15 případech o pohlaví mužské. V tabulce č. 10 jsou zaznamenány jednotlivé STR profily námi úspěšně analyzovaných jedinců získané kitem MiniFiler. Na obrázku č. 10 je uveden příklad získaných elektroforetogramů - v obou případech bylo získány alely ve všech 8 miniSTR lokusech, které jsme analyzovali a amplifikovaly se obě alely amelogeninu (v obou případech se jednalo o muže).



Obrázek č. 10 Amplifikace kitem MiniFiler u novorozence z hradu Rokštejn a zubu č. 14.

	Amelogenin	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
Zub 5	XY	16/21	29/31.2	10/11	10	9/11	13/14	11/12	22
Zub 6	XX	23/24	31.2	8/9	11/12	11/13	17	10	20
Zub 8	XY	25	28	11	11/12	12	11/19	10/11	20
Zub 12	XY	--	29/30	8/12	9/11	13	14	11	20/21
Zub 13	XY	25	26/29	9/11	10/12	11	14/16	11	19/23
Zub 14	XY	17/18	29/32.2	9/11	9	11/13	12/22	11/12	22/24
Zub 15	XY	18/22	30	9/12	8/12	11/12	14/18	11/12	19/21
Zub 16	XY	11/24	28	8/9	10/13	11/12	12/13	10	21/25
Zub 17	XY	20/23	28/33.2	11	8/10	11/12	15/18	13/14	18/22
Zub 18	XY	20	29/30	9/12	11	9/10	13/17	11	21/23
Zub 20	XY	23	30	12/13	9	11/12	14/18	10/12	17/24
Zub 23	XX	17/20	28/29	11	8/9	12	16/18	12/13	20/21
Zub 25	XY	19	30	9/11	8/10	11	12/14	11/12	20
Zub 27	XY	--	28/31	11/12	--	11/13	16	10	--
Zub 28	XY	19/20	32.2/ 33.2	9/11	9/10	9/11	12/17	12	19/20
Zub 29	XX	17	28/29	12	11/12	11/14	15/17	10/12	20
Zub 30	XY	14/16	29/30	9/12	10	12/13	12/14	--	--
Rokštejn	XY	19/21	29/30	12	9/10	12	12/18	10/12	19
Kost č. 1	XX	17/19	28/30	10/11	8/10	8/12	12/17	11	20/26

Tabulka č. 10 Výsledné profily jedinců č. 5, 6, 8, 12,13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 23, 25, 27, 28, 29 a 30 od společnosti Labrys, novorozence z hradu Rokštejn a kosti č. 1 z naleziště Blučina, získané po amplifikaci kitem MiniFiler.

Pokud bylo v izolátu dostatečné množství aDNA pro další analýzu, pokračovali jsme amplifikací autozomálních STR pomocí kitů ESX (EP01) a ESI (EP02). Jelikož oba tyto kity amplifikují stejné STR, jen v jiném pořadí, je možné výsledky amplifikace

kombinovat. Kontrola výsledků s kitem MiniFiler probíhala pomocí pěti shodných STR lokusů. Při porovnávání výsledků nebyly mezi jedinci pocházející ze stejného pohřebiště zaznamenány žádné možné příbuzenské vztahy. Výsledky této analýzy jsou zaznamenány v tabulkách č. 11 a 12.

STR	Zub 5	Zub 8	Zub 12	Zub 13	Zub 15	Zub 18	Zub 20
Amelogenin	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY
D3S1358	14/15	14/18	14/17	14/16	16/17	14/16	14/15
TH01	6/9.3	9/9.3	8	8/9.3	8/9.3	6/9	9.3
D21S11	29/31.2	28/31.2	29/30	26/29	30	29/30	30
D18S51	13/14	11/19	14	14/16	14/18	13/17	14/18
D10S1248	13/17	15/16	14/16	13/14	13	14/15	14/15
D1S1656	15/18.3	12/15	15.3/17.3	16.3	12	18.3	14
D2S1338	16/20	25	--	25	18/22	20	23
D16S539	9/11	12	13	11	10/11	9/10	11/12
D22S1045	15/17	15/16	15/16	15	15/16	11/16	16
vWA	18	15/17	14/17	18	15/18	15/17	15/17
D8S1179	14	12/15	10/15	13	11/15	12/13	12/13
FGA	22/22.2	20	20/21	19/21	20/21.2	21/23	17/24
D2S441	11	10/14	10/11	11/14	11	11/15	11/14
D12S391	17	19/20	18//22	18	18/19	21	17
D19S433	14/15	13/14	12/14	13/14	14/15/16.2	14	--
SE33	--	16	28.2/29.2	16	16	19/20	8/36

Tabulka č. 11 Výsledky amplifikace kity ESX a ESI u jedinců č. 5, 8, 12, 13, 15, 18 a 20.

STR	Zub 23	Zub 25	Zub 27	Zub 28	Zub 29	Kost č.1
Amelogenin	XX	XY	XY	XY	XX	XX
D3S1358	14/15	15/17	16	15/16/18	15/16	15/16
TH01	6	6	9.3	8/9.3	7/9.3	7/9
D21S11	28/29	30	28/31	32.2/33.2	28/29	28/30
D18S51	16/18	12/14	16	12/17	15/17	12/17
D10S1248	14/16	14	13	13	13/15	13/14
D1S1656	12	11/12	--	16/16.3	12	12/17
D2S1338	17/20	19/25	16/19	19/20	17	17/19
D16S539	12	11	11/13	9/11	11/14	8/12
D22S1045	15/16	15	11	15/16/17	15/16	14/16
vWA	15	16/17	17	16/17	14/16	16/17
D8S1179	12/13	11/13	14	13/14	10/14	13
FGA	20/21	20	--	19/20	20	20/26
D2S441	10/11	14	11	10/14	10/11.3	11/11.3
D12S391	17/21	17/21	--	15/23	17.3/20	15/18
D19S433	13/14	13/16	--	15	14	15
SE33	--	--	--	--	19/20	15/22.2

Tabulka č. 12 Výsledky amplifikace kity ESX a ESI u jedinců č. 23, 25, 27, 28, 29 a kosti č. 1.

5.4 Amplifikace STR nalézajících se na chromozomu Y

V případě, že nám opakovaně ukazoval amelogenin na muže, amplifikovali jsme tyto vzorky nejprve pomocí miniY pentaplexů I a II a následně i pomocí komerčních kitů určených speciálně pro chromozom Y - PowerPlex Y a Yfiler.

Jelikož nejsou oba tyto komerční kity zaměřeny speciálně na analýzu aDNA tak obsahují i STR lokusy delší než 300 bp, které již většinou nebývají u aDNA přítomné. To se nám u většiny vzorků potvrdilo a Y - STR lokusy nacházející se okolo hranice 300 bp nebyly ani při několika opakováních úspěšně amplifikovány. Výhodou kombinace těchto dvou kitů od konkurenčních výrobců je možnost potvrzení výsledků u 11 Y - STR, které jsou společné v obou těchto kitech.

V případě amplifikace pomocí miniY pentaplexu I a II, jsme získali u jedenácti jedinců alely ve všech, respektive téměř ve všech námi amplifikovaných lokusech. U zbylých čtyřech jedinců jsme amplifikací získali maximálně 6 amplifikovaných lokusů. Výsledky této analýzy Y chromozomu jsou shrnuty v tabulkách č. 13 a 14. V případě DYS426 nejsou v tabulkách uváděny alely, ale pozice jednotlivých píků v elektroforetogramu. Je to z toho důvodu, že jsme neměli k dispozici referenční data pro pozice jednotlivých alel nacházejících se v tomto lokusu.

	Y STR	Zub 5	Zub 8	Zub 12	Zub 13	Zub 14	Zub 15	Zub 16	Zub 17
MiniY pentaplex I	DYS446	13	14	13	22	13	13	13	12
	DYS444	12	14	10	13	14	13	14	13
	DYS438	12	11	10	10	11	10	11	--
	DYS388	12	12	13	13	12	13	12	12
	DYS481	24	24	31	21	25	31	25	22
MiniY pentaplex II	DYS426	91,05	90,96	88,55	88,77	91,36	88,64	91,38	91,41
	DYS459	9/10	9/10	8/10	9/10	9/10	9/10	9/10	9/10
	DYS392	13	11	11	11	11	11	11	10
	DYS449	29	--	30	30	32	28	31	29
	DYS447	24	23	--	23	23	25	23	24

Tabulka č. 13 Výsledné alely získané amplifikací pomocí miniY pentaplexů I a II u jedinců č. 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16 a 17.

	Y STR	Zub 18	Zub 20	Zub 25	Zub 27	Zub 28	Zub 30	Rokštejn
MiniY pentaplex I	DYS446	13	13	13	12	16/17	13	12
	DYS444	12	13	12	13	14	--	--
	DYS438	12	11	12	12	17	11	12
	DYS388	12	12	12	--	--	--	12
	DYS481	23	25	22	--	--	--	25
MiniY pentaplex II	DYS426	91,65	91,47	91,59	88,68	91,73	91,68	91,82
	DYS459	9/10	9/10	9/10	8/10	9	--	--
	DYS392	12	11	13	13	18	12	11
	DYS449	29	32	29	--	--	--	--
	DYS447	25	23	25	--	--	--	--

Tabulka č. 14 Výsledné alely získané amplifikací pomocí miniY pentaplexů I a II u jedinců č. 18, 20, 25, 27, 28, 30 a novorozence z hradu Rokštejn.

V případě amplifikace komerčními kity PowerPlex Y a Yfiler se nám podařilo pouze u dvou jedinců amplifikovat všechny lokusy. U ostatních jedinců vždy chybělo několik lokusů, které vzhledem k pravděpodobné fragmentaci DNA nebylo možné amplifikovat. Tyto chybějící produkty PCR se většinou nacházely v oblasti mezi 200 - 300 bp.

Při obdržení dostatečného počtu Y - STR jsme provedli určení Y - haploskupiny pomocí on - line dostupného programu Haplogroup Predictor. Nejčastěji se nám vyskytla haploskupina R - celkem devět jedinců (R1a v pěti případech a R1b ve čtyřech případech), následovala haploskupina I - dva jedinci a G - jeden jedinec. U vzorků s malým počtem určených Y - STR lokusů nebylo určování haploskupin vzhledem k nízkému procentu pravděpodobnosti prováděno. Tyto výsledky korelují i s dnešním výskytem jednotlivých

haploskupin v České republice - nejrozšířenější je haploskupina R (R1a - východoevropský i R1b - západoevropský původ), málo frekventované potom haploskupiny I a G (haploskupina G se vyskytuje v Evropě u 1 - 10 % mužské populace, nejrozšířenější je u populace kavkazské (Athey, 2007), haploskupina I se v Evropě vyskytuje ve větším zastoupení především v severních oblastech - například ve Švédsku – viz obrázek č. 2).

Výsledky amplifikace kity PowerPlex Y a Yfiler a určené haploskupiny jsou zaznamenány v tabulkách č. 15 a 16.

Y-STR	Zub 5	Zub 8	Zub 12	Zub 13	Zub 14	Zub 15	Zub 16	Zub 17
DYS456	16	--	--	15	17	--	17	14
DYS389I	13	13	13	12	13	12	13	13
DYS390	23	25	24	22	25	24	25	--
DYS389II	29	29	30/31	28/30	29	29	--	--
DYS458	17	--	--	16	16	--	16	17
DYS19	14	15	16	15	16	--	16	14
DYS385a/b	11/14	11/15	14/15	14	11/14	15	11/14	11/14
DYS393	13	13	13	14	13	13	13	13
DYS391	11	10	11	10	10	11	10	11
DYS439	12	11	--	--	11	--	12	15
DYS635	23	--	--	--	23	--	23	--
DYS392	13	11	11	11	11	11	--	10
Y GATA H4	11	--	--	12	12	--	12	12
DYS437	15	14	15	16	14	15	14	15
DYS438	12	11	10	10	11	10	11	12
DYS448	19	-	--	--	20	--	20	--
Y-haploskupina	R1b	R1a	I2a	G2a	R1a	I2a	R1a	R1b

Tabulka č. 15 Výsledky amplifikace STR lokusů na Y chromozomu pomocí kitů PowerPlex Y a Yfiler u zubů 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16 a 17 od společnosti Labrys.

Y-STR	Zub 18	Zub 20	Zub 25	Zub 27	Zub 28	Zub 30	Rokštejn
DYS456	16	17	15	--	--	--	16
DYS389I	13	13	14	13	13/14	13	13
DYS390	24	--	23	23	--	12/14	25
DYS389II	29	32	--	--	25	31	30
DYS458	19	17	17	--	--	--	16
DYS19	14	--	--	15	16	16	17
DYS385a/b	11/14	11/14	11/14	16	--	--	10
DYS393	13	13	13	12/13	12	13	13
DYS391	11	10	11	10	10	11	10
DYS439	--	--	--	--	--	--	12
DYS635	--	--	--	--	--	--	23
DYS392	12	11/13	13	13	13	--	--
Y GATA H4	12	12	12	--	--	--	12
DYS437	15	14	15	14/17	--	--	14
DYS438	12	11	12	8/10/12	10/11	--	12
DYS448	--	--	--	--	--	--	--
Y-haploskupina	R1b	R1a	R1b	----	----	----	R1a

Tabulka č. 16 Výsledky amplifikace STR lokusů na Y chromozomu pomocí kitů PowerPlex Y a Yfiler u jedinců č. 18, 20, 25, 27, 28 a 30 od společnosti Labrys a novorozence z hradu Rokštejn.

5.5 Porovnávání morfologicky a geneticky získaného pohlaví

U třinácti jedinců, od kterých jsme měli vzorky od společnosti Labrys, jsme měli možnost porovnat výsledky morfologického odhadu pohlaví s námi geneticky určenými výsledky. U dalších pěti námi úspěšně určených jedinců se jednalo o děti, u kterých nebylo morfologické určení pohlaví prováděno, proto nemohlo dojít ani ke srovnání obou metod. U jedenácti ze třinácti porovnávaných jedinců jsme dosáhli shody - tedy v 84% srovnávaných případů. U zbylých dvou jedinců se morfologické a genetické určení pohlaví liší - v případě jedince č. 17. bylo pohlaví morfologicky odhadnuto jako žena, zatímco podle amelogeninu vyšel muž a v případě jedince č. 6 byl výsledek opačný - morfologie ukazovala na muže, zatímco amelogenin na ženu.

5.6 Úspěšnost analýzy aDNA

Celkem se nám podařilo izolovat a analyzovat aDNA u 19 jedinců z celkového počtu 35, tedy u 54% analyzovaných jedinců. Ze zubních vzorků jsme úspěšně izolovali aDNA u 53% jedinců (celkem jsme měli k dispozici zubní vzorky od 30 jedinců, analýza byla úspěšná v 16 případech). U kosterních vzorků jsme úspěšně analyzovali aDNA ve 42% procentech (měli jsme k dispozici kosterní vzorky od 7 jedinců a úspěšná byla analýza ve 3 případech). Ve dvou případech jsme měli k dispozici zubní i kosterní vzorek od téhož jedince - aDNA se nám podařilo analyzovat pouze v případě jednoho jedince, a to ze vzorku skalní kosti.

5.7 Ověřování výsledků

Po srovnání námi získaných výsledků s STR profily osob, které mohly případně vzorky kontaminovat - pracovníky laboratoře a antropology, kteří se vzorky manipulovali, jsme vyloučili tyto osoby jako možné původce kontaminace. Pouze v jednom případě jsme našli shodu s mým STR profilem. Vzorek, který byl takto kontaminován byl z dalších analýz vyloučen a nebyl zahrnut do konečného vyhodnocení výsledků.

STR profily, se kterými jsme srovnávali námi získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách 17A, 17B, 18 a 19 v příloze č. 9.2. Ani v případě srovnání výsledků s národní

databází DNA, obsahující všechny STR profily získané ze vzorků, které prošly analýzou na KÚP, jsme nezískali shodu. Výsledné STR profily tedy nejsou kontaminovány DNA pocházející z recentních zdrojů DNA.

Při ověřování možnosti kontaminace exogenní DNA jsme u kosti č. 1 z pohřebiště Blučina získali amplifikací kitem PowerPlex ESI pouze profil, který byl již dříve z této kosti izolován. Tento profil nevykazoval ani při amplifikaci kity určenými pro analýzu Y - STR žádné známky kontaminace mužskou DNA - nedošlo k žádné amplifikaci alel nacházejících se na chromozomu Y.

6 Diskuse

6.1 Dekontaminační opatření

Při práci se vzorky obsahujícími aDNA jsme dodržovali již dříve doporučené postupy pro zabránění vzniku kontaminace cizorodou DNA. Tato kontaminace se nám vyskytla pouze jednou - kontaminace mou DNA - vzorek byl okamžitě vyrazen a již s ním nebylo dále manipulováno.

Pro ověření možného rizika kontaminace dřívější manipulací na místě nálezů ostatků jsme ověřovali možnost kontaminace při mytí a čištění ostatků. Z námi provedeného pokusu vyplynulo, že jsme veškerou kontaminující novodobou DNA odstranili omytím v tekoucí vodě a následným důkladným obroušením povrchu. Nepotvrdila se nám publikovaná data (Gilbert et al., 2005; Gilbert et al., 2006; Sampietro et al., 2006), kde byl krok čištění a mytí vzorku označen jako nejvíce rizikový z hlediska možné kontaminace vzorků recentní DNA.

6.2 Izolace DNA

Při testování metod vhodných pro izolaci aDNA jsme jako nejvhodnější metodu označili dekalifikaci směsí EDTA/SDS/proteináza K s následnou izolací a purifikací kitem MinElute™ PCR Purification Kit, založeném na principu izolace adsorpcí DNA na silikát. Tento postup izolace byl jako nejvýnosnější označen i v odborných člancích, které jsou publikovány v současné době (Lee et al., 2010). Tento způsob izolace se ukázal nejen jako velice výhodný svou vysokou výnosností DNA oproti jiným typům izolace, ale i jako velice dobrý způsob jak vzorek zároveň purifikovat (Lee et al., 2010). Oproti původnímu popsanému protokolu (Yang et al., 1998) jsme při naší práci zvýšili množství odebíraného supernatantu obsahujícího aDNA z původních 500 μ l na maximální možné odebíratelné množství (cca 800 - 900 μ l). Tímto krokem jsme zvýšili pravděpodobnost izolace aDNA a množství, které bylo ze 70 - 100 mg vzorku izolováno.

Podle informací od výrobce by kolonka používaná pro izolaci měla být schopna ve své membráně zadržet fragmenty dlouhé 70 bp - 4 kbp (MinElute Handbook). Spodní hranice 70 bp plně vyhovuje námi prováděným analýzám, kde má teoretický nejkratší

amplifikovaný produkt délku 85 nukleotidů. Kratší fragmenty DNA jsou z tohoto důvodu pro amplifikaci nevyužitelné a proto nám nevdají jejich nezachycení v membráně kolonky. Výrobce také udává návratnost DNA při eluci z kolonky okolo 80%. Tento fakt může být důvodem neúspěchu v případech, kdy mohlo být ve vzorku přítomno jen velice malé množství DNA. Na tuto skutečnost je nutné se zaměřit v budoucích studiích, aby již nedocházelo k tak velkým ztrátám aDNA při její izolaci a purifikaci.

Koncentrace směsi PB pufru a supernatantu získaného dekalifikací vzorku pomocí koncentrátorů AmiconUltra se v našem případě neukázala vzhledem ke ztrátě části DNA, na rozdíl od práce Vaňka (Vaněk et al., 2009) jako přínosná. V případě práce s recentními vzorky, kde je předpoklad většího množství, DNA by tento krok mohl urychlit celou analýzu. Obecně ale tento krok nelze doporučit pro práci se vzorky, kde je předpoklad velice malého množství vysoce degradované DNA.

Izolace suspenzí Chelex 100 nedávala při testování pozitivní výsledky, proto nebyla při izolaci aDNA využita. I přes to, že v publikovaných článcích (Newman et al., 2002; Woodward et al., 1994) dosáhli vysoké výtěžnosti DNA, v případě námi provedené izolace DNA na zkušebních vzorcích se účinnost těchto protokolů nepotvrdila. Příčin může být hned několik - DNA nebyla ve vzorcích vůbec přítomna, množství DNA obsažené v těchto vzorcích bylo příliš malé, nebo nedošlo během izolace k uvolnění DNA. Vzhledem k úspěšnosti izolačního protokolu s využitím kitu MinElute™ PCR Purification Kit a za použití přibližně trojnásobně menšího množství vzorku se první možnost jeví k uvolnění DNA do roztoku vůbec nedošlo. Tomuto faktu by nasvědčovalo i to, že při izolaci DNA z kosterního/zubního materiálu dochází k dekalifikaci a uvolňování DNA průměrně během 12 - 24 hod. V případě jednoho z použitých protokolů (Woodward et al., 1994) nebyl čas na dekalifikaci a uvolnění DNA dostatečně dlouhý, navíc nebyla použita proteináza K, která by měla během izolace naštěpit proteiny a pomoci tak uvolňovat DNA ze vzorku. U druhého protokolu (Newman et al., 2002) by časový úsek použitý pro dekalifikaci měl již být dostatečně dlouhý, nebyla však použita obvyklá teplota inkubace okolo 55 - 56°C, ale teplota zvýšená na 65°C a opět nebyla do protokolu zahrnuta proteináza K, což mohlo způsobit neúspěch.

6.3 Amplifikace DNA

Při amplifikaci se jako nevhodnější z hlediska množství obdržovaných STR lokusů ukázala kombinace komerčního kitu MiniFiler, který amplifikuje 8 autozomálních miniSTR lokusů a námi připravené miniY pentaplexy. Doplňkové analýzy jsme prováděli komerčními kity ESX, ESI pro amplifikaci autozomálních STR a Yfiler a PowerPlex Y, pro amplifikaci STR nalézajících se na chromozomu Y. Amplifikace každého vzorku byla vždy opakována nejméně dvakrát. Při amplifikaci se nám stávalo, v souladu s publikovanou literaturou (Pääbo et al., 1989), že byly amplifikovány především kratší lokusy DNA v délce do 300 bp. U lokusů pohybujících se svým rozsahem v této oblasti (250 - 300 bp) často docházelo k alelickému dropoutu. Z tohoto důvodu byla každá amplifikace, především komerčními kity několikrát opakována, abychom mohli vyloučit přítomnost artefaktů vznikajících během amplifikace.

6.4 Hodnocení výsledků

Jak již bylo zmíněno výše, každá izolace a amplifikace byla pro verifikaci opakována nejméně dvakrát. Všechny námi zveřejněné výsledky prošli vzájemným porovnáváním se získanými profily antropologů a kolegů v laboratoři, abychom vyloučili případnou kontaminaci. Získané STR profily analyzovaných jedinců nebyly navzájem shodné a neshodovali se ani s STR profily pracovníků laboratoře. Z těchto důvodů jsme vyloučili jak možnost cross kontaminace mezi vzorky navzájem, tak i možnost kontaminace cizorodou DNA.

Ve dvou případech jsme měli možnost porovnat účinnost námi používaného izolačního protokolu na kosterní (kost skalní) i zubní vzorek téhož jedince. V jednom z těchto případů (jedinec č. 17) byla analýza aDNA z kosterního vzorku úspěšná. Tato skutečnost je v rozporu s častým a jistě oprávněným tvrzením, že jsou zubní vzorky, vzhledem k ochranně sklovinou (Oota et al., 1995), lepším zdrojem aDNA (Gilbert et al., 2006; Sampietro et al., 2006). Naopak jsme tímto prokázali, že množství zachovalé aDNA se může lišit, především vlivem okolního prostředí (které neustále působí na ostatky), i v rámci jednotlivých částí skeletu daného jedince. Toto tvrzení samozřejmě platí i pro

jedince nalézající se na jednom pohřebišti, případně v jednom hrobě (jak můžeme vidět například u jedinců č. 16 a 19).

Při zpětném porovnávání výsledků získaných aDNA analýzou ze zubního vzorku jedince č. 17 jsme zjistili, že i v tomto případě byl získán částečný profil DNA, odpovídající profilu získanému později ze vzorku kosti. Tento profil však nebyl dostatečně kvalitní na to, abychom ho považovali za úspěšně analyzovaný vzorek. Najdou se však i práce, publikující výsledky, které jsou již na první pohled výsledkem artefaktů při amplifikaci, případně vnější kontaminace. Jako příklad můžeme uvést práci publikovanou v roce 2005 (Ricaud et al., 2005), ve které jsou publikovány výsledky několika izolací a amplifikací téhož vzorku - např. u první izolace jednoho vzorku v případě STR vWA amplifikovali kitem AmpFlSTR[®] Profiler Plus alelu 14, v případě druhé izolace alely 11/12/13/17, v případě STR D21S11 z první izolace amplifikovali alelu 29, z izolace druhé alelu 30.2 a z třetí izolace alelu 29.1. Z těchto publikovaných údajů je jasné, že s nejedná o výsledky, které by byly věrohodné.

Námi prováděná analýza byla úspěšná celkem u 54% jedinců. V ostatních případech se nám nepodařilo opakovaně z několika izolací získat shodné výsledky, z tohoto důvodu zde nejsou tyto částečné profily uváděny jako úspěšně analyzované. Dostatečný počet Y STR lokusů po určení haploskupiny jsme získali u 12 jedinců mužského pohlaví. Nezjistili jsme žádnou haploskupinu, která by se na našem území běžně nevyskytovala.

Úspěšnost s jakou jsme analyzovali vzorky obsahující aDNA jsme v porovnání s jinými autory hodnotili jako velice uspokojivou. Například Ricaud (Ricaud et al., 2005) nezískal analýzou 10 jedinců ze 4. - 10. století n.l. téměř žádné výsledky při analýze jaderné aDNA. Stone a Stoneking (Stone and Stoneking, 1999) dosáhli pouze 15% úspěšnosti při analýze jaderné aDNA u jedinců ze 700 let starého pohřebiště. Götherström (Götherström et al., 2002) izoloval jadernou aDNA ve 29% případů (12 ze 42), stáří jím používaných vzorků se pohybuje od doby železné až po 750 let n. l. Naproti tomu například Keyser-Tracqui (Keyser-Tracqui et al., 2003) dosáhla téměř 80% úspěšnosti analýzy jaderné aDNA u jedinců přibližně 2000 let starých a Vaněk (Vaněk et al., 2009) měl při izolaci jaderné aDNA u jedinců ze 7. století n. l. 100% úspěšnost. Takováto úspěšnost je však při analýze jaderné aDNA spíše výjimkou.

Zvýšení úspěšnosti bychom mohli dosáhnout zařazením analýzy mtDNA, která se v buňkách vyskytuje v mnohonásobně větším množství než DNA jaderná. Ve studiích, které byly prováděny se úspěšnost izolace mtDNA často pohybuje nad 70% (Stone and Stoneking, 1999). Jistou nevýhodou je však pouze možnost zařazení jedince do určité mtDNA haploskupiny. Na rozdíl od analýzy jaderné DNA je při analýze mtDNA určení příbuznosti (vzhledem ke způsobu dědičnosti), možné jen po mateřské linii.

Shodu morfologického a geneticky určeného pohlaví jsme zaznamenali v jedenácti srovnávaných případech, neshodu ve dvou. Tato neshoda by mohla v případě jedince č. 6, kdy jsme geneticky určili ženu, vzniknout vlivem alelického dropoutu alely Y. Tuto možnost jsme ale vyvrátili pokusem amplifikovat tento vzorek pomocí miniY pentaplexů, kdy nedošlo k amplifikaci žádné alely nacházející se na chromozomu Y.

7 Závěr

Během zpracovávání této práce se nám úspěšně podařilo analyzovat recentní DNA ze všech čtyř zkušebních vzorků a aDNA u devatenácti jedinců z celkového počtu třicetipěti, které jsme měli při zpracovávání práce k dispozici. Těchto výsledků jsme dosáhli izolací komerčně dostupným kitem MinElute™ PCR Purification Kit založeném na principu izolace adsorpcí DNA na silikát. Vzhledem k rozdílnému stáří jedinců a místu pohřbení jsme tuto úspěšnost vyhodnotili jako velice uspokojivou. Úspěšnost extrakčního protokolu u zubních vzorků činila 53%, u vzorků z kostí 42%. Nemůžeme však plně porovnat účinnost izolace na vzorky pocházející ze zubní nebo kosterní tkáně, jelikož jsme zpracovávali celkem třicet zubních vzorků a jen 7 vzorků kostí.

Při amplifikaci izolátů z historického materiálu se nám velice osvědčilo použití miniSTR lokusů - jak komerčních kitů, tak námi namíchaných miniY pentaplexů. Pokud se nacházely v izolátu fragmenty DNA v rozmezí od 100 do 300 bp v jinak neporušeném stavu, byli jsme schopni je amplifikovat.

Nejvyšší úspěšnost jsme předpokládali u vzorků pocházejících ze 17. století, což se během práce nepotvrdilo, z celkového počtu sedmi jedinců jsme úspěšně analyzovali jen tři - 37,5% úspěšnost. O mnoho úspěšnější jsme ale byli v případě vzorků z 12. (lokalita Břevnov) a 10. - 12. století (lokalita Zbuzany), kde jsme dosáhli úspěšnosti 100% a 60 %. Největším úspěchem celé práce je analýza aDNA z kosti, která je datována do doby laténské, tedy přibližně 2200 staré. Izolát aDNA z této kosti byl velice kvalitní a podařilo se nám amplifikovat všech devatenáct námi analyzovaných autozomálních STR lokusů a určit pohlaví. Vzhledem k tomu, že se jedná o ženu, další analýzy již neprobíhaly.

Tato metoda se díky těmto výsledkům ukázala natolik úspěšnou, že byla zavedena i do forenzní praxe na KÚP. Důležité je ale neustálé zdokonalování metod celé analýzy jak recentní tak aDNA, které nám mohou pomoci zvýšit pravděpodobnost zachycení i minimálního počtu molekul DNA. Vzhledem k rychlosti vývoje nových metod, je téměř jisté, že se během několika let (možná ještě letos), objeví metoda, díky které bude možné úspěšně analyzovat větší procento zkoumaných jedinců.

8 Seznam použité literatury

Albin, M., Weinberger, R., Sapp, E. and Moring, S. (1991). Fluorescence detection in Capillary electrophoresis: Evaluation of derivatizing reagents and techniques. *Analyt. Chem.* 63, 417-422.

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. and Young, I. G. (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465

Anderung, C., Persson, P., Bouwman, A., Elburg, R. and Götherström. (2008). Fishing for ancient DNA. *For Sci Int: Genetics* 2, 104-107.

Andréasson, H. (2005). Sensitive Forensic DNA analysis, Application of Pyrosequencing and Real-time PCR Quantification. Acta Universitatis Upsaliensis.

Anoruo, B., Van Oorschot, R., Mitchell, J. and Howells, D. (2007). Isolating cells from non-sperm cellular mixtures using the PALM[®] microlaser micro dissection system. *Forensic Sci Int*, 173, 93-96.

Anslinger, K., Weichhold, G., Keil, W. and Bayer, B. (2001). Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114, 194-196.

Atkinson, M. R., Deutscher, M. P., Kornberg, A., Russell, A. F. and Moffatt, J. G. (1969). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXXIV. Termination of Chain Growth by a 2', 3' - deoxyribonucleotide. *Biochemistry* 8, 4897-4904.

Ayub, Q., Mohyuddin, A., Qamar, R., Mazhar, K., Zerjal, T., Mehdi, S. Q. and Tyler-Smith, C. (2000). Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res* 2, e8.

Bar, W., Brinkmann, B., Lincoln, P., Mayr, W.R. and Rossi, U. (1994). DNA recommendations--1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. *Int J Leg Med* 107, 159-160.

- Bender, K., Schneider, P. M. and Rittner, Ch.** (2000). Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *For Sci Int* 113, 103-107.
- Bromová, M.** (2003). Molekulárně biologické stanovení pohlaví u lidských jedinců archeologického naleziště v Žatci. 97 s. *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Brouček.*
- Butler, J. M., Schoske, R., Vallone, P. M., Kline, M. C., Redd, A. J. and Hammer, M. F.** (2002). A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. *For Sci Int* 129, 10-24.
- Butler, J. M., Shen, Y. and McCord, B. R.** (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48 1054-1064.
- Butler, J. M.** (2005) Forensic DNA typing - biology, technology and genetics of STR markers, 2nd edition. *Elsevier Academic Press, 241-299.*
- Coble, M. D. and Butler, J. M.** (2005). Characterization of new MiniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 50, 43-53.
- Doberstein, R. C., Huppertz, J., von Wurmb-Schwark, N. and Ritz-Timme, S.** (2008). Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *For Sci Int* 179, 181-191.
- Davoren J., Vaněk D., Konjhodzic R., Crews J., Huffine E., Parsons TJ.** (2007). Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 48, 478-485.
- Edson, S. M., Ross, J. P., Coble, M. D., Parsons, T. J. and Barritt, S. M.** (2004) Naming the dead - conforming the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Rev*
- Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, C. L., Smith, P. and Oppenheim, A.** (1995). Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles, *Gene* 167, 327-332.

- Faerman, M., Bar-Gal, G. K., Filon, D., Greenblatt, C. L., Stager, L., Oppenheim, A. and Smith, P.** (1998). Determining the sex of infanticide victims from the Late Roman era through ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 25, 861-865.
- Foran, D. R.** (2006). Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *J Forensic Sci* 51, 766-770.
- Friedberg, EC., Walker, GC., Siede, W.** (1995). DNA repair and mutagenesis. *American Society for Microbiology*, 698 pgs.
- Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Hansen, A. J., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N. and Cooper, A.** (2003a). Distribution patterns of post-mortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72, 32-47.
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N. and Cooper, A.** (2003b). Characterisation of genetic miscoding lesions caused by post-mortem damage. *Am J Hum Genet* 72, 48-61.
- Gilbert, M. T. P., Rudbeck, L., Willerslev, E., 2005; Hansen, A. J., Smith, Colin., Penkman, K. E. H., Prangenberg, K., Nielsen-Marsh, C. M., Jans, M. E., Arthur, P., Lynnerup, N., Turner-Walker, G., Biddle, M., Kjølbye-Biddle, B., and Collins, M. J.** (2005). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archeol Sci* 32, 785-793.
- Gilbert M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Turner-Walker, G. and Collins, M.** (2006). Insights into processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous source of DNA. *Int J Osteoarcheol* 16, 156-64.
- Golenberg, E. M., Giannassi, D. E., Clegg, M. T., Smiley, C. J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski, G.** (1990). Chloroplast DNA from a Miocene Magnolia species. *Nature* 344, 656-658.
- Götherström, A., Collins, M.J., Angelbjörn, A. and Lidén, K.** (2002). Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, 44, 395-404.
- Griffin, R. C., Moody, H., Penkman K. E. H. and Collins, M. J.** (2008). The application of amino acid racemization in the acid soluble fraction of enamel to the estimation of the age of human teeth. *For Sci Int* 175, 11-16.

- Hagelberg, E., Sykes, B and Hedges, R.** (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342, 485.
- Hagelberg, E., Bell, L. S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S. J., Clegg, J. B., Hummel, S., Brown, T. A. and Ambler, R. P.** (1991) Analysis of ancient bone DNA: Techniques and applications. *Philosophical Transaction: Biological Sciences* 333, 399-407.
- Hagelberg, E. Clegg, J. B.** (1991). Isolation and characterization of DNA from archeological bone. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 244, 45-50.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R. H. and Pääbo, S.** (1996) The retrieval of ancient human DNA sequence. *Am J Hum Genet* 59, 368-376.
- Hänni, C., Brousseau, T., Laudet, V., and Stehelin, D.** (1995). Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acids Res* 2, 881-882.
- Hanson, E. K. and Ballantyne J.** (2007). An ultra-high discrimination Ychromosome short tandem repeat multiplex DNA typing system. *PLoS One* 2, e688
- Hill C. R., Kline, M. C., Coble, M. D. and Butler, J. M.** (2008). Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. *J Forensic Sci* 53, 73-80.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A. and Wilson, A. C.** (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282-284.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R.** (1992). Simultaneous amplification and detection of specific cDNA sequences. *Biotechnology* 10, 413 - 417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026 - 1030 .
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, S., von Haeseler, A. and Pääbo, S.** (2001a). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* 29, 4793-4799.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. and Pääbo, S.** (2001b). Ancient DNA. *Nature Rev Genet* 2, 353-360.

- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. and Gelfand, D.H.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7276 - 7280.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M. and Pääbo, S.** (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24, 1304-1307.
- Höss M. and Pääbo S.** (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21, 3913-3914.
- Isenberg, A. R. and Moore, J. M.** (1999). Mitochondrial DNA analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Sci Commun* 1.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L.** (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79.
- Jobling, M. A. and Tyler-Smith, C.** (1995). Fathers and sons - the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 11, 449-456.
- Kalmár, T., Bachrati, C. Z., Marcsik, A and Rasko, I.** (2000). A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Nucleic Acids Res* 28, e67.
- Kayser, M., Cagliá, A., Corach, D., Fretwell, N., Gehrig, C and 25 authors.** (1997). Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 110, 125-133.
- Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E. and Ludes, B.** (2003). Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73, 247-260.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M. and Pääbo, S.** (1997). Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90, 19-30.
- Lee, H. Y., Kim, N. Y., Park, M. J., Yang, W. I. and Shin, K.-J.** (2008). A modified mini-primer set for analyzing mitochondrial DNA control region sequence from highly degraded forensic samples. *Biotechniques* 44, 555-558.

- Lee, H. Y., Park, M. J., Kim, N. Y., Sim, J. E., Yang, W. I. And Shin, K. - J. (2010)** Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *For Sci Int: Genetics; article in press.*
- Lindahl, T. (1993a).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T. (1993b).** Recovery of antediluvian DNA. *Nature* 365, 700.
- Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H.-J., Heizmann, J., Junge, A., Dimo-Simonin, N., Parson, W., Edelman, J., Anslinger, K., Jung, S. and Augustin, C. (2000).** Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int* 113, 97-101.
- Lygo, J. E., Johnson, P. E., Holdaway, D. J., Woodroffe, S., Kimpton, C. P., Gill, P. Whitaker, J. P. and Clayton, T. M. (1994).** The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Legal Med* 107, 77-89.
- MinElute® Handbook for PCR Purification Kit,** dostupný online na www.qiagen.com
- Mörnstad, H., Pfeiffer, H., Yoon, C. and Teivens, A. (1999).** Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med* 112, 98-100.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. (1998).** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954 - 962.
- Mulero, J. J., Chang, C. W., Lagacé, R. E., Wang, D. Y., Bas, J. L., McMahon, T. P. and Hennessy, L.K. (2008).** Development and validation of the AmpFISTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. *J Forensic Sci* 53, 838–852.
- Nelson, K. and Melton, T. (2007).** Forensic mitochondrial DNA analysis of 116 casework skeletal samples. *J Forensic Sci* 52, 557-561.

- Newman, M. E., Parboosingh J. S., Bridge, P. J. and Ceri, H.** (2002). Identification of Archaeological Animal Bone by PCR/DNA Analysis. *Journal of Archaeological Science* 29, 77-84.
- Ogino, T., Ogino, H. and Nagy, B.** (1985). Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age at death, *Forensic Sci Int* 29, 259-267.
- Oota, H., Saitou, N., Matsushita, T. and Ueda, S.** (1995). A genetic study of 2 000 years old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am J Phys Anthropol* 98, 133-145.
- Pääbo, S.** (1985). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314, 644-645.
- Pääbo, S.** (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1939-1943.
- Pääbo, S., Higuchi, R. G. and Wilson, A. C.** (1989). Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 264, 9709-9712.
- Pääbo, S. and Wilson, A. C.** (1991). Miocene DNA sequences — a dream come true? *Curr Biol* 1, 45-46.
- Park, M. J., Lee, H. Y., Chung, U., Kang, S.-C. and Shin, K.-J.** (2007). Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons. *Int J Legal Med* 121, 152-157.
- Pfeiffer, H., Steighner, R., Fischer, R., Mörnstad, Yoon, C.-L. and Holland, M. M.** (1998) Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Legal Med* 111, 309-313.
- Poinar, H. N., Höss, M., Bada, J. L. and Pääbo S.** (1996). Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA. *Science* 272, 864-866.
- Poinar, H. N., Hofreiter, M., Spaulding, G. S., Martin, P. S., Stankiewicz, A. B., Bland, H., Evershed, R. P., Possnert, G. and Pääbo, S.** (1998). Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281, 402-406.
- Rennick, S. L., Fenton, T. W. and Foran, D. R.** (2005). The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *J Forensic Sci* 50, 1016-1019.

- Ricaud, F.-X., Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E. and Ludes, B.** (2005). STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *For Sci Int* 151, 31-35.
- Ritz, S., Schütz, H. W. and Peper, C.** (1993). Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin. *Int J Legal Med* 105, 289–293.
- Robin, E. D. and Wong, R.** (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* 136, 507-513.
- Rohland, N. and Hofreiter, M.** (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Biotechniques* 42, 343-352 .
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sampietro, M. L., Caramelli, D., Lao, O., Callafell, F., Comas, D., Lari, M., Agustí, B., Bertranpetit, J. and Lalueya-Fox, C.** (2005). The genetics of the Pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians. *Annals of Human Genetics* 69, 535-548.
- Sampietro, M. L., Gilbert, M. T. P., Lao, O., Caramelli, D., Lari, M., Bertranpetit, J. and Lalueya-Fox, C.** (2006). Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Molecular biology and Evolution* 23, 1801-1807.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry, Proc. Natal. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Satoh, M. and Kuroiwa, T.** (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 196, 137-140.
- Shimora, C. Y., Fielding, Ch. G., Lewis, J. A., Gleisner, M. R. and Dunn, K. N.** (2004). A minimally destructive technique for sampling dentin powder for mitochondrial DNA testing. *J Forensic Sci* 49, 791-795.
- Scholz, M. and Pusch, C.** (1998) Isolation from ancient bone samples using a mixture of Coca-Cola (TM) and gall-soap. *Bulletin der Schweizerischen Gesellschaft für Anthropologie*.

- Schoske, R., Vallone, P. M., Ruitberg, C. M. and Butler, J. M.** (2003). Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem* 375, 333-343.
- Skeidsvoll, J. and Ueland, P. M.** (1995). Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR Green I. *Analytical Biochemistry* 231, 359-365.
- Smith, N. R.** (1995). Accurate size comparison of short tandem repeat alleles amplified by PCR. *BioTechniques* 18, 122 –128.
- Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Cooper, A., Stringer, C. B. and Collins, M. J.** (2001). Neanderthal DNA: not just old but old and cold? *Nature* 10, 771-772.
- Soltis, P. S., Soltis, D. E. and Smiley, C. J.** (1992). An *rbcl* sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress). *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 449-451.
- Steadman, D. W., DiAntonio, L. L., Wilson, J. J., Sheridan, K. E. and Tammariello, S. P.** (2006). The effects of chemical and heat maceration techniques on the recovery of nuclear and mitochondrial DNA from bone. *J Forensic Sci.* 51, 11-17.
- Stone, A. C. and Stoneking, M.** (1998). MtDNA analysis of prehistoric Oneota population: Implications of the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 62, 1153-1170.
- Stone, A. C., Starrs, J. E. and Stoneking, M.** (2001). Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46, 173-176.
- Sutlović, D., Gojanović, M. D. and Andelinovic, S.** (2007). Rapid extraction of human DNA containing humic acid. *Croatia Chemica Acta* 80, 117-120.
- Thomas, M. G., Bradman, N. and Flinn, H. M.** (1999). High throughput analysis of 10 microsatellite and 11 diallelic polymorphisms on the human Y-chromosome. *Hum Genet* 105, 577-581.
- Vaněk, D., Sasková, L. and Koch, H.** (2009). Kinship and Y-chromosome analysis of 7th century human remains: novel DNA extraction and typing procedure for ancient material. *Croat Med J* 50, 286-295.
- Voet D. and Voet J.** (1995) Biochemie. *Victoria, Praha*, 592-595.

Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi R. (1991). Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR - based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506-513.

Whitaker, J. P., Clayton, T. M., Urquart, E. S., Mellica, T. J., Kimpton, C. P. and Gill, P. (1995). Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. *BioTechniques* 18, 670-677.

Wiegand, P. and Kleiber, M. (2001). Less is more--length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int J Legal Med* 114, 285-287.

Willerslev, E. and Cooper, A. (2005) Ancient DNA. *Proc R Soc B* 272, 3-16.

Willerslev, E., Hansen, A. J. and Poinar, H. N. (2004b). Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost. *Trends Ecol Evol* 19, 141-147.

Woodward, S. R., King, M. j., Chiu, N. M., Kuchar, M. J. and Griggs, C. W. (1994). Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *Genome Res.* 3, 244-247.

Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. C. and Saundres, S. R. (1998) Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *Am J Phys Antropol* 105, 53-543.

Yoshida, K., Sekiguchi, K., Kasai, K., Sato, H., Seta, S., and Sensabaugh, G. F. (1997). Evaluation of new primers for CSF1PO. *Int J Legal Med* 110, 36-38.

Young D.L., Huyen Y. and Allard M.W. (1995). Testing the validity of the cytochrome b sequence from Cretaceous period bone fragments as dinosaur DNA. *Cladistics*, 11, 199-209.

Použité internetové zdroje:

www.onlinekolagen.pl

www.stormfront.org

www.qiagen.com

www.appliedbiosystems.com

www.cstl.nist.gov/strbase/miniSTR.htm

9 Přílohy

9.1 Protokoly používané na KÚP k izolaci DNA z kostí a zubů

Protokol používaný na KUP pro izolaci DNA z kostí a zubů I

- Ke kostní pilinám vzniklým drcením/řezem očištěné kosti přidat do 50 ml centrifugační zkumavky 40 ml 0,5 M EDTA a nechat na rotační třepačce 24 hod při 4°C.
- Centrifugace 15 min při 2 000 RCF. Odsát supernatant.
- Přidat 40 ml extrakčního pufru EDTA-SARCO pH 8,0 (pro odstranění přebytečného Ca²⁺).
- Centrifugace 15 min při 2 000 RCF. Odsát supernatant.
- Přidat 10 ml SEB pufru, 400 µl 1 M DTT a 100 µl proteinázy K (20 mg/ml), promývat na rotační třepačce přes noc při 56°C.
- K roztoku přidáme stejný objem směsi fenol:chloroform:isopropylalkohol v poměru (100:100:4) a intenzivně protřepeme.
- Emulzi přeneseme do zkumavky se stočeným PLG (Phase Lock Gel; Eppendorf)
- Centrifugace 5 min při 1 500 g.
- Vodnou fázi přeneseme do koncentrátoru Centricon 30 (Millipore).
- Centrifugace 20 min při 1 000 RCF.
- Obrátíme filtrační vložku Centriconu a přidáme cca 200 µl H₂O.
- Centrifugace 2 min při 1 000 RCF.

Protokol používaný na KUP pro izolaci DNA z kostí a zubů II (Bromová, 2003)

- 0,5 g kostního prášku se smíchá s 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) - nechá se 2 dny na rolleru při pokojové teplotě.
- Přidá se 25 μ l (20 mg/ml) proteinázy K nechá se další den na rolleru.
- Centrifugace 10 min při 4 000 g.
- Supernatant (cca 0,5 ml) se přenesse do nových zkumavek 1,5 ml zkumavek (Eppendorf).
- Ke vzorku se přidá 20 μ l silikátu a 0,5 ml 4 M GuSCN (pH cca 7,0).
- DNA se nechá navazovat na povrch silikátu 2 hodiny při pokojové teplotě.
- Centrifugace 40 s při 13 000 g.
- Peleta se omyje dvakrát v 70 % etanolu a supernatant se odsaje.
- Peleta se jedenkrát omyje v acetonu a supernatant se odsaje.
- Peleta se suší při 56°C.
- DNA se uvolní do 75 μ l sterilní vody (s vodou se inkubuje při 56°C 15 minut, po každých pěti minutách se protřepe na vortexu).
- Po centrifugaci 2 min při 13 000 g se odebere cca 72 μ l do nové zkumavky, ve které se uchovává při -20°C.

9.2 Eliminace: STR profily

ESI-17	001	Kost č. 1	Identifiler	002
Amelogenin	XX	XX	Amelogenin	XY
D3S1358	14	15/16	D5S818	9/12
TH01	7/9.3	7/9	FGA	20/21
D21S11	28	28/30	D8S1179	13/14
D18S51	14/17	12/17	D21S11	29/30
D10S1248	15	13/14	D7S820	10
D1S1656	17.3	12/17	CSF1PO	10
D2S1338	17/23	17/19	D3S1358	13/15
D16S539	11/12	8/12	TH01	7/9.3
D22S1045	11/17	14/16	D13S317	11/14
vWA	14/18	16/17	D16S539	11/13
D8S1179	13	13	D2S1338	20/23
FGA	22/26	20/26	D19S433	12/14
D2S441	11/14	11/11.3	vWA	16/17
D12S391	19/19.3	15/18	TPOX	8
D19S433	13	15	D18S51	12/13
SE33	17	15/22.2	-----	-----

Tabulka č. 17 A Srovnání STR profilů získaných analýzou DNA bukálního stěru 001 a kosti č. 1. Amplifikace probíhala kitem PowerPlex ESI-17. Vyznačeny jsou společné alely.

Tabulka č. 17 B STR profil získaný amplifikací bukálního stěru 002 kitem Identifiler.

PowerPlex 16	003	004	005	006	007	008	009	010
D3S1358	14/18	16/17	15/17	16	15/17	17/18	16/18	16
TH01	7/9.3	7/8	6/9.3	7/9.3	9.3	9/9.3	6/8	9.3
D21S11	30.2/	30	30/30.2	29/31.	30	30/32.2	30	30
D18S51	15	15/21	13/14	12/13	12/20	16/18	13/14	13/16
Penta E	5/13	14	11/20	10/12	7/10	7/15	12/15	12/13
D5S818	11/12	10/12	11/12	12	13	12	10/12	12/13
D13S317	8/11	11/14	11/12	11/12	12	11	8/11	9/12
D7S820	8/10	9/10	10/12	10/12	10/11	11/12	8/9	8/12
D16S539	9	13	11/12	12	11/12	11	11/13	9/11
CSF1PO	11/12	11	11	10/13	10/11	11/12	9/10	11/12
Penta D	11/12	11/13	12/13	9	10/12	12/13	10/12	13/14
AMELO	XY	XY	XY	XX	XX	XX	22/25	XX
vWA	17/18	17/18	17/18	14/16	17/18	16/18	18	15/18
D8S1179	12/13	14/17	10/11	11/13	13/14	12/15	14	10/15
TPOX	8/12	8/10	8/11	8/11	11	10/11	8	11
FGA	19/21	21	19/21	21/25	21/27	22/24	22/25	18/22

Tabulka č. 18 Autozomální STR profily porovnáváné s výsledky analýzy aDNA.

YFiler	011	012	013	014	015
DYS456	16		16	15	14
DYS389I	13	14	13	13	14
DYS390	24	24	23	24	22
DYS389II	30	31	29	29	31
DYS458	17		17	19	16
DYS19	16	16	14	14	15
DYS385a/b	11/14	13/14	11/15	13/15	14/15
DYS393	13	13	13	12	15
DYS391	10	10	12	9	10
DYS439	12	11	12	12	11
DYS635	24		23	20	24
DYS392	11	13	13	11	12
Y GATA H4	13		12	12	10
DYS437	14	14	15	15	14
DYS438	11	11	12	9	10
DYS448	20		19	19	20

Tabulka č. 19 Y-STR profily porovnáváné s výsledky analýzy aDNA.

9.3 Kvantifikace - množství DNA ve vzorku

vzorek	Výsledky kvantifikace (hodnota C _t)	Predikované množství DNA ve vzorku (ng/μl)
Zub 5	36,08; 36,76	0,038
Zub 6	36,34; 36,21	0,042
Zub 8	34,34; 34,33	0,147
Zub 12	35,00; 34,89	0,099
Zub 13	31,43; 31,68	0,899
Zub 14	30,68; 30,89	1,481
Zub 15	35,13; 34,90	0,095
Zub 16	28,51; 28,43	6,654
Zub 17	35,23; 35,08	0,087
Zub 18	35,59; 35,07	0,078
Zub 20	31,22; 31,61	0,985
Zub 23	33,21; 32,71	0,361
Zub 25	31,29; 31,68	0,940
Zub 27	37,70; 36,68	0,023
Zub 28	34,52; 34,96	0,113
Zub 29	32,22; 32,10	0,607
Zub 30	35,13; 35,62	0,075
Kost 1	34,15; 34,01	0,174
Rokštejn	35,71; 34,65	0,085

Tabulka č. 20 Výsledné hodnoty kvantifikace u úspěšně analyzovaných vzorků.

Výsledné hodnoty u vzorků, které nebyly úspěšně analyzovány nejsou v tabulce č 20 uváděny, jejich hodnota Ct se pohybovala mezi 38 a 40 (maximální počet cyklů), tzn. predikované množství DNA bylo 0, 014 ng/ul a nižší.

Predikované množství DNA ve vzorku jsme vypočítali podle rovnice:

$$\text{koncentrace} = 7 * 10^8 * e^{-0,6488 * C_t} \text{ [ng/}\mu\text{l]}$$

9.4 Family Tree DNA - srovnání výsledků

Díky navázané spolupráci s projektem Genebáze jsme měli možnost zaslat tři vzorky - izolát DNA jedince č. 5, 14 a 16 do laboratoře Family Tree DNA (FTDNA) do USA.

V této laboratoři se pokusili o test celkem 56 Y-STR lokusů. Izoláty jsem před transportem umístili do sterilních 1,5 ml zkumavek a nechali je odpařit do sucha ve vakuové odparce - došlo k odpaření pouze tekutiny, DNA zůstala na dně zkumavky. V USA byly poté takto odpařené izoláty opět resuspendovány a podrobeny analýze chromozomu Y.

U vzorku č. 5 bylo získáno celkem 28 Y-STR, tedy přesně jedna polovina z analyzovaného počtu. V případě jedince č. 14 bylo získáno celkem 30 Y-STR. Nejmenší počet 13 Y-STR získali pracovníci laboratoře (FTDNA) u jedince č. 16. Získaná data v mnohém předčila naše očekávání a to především z důvodu pravděpodobné velké fragmentace materiálu a zaměření laboratoře především na práci s buklálními stěry. Získané výsledky byly následně srovnány s výsledky našimi. Při srovnávání jsme narazili na dvě neshody u jedince č. 5 - v lokusu DYS391 jsme v našem případě získali opakovaně alelu 11, v případě laboratoře FTDNA byla získána alela 10. O jednu alelu kratší amplicon získali v FTDNA i v případě lokusu DYS438 (FTDNA alela 11, naše výsledky alela 12). Tato nesrovnalost mohla vzniknout například tím, že mohly být použity odlišné primery, které nasedají na jiný úsek DNA. V případě zbylých Y-STR, které se podařilo amplifikovat v obou laboratořích se již žádná další neshoda nevyskytuje. Porovnání všech úspěšně amplifikovaných Y-STR je popsáno v tabulce č. 21.

Zub č. 14	FTDNA	NV	Zub č.16	FTDNA	NV	Zub č. 5	FTDNA	NV
DYS19	-	16	DYS19	-	16	DYS19	-	14
DYS389I	13	13	DYS389I	-	13	DYS389I	13	13
DYS389II	29	29	DYS389II	-	-	DYS389II	-	29
DYS390	25	25	DYS390	-	25	DYS390	-	23
DYS391	10	10	DYS391	-	10	DYS391	10	11
DYS392	-	11	DYS392	-	-	DYS392	-	13
DYS393	13	13	DYS393	-	13	DYS393	13	13
DYS385a,b	-	11/14	DYS385a,b	-	11/14	DYS385a,b	-	11/14
DYS437	-	14	DYS437	-	14	DYS437	-	15
DYS438	11	11	DYS438	11	11	DYS438	11	12
DYS439	11	11	DYS439	-	12	DYS439	12	12
DYS472	8	-	DYS472	8	-	DYS472	8	-
DYS590	8	-	DYS590	8	-	DYS590	8	-
DYS537	11	-	DYS537	12	-	DYS537	10	-
DYS531	11	-	DYS531	11	-	DYS531	11	-
DYS460	11	-	DYS460	-	-	DYS460	10	-
Y-GATA-H4	12	12	Y-GATA-H4	-	-	Y-GATA-H4	11	11
DYS456	17	17	DYS456	-	-	DYS456	16	16
DYS576	18	-	DYS576	-	-	DYS576	14	-
YCAII	19/23	-	YCAII	19/19	-	YCAII	19/23	-
CDY	34/34/3	-	CDY	-	-	CDY	38/39	-
DYS607	8?	-	DYS607	-	-	DYS607	15	-
DYS458	16	16	DYS458	16	16	DYS458	17	17
DYS459	9/10	9/10	DYS459	9/10	9/10	DYS459	9/10	9/10
DYS455	11	-	DYS455	-	-	DYS455	11	-
DYS454	11	-	DYS454	-	-	DYS454	-	-
DYS464	12//15	-	DYS464	16?	-	DYS464	15	-
DYS557	15	-	DYS557	-	-	DYS557	16	-
DYS450	8	-	DYS450	-	-	DYS450	-	-
DYS413	21,22	-	DYS413	-	-	DYS413	23/26	-
DYS481	25	25	DYS481	25	25	DYS481	24	24
DYS436	12	-	DYS436	12	-	DYS436	12	-
DYS490	-	-	DYS490	12	-	DYS490	12	-
DYS425	-	-	DYS425	12?	-	DYS425	-	-
DYS520	21	-	DYS520	-	-	DYS520	20	-
DYS487	13	-	DYS487	-	-	DYS487	-	-
DYS448	-	20	DYS448	-	20	DYS448	-	20
DYS635	-	23	DYS635	-	23	DYS635	-	23
DYS447	-	23	DYS447	-	23	DYS447	24	24
DYS444	-	14	DYS444	-	14	DYS444	12	12
DYS640	-	-	DYS640	-	-	DYS640	11	-
DYS448	-	-	DYS448	-	-	DYS448	-	19

Tabulka č. 21 Porovnání získaných výsledků analýzy Y chromozomu u jedinců č. 14, 16 a 5. FTDNA = laboratoř Family Tree DNA, NV = námi získané výsledky. Nesrovnalosti při amplifikaci stejných lokusů v případě jedince č. 5 jsou označeny modře.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1 Údaje o jedincích z pohřebišť v Praze a okolí poskytnuté společností Labrys.

Tabulka č. 2 Označení vzorků jedinců pocházejících z Moravy, datace kosterních ostatků.

Tabulka č. 3 Protokol použitý pro drcení kostních/zubních vzorků.

Tabulka č. 4 Sekvence amplifikované kity Quantifiler Human a Quantifiler Duo.

Tabulka č. 5 Sekvence a značení forward primerů použitých v miniY pentaplexu I a miniY pentaplexu II.

Tabulka č. 6 Koncentrace primerů používaných v miniY pentaplexu I a miniY pentaplexu II.

Tabulka č. 7 Porovnání výsledků získaných po izolaci dříve používanou metodou a izolací pomocí kitu Post PCR Purification MinElute kit a amplifikačním kitem MiniFiler.

Tabulka č. 8 Upravená koncentrace primerů pro DYS438 a DYS426 v miniY pentaplexech I a II.

Tabulka č. 9 Porovnání množství DNA po izolaci bez použití koncentrátoru AmiconUltra a s jeho použitím (jedná se o izolát z femuru novorozence z hradu Rokštejn).

Tabulka č. 10 Výsledné profily jedinců č. 5, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 23, 25, 27, 28, 29 a 30 od společnosti Labrys, novorozence z hradu Rokštejn a kosti č. 1 z naleziště Blučina, získané po amplifikaci kitem MiniFiler.

Tabulka č. 11 Výsledky amplifikace kity ESX a ESI u jedinců č. 5, 8, 12, 13, 15, 18 a 20.

Tabulka č. 12 Výsledky amplifikace kity ESX a ESI u jedinců č. 23, 25, 27, 28, 29 a kosti č. 1.

Tabulka č. 13 Výsledné alely získané amplifikací pomocí miniY pentaplexů I a II u jedinců č. 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16 a 17.

Tabulka č. 14 Výsledné alely získané amplifikací pomocí miniY pentaplexů I a II u jedinců č. 18, 20, 25, 27, 28, 30 a novorozence z hradu Rokštejn.

Tabulka č. 15 Výsledky amplifikace STR lokusů na Y chromozomu pomocí kitů PowerPlex Y a Yfiler u zubů 5, 8, 12, 13, 14, 15, 16 a 17 od společnosti Labrys.

Tabulka č. 16 Výsledky amplifikace STR lokusů na Y chromozomu pomocí kitů PowerPlex Y a Yfiler u jedinců č. 18, 20, 25, 27, 28 a 30 od společnosti Labrys a novorozence z hradu Rokštejn.

Tabulka č. 17 A Srovnání STR profilů získaných analýzou DNA bukálního stěru 001 a kosti č. 1. Amplifikace probíhala kitem PowerPlex ESI-17. Vyznačeny jsou společné alely.

Tabulka č. 17 B STR profil získaný amplifikací bukálního stěru 002 kitem Identifiler.

Tabulka č. 18 Autozomální STR profily porovnávané s výsledky analýzy aDNA.

Tabulka č. 19 Y-STR profily porovnávané s výsledky analýzy aDNA.

Tabulka č. 20 Výsledné hodnoty kvantifikace u úspěšně analyzovaných vzorků.

Tabulka č. 21 Porovnání získaných výsledků analýzy Y chromozomu u jedinců č. 14, 15 a 5. FTDNA = laboratoř Family Tree DNA, NV = námi získané výsledky. Nesrovnalosti při amplifikaci stejných lokusů v případě jedince č. 5 jsou označeny modře.

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 Vzájemné párování bází v antiparalelních řetězcích DNA.

Obrázek č. 2 Rozšíření jednotlivých haploskupin chromozomu Y v Evropě.

Obrázek č. 3 Některé post mortem vzniklé modifikace DNA.

Obrázek č. 4 Kolonka pro izolaci/purifikaci DNA se silikátovou membránou; postup promývání směsi DNA/pufr obsahující chaotropní soli.

Obrázek č. 5 Křivky znázorňující závislost průběhu RT - qPCR na vstupním množství DNA.

Obrázek č. 6 Možné značení primerů v případě použití 5 fluorescenčních barev.

Obrázek č. 7 Posunutí primerů blíže vlastní tandemové repetici.

Obrázek č. 8 Rozsahy (v bp) jednotlivých STR lokusů amplifikovaných miniY pentaplexem I a miniY pentaplexem II.

Obrázek č. 9 Amplifikace 250 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg a 12,5 pg standardní DNA 007 pomocí miniY pentaplexu I a následné přečištění kitem BigDye XTerminator.

Obrázek č. 10 Amplifikace kitem MiniFiler u novorozence z hradu Rokštejn a zubu č. 14.