

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**Detekce a analýza biologických stop v
případech sexuálního násilí**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Školitel-specialista: RNDr. Martin Krátký

Praha, srpen 2011

Irena Fischerová

Čestné prohlášení

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

.....
datum a místo

.....
podpis

Poděkování

Děkuji především panu RNDr. Martinu Krátkému za vedení a cenné rady při přípravě a psaní této práce. Dále Prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D. za podnětné připomínky a také všem kolegům oddělení genetiky z Kriminálního ústavu Praha za trvalou podporu při studiu.

Obsah

1	Úvod	2
2	Cíle práce	3
3	Počátky forenzní genetiky	4
4	Buněčné jádro a jaderný genom	5
4.1.	Stavba a funkce buněčného jádra.....	5
4.2.	DNA.....	5
4.3.	Uspořádání jaderného genomu	6
4.4.	Polymorfismy nDNA a možnost jejich využití pro identifikaci jedince.....	6
5	Biologické stopy	7
5.1.	Druhy biologických stop	7
5.2.	Vyhledávání, zajišťování a uchovávání biologických stop	9
5.2.1.	Vyhledávání biologických stop.....	9
5.2.2.	Zajišťování biologických stop.....	14
5.2.3.	Uchovávání biologických stop.....	15
6	Analýza biologických stop	16
6.1.	Mikroskopická analýza	16
6.2.	Imunologická analýza	17
6.2.1.	Druhá příslušnost krve.....	17
6.2.2.	ABO systém.....	18
6.3.	Genetická analýza.....	20
6.3.1.	Izolace	20
6.3.2.	Kvantifikace.....	24
6.3.3.	Amplifikace	26
6.3.4.	Fragmentační analýza.....	28
6.3.5.	Autozomální STR analýza	30
6.3.6.	Analýza Y chromozómu	32
6.3.7.	Analýza mitochondriální DNA	33
6.4.	Statistické hodnocení	35
7	Využití v kriminalistice	36
7.1.	Příklady využití z praxe	36
7.2.	Databáze DNA	37
8	Závěr	38
9	Použité zdroje	39

1 Úvod

Problematika sexuálních trestných činů je v dnešní době stále ožehavé téma. Do této kategorie lze vedle nejzávažnějšího, za které jistě můžeme považovat trestný čin znásilnění, zahrnout situace, kdy jednání nesměruje k vykonání soulože či obdobného pohlavního styku, ale i k donucení oběti, aby strpěla jiné pachatelovi sexuální projevy např. osahávání na pohlavních orgánech.

Průměrný počet znásilněných žen v České republice se v posledních čtyřech letech pohybuje okolo 573 osob ročně. Z tohoto počtu je nahlášeno pouze 8 %, a pokud jde o zneužití dítěte v rodině, jsou to dokonce jen 3 %. Ze statistik je patrné, že i nadále dochází k mírnému poklesu počtu policii hlášených trestných činů znásilnění. V devadesátých letech se počty nahlášených znásilnění pohybovaly od 634 do 890 případů ročně. V nynějším desetiletí bylo evidováno 500 až 687 případů znásilnění ročně. V poměru k celkové kriminalitě tvoří znásilnění 0,2 %. V kategorii mravnostních trestných činů dlouhodobě tvoří cca 30–38 %, znásilnění je tak po pohlavním zneužívání v této kategorii druhým nejčastěji hlášeným trestným činem. Významná data se týkají objasněných trestných činů znásilnění. Ze statistik Policie České republiky vyplývá, že z nahlášených trestných činů znásilnění je objasněno 70–90 % (Valerián 2008). Nermalou měrou k tomu přispívá i rozvoj forenzních věd, zejména forenzní genetiky. Původní metody genetické analýzy stop trestného činu znásilnění a jiných známek sexuálního násilí často nevedly k individuální identifikaci pachatele. Vývojem nových metodik došlo ke zvýšení úspěšnosti genetické analýzy těchto případů.

2 Cíle práce

Cílem této rešeršní práce je shrnutí nejnovějších poznatků v zajišťování a analýze biologických stop v případech sexuálního násilí. Většina zajišťovaných vzorků je značně problematická a to z důvodů jejich snadným znehodnocení jak vnějším prostředím – zeminou, vodou či čisticím prostředkem při vyprání oděvů, tak i kontaminací biologickým materiálem oběti. Jako nejčastější a v některých ohledech nejideálnější typ vzorku jsou spermie či jejich směs s poševním sekretem. Lze získat i další materiál pachatele, jako je krev, sliny, části tkání, pot či epitelální buňky. Dostupnost materiálu vždy závisí na průběhu skutku.

Proto znalost skutku a nejnovějších technik genetické analýzy zajišťovaných biologických stop jsou důležitými předpoklady úspěšné identifikace pachatele.

3 Počátky forenzní genetiky

První zemí, kde byla genetická analýza při vyšetřování trestného činu použita a následně i přijata soudem jako důkaz, byla Velká Británie. Šlo o případ znásilnění a vraždy dvou dívek ve střední Anglii v letech 1984 – 1986. Analýzu prováděl objevitel genetické identifikace osob Alec Jeffreys ze zajištěných vzorků spermatu z obou míst činu. Jednoznačně bylo prokázáno, že patří jednomu pachateli. Po určité době se k první vraždě doznal jistý mladík, ale vinu na druhém případě vytrvale popíral. Bylo tedy provedeno zkoumání jeho kontrolního vzorku, aby mohla být vina prokázána i ve druhém případě. Analýza však ukázala, že údajný pachatel není v žádném případě původcem spermatu zajištěným ani na jednom z míst činů. Vyšetřovatel proto přistoupil k převratnému kroku - plošnému testování všech mužů ve věku 16-34 let žijících v okolí vražd. Byla provedena analýza DNA více než 4000 osob. Síťu neunikl ani skutečný vrah Colin Pitchfork, který se pod tíhou tohoto důkazu přiznal a byl posléze odsouzen na doživotí. Případ tak vešel do historie jako první kriminalistické použití identifikace osob pomocí analýzy DNA.

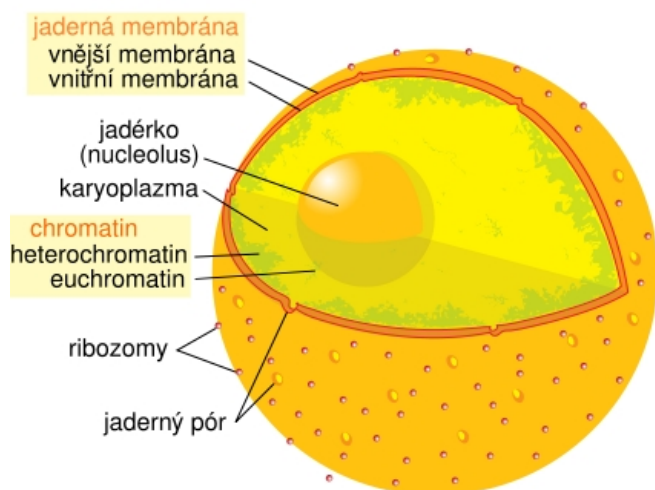
Dalším významným bodem v éře forenzní analýzy DNA se stal rok 1986, který je spojen s objevem polymerázové řetězové reakce (PCR). Její objevitel Kary Mullis, za ni v roce 1993 obdržel Nobelovu cenu za chemii. Díky tomuto objevu bylo možné začít analyzovat i velmi malé množství biologického materiálu, což původní Jeffreysova metoda neumožňovala.

U nás byla první genetická analýza při vyšetřování trestného činu provedena doc. Ferákem v případě vraždy studentky brněnské Masarykovy univerzity Jany Krkoškové, který se stal roku 1990. I zde se jednalo o vraždu se sexuálním motivem. Během pitvy však nebyly zajištěny žádné spermie. Na místě činu kriminalistické techniky zaujal druh krevních stop ve formě kapek na jednom místě kachliček. Tyto kapky vypadaly, jako by byly vytvořeny otřepáním zakrvavené ruky a proto byly zajištěny. Po vytipování pachatele byla provedena analýz krevních stop na jeho oděvu, která se shodovala s obětí a dále srovnání kontrolního vzorku pachatele s výše uvedenými krevními kapkami z místa činu. I zde byla nalezena shoda. A na základě i tohoto důkazu byl pachatel odsouzen na 23 let do vězení.

4 Buněčné jádro a jaderný genom

4.1. Stavba a funkce buněčného jádra

Jádro (nucleus) – (obr. 1) je buněčná organela eukaryotních buněk, ve které je uložena většina genetické informace buňky. Jaderný obal je tvořen dvojitou fosfolipidovou membránou s četnými póry, asi 9 nm širokými. Jsou tvořeny speciálními bílkovinami, které mají usnadnit a řídit transport specifických makromolekul, např. RNA. Z důvodu transportu mRNA k ribozomům a posttranslační úpravě bílkovin, je jádro napojeno na drsné endoplazmatické retikulum. Uvnitř jádra je uložena jaderná DNA (nDNA) uspořádaná do chromozómů. Podle ní je zde transkribována RNA. Jádro se vyskytuje v buňkách všech eukaryot (s několika drobnými výjimkami – např. lidská červená krvinka).



Obr. 1. Buněčné jádro eukaryotická buňka

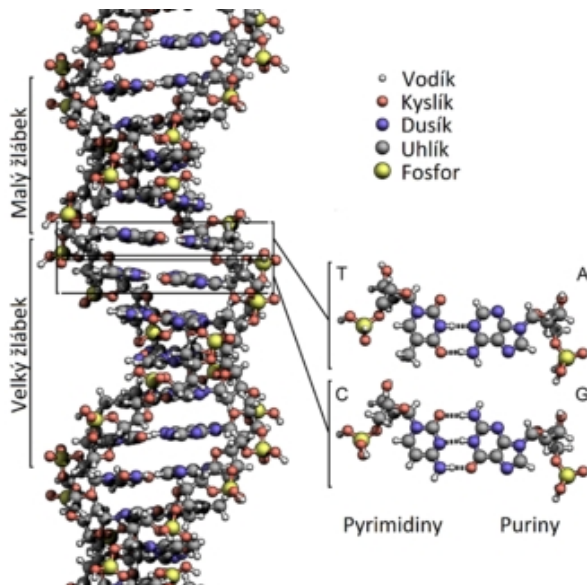
Převzato

http://www.kurtincovam.estranky.cz/fotoalbum/biologie/eukaryotickabunka/diagram_human_cell_nucleus.png.html/462px-Diagram_human_cell_nucleus_cs.svg

4.2. DNA

DNA neboli kyselina deoxyribonukleová (z anglického názvu „deoxyribonucleic acid“) je biologická makromolekula (obr. 2) — polymer, dvoušroubovice tvořená dvěma řetězci tzv. nukleotidů (Kočárek 2007). Nukleotidy jsou vždy složeny z cukru deoxyribózy (monosacharid 2-deoxy- β -D-ribóza), fosfátové skupiny (PO_4^{3-}) a jedné ze čtyř nukleových bází. Informační funkci mají právě báze, jimiž může být adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo thymin (T). V případě molekuly RNA je místo thyminu zařazen uracil (U). První dvě báze patří mezi puriny, zbylé tři mezi pyrimidiny. Dva řetězce ve dvoušroubovici DNA míří vzájemně opačným směrem (jsou antiparalelní). Mezi protilehlými bázemi obou

vláken se vytváří vodíkové můstky, a to vždy mezi guaninem a cytosinem tři vazby a mezi adeninem a thyminem dvě vazby.



Obr. 2. Struktura dvoušroubovice DNA

Prevzato http://cs.wikipedia.org/wiki/DNA/330px-DNA_Structure+Key+Labelled.pn_NoBB_cs

4.3. Uspořádání jaderného genomu

Lidský jaderný genom normální somatické buňky sestává ze $6,6 \times 10^9$ bp (páru bází) a je uspořádán do 46 samostatných molekul DNA. Počet možných sekvenčních kombinací je tak astronomický. Molekuly DNA jsou vázány na proteinové nosiče a svinuty do několika řádů vyšších struktur, které tvoří jaderný materiál tzv. chromatin uspořádaný do jaderných útvarů zvaných chromozóm.

Každý chromozóm (s výjimkou pohlavních) je přítomen v páru. Jeden z páru chromozomů pochází od matky a druhý od otce. Genetická informace na chromozomech je uložena v genech, jejichž fixní pozice se nazývá lokus. Varianta daného genu se nazývá alela.

4.4. Polymorfismy nDNA a možnost jejich využití pro identifikaci jedince

Unikátnost každého jedince spočívá v tom, že molekuly DNA podléhají změnám a vznikají tak polymorfismy. Existence polymorfismů je základním předpokladem pro existenci genetické variability libovolné populace. Jako polymorfismus označujeme existenci nejméně dvou nezávislých variant – alel - jednoho úseku DNA (genu, repetitivní sekvence atd.). Obecně polymorfismus vzniká mutací, která nesmí ovlivnit životaschopnost organismu a která se následně v populaci do určité míry rozšíří.

Mutace můžeme v hrubých rysech rozlišit na:

- polymorfismus sekvenční - jednotlivé alely se liší sekvencí (pořadím nukleotidů); z hlediska identifikace jedinců mají význam především jednonukleotidové polymorfismy tzv. SNP (single nucleotide polymorphism)
- polymorfismus délkový - kdy se jednotlivé alely liší délkou; pro identifikaci jedinců jsou v tomto směru nejužívanějšími tzv. tandemové repetice. Podle délky dané repetice se dělí na STR („short tandem repeats“) neboli *mikrosatelity* a LTR („long tandem repeats“) neboli *minisatelity*. Minisatelity jsou kratší tandemové repetice, v rozsahu několika kilobází, které se více vyskytují v subtelomerických oblastech chromozomů. Jsou obvykle vysoce polymorfní co do počtu opakování jednotky repetice (mnoho různých alel v populaci) a mohou být použity jako genetické markery - VNTR (variable number of tandem repeats = variabilní množství tandemových repetit). VNTR jsou však často příliš dlouhé pro amplifikaci pomocí PCR a tedy nevhodné pro moderní forenzní genetické analýzy (Šeda a kol. 2005-2006). Proto jejich využití k identifikaci klesá. Mikrosatelity jsou zpravidla tvořeny opakováním 1-5 bp, s množstvím opakování zřídka překračujícím stovky. Nejčastější jsou dinukleotidové repetice, ze kterých převažuje typ (CA)_n. Mikrosatelity jsou v genomu velice časté, vysoce polymorfní a v současné době jsou nejčastěji používané pro forenzní identifikace.

5 Biologické stopy

5.1. Druhy biologických stop

Krev je za běžných podmínek v organismu cirkulující, červená, neprůhledná, vazká tekutina. Tvoří ji tekutá složka plazma a krevní buňky - červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty). Zdrojem a nositelem DNA jsou bílé krvinky. Krev je jedním z nejběžnějších biologických materiálů zajišťovaných na místě násilných trestných činů. Zároveň je i pro genetickou analýzu nejvhodnější. Nacházíme ji v podobě zaschlých skvrn, kapek či šmouh.

Sliny jsou tekuté výměšky slinných žláz. Hlavní složkou je z 99% voda, ale obsahují i další důležité sloučeniny, jako jsou minerály, mukus, antiseptické látky a různé enzymy (Březina a kol. 1994). Nedílnou součástí jsou i epitelální buňky a to v počtu až 8 milionů/ml. Z tohoto důvodu jsou vhodné pro kriminalisticko-genetická zkoumání.

Sperma je pro účely genetické expertízy u případů sexuálního násilí nejpožadovanějším materiálem. Jde o bělavou, jemně zakalenou viskózní tekutinu, kterou produkují mužské pohlavní žlázy. Obsahuje spermie a tzv. semenný plazmat (Laupy,

Makovec 1994). Spermie mají velkou důkazní hodnotou pro identifikaci osob mužského pohlaví.

Poševní sekret je tělní tekutina vyměšovaná ženskými pohlavními orgány. Ve většině případů zajišťovaných stop se vyskytuje ve směsi se spermatem. Díky moderním izolačním, separačním i amplifikačním technikám lze již v celku úspěšně oddělit ženskou a mužskou frakci vzorku.

Epitelie pokožky ve většině případů zůstávají na předmětech či plochách jako součást potu. Vlastností pokožky je její neustálá obnova a regenerace, zajišťovaná odlupováním odumřelých povrchových buněk. Proto nelze zabránit ulpívání povrchových epitelí při dotyku či otěru s nějakým předmětem. Problém je jejich mikroskopická velikost a tím snížená přímá vizuální identifikace na nosičích.

Moč je průhledný vodnatý odpadní roztok světle žluté až jantarové barvy vylučovaný ledvinami. Jelikož ve větší míře obsahuje jen odpadní látky těla, nikoli buňky organismu, je její využití v kriminalistické genetice výjimečné. V úvahu připadá, pokud obsahuje i jiný biologický materiál (např. krev)

Nosní sekret je produkt hlenových žlázek a buněk roztroušených ve sliznici dýchacích cest. Zvýšená tvorba sekretu je vyvolána alergickou či obyčejnou rýmou, zánětem nosních dutin, ale je i ozvěnou silnějšího pláče. Jeho imunologická funkce je dána přítomností lysozymu a IgA. Nosní sekret může mít různou barvu i hustotu (od světlé, těžko rozeznatelné od slin a vodnaté až po tmavě červenou, která značí přítomnost krve).

Stolice jako produkt vyprazdňování tlustého střeva za normálních okolností obsahuje zbytky nestrávené potravy, ne tak krev či hlen. Proto je pro genetické zkoumání nevhodná. A to i z důvodu, že případná DNA je rychle degradována působením střevních bakterií a enzymů.

Trichologický materiál je souhrnné označení pro vlasy a chlupy. Zařazujeme sem i vousy, ochlupení hrudníku, nohou, paží i pubické ochlupení. Tvarově jsou mikroskopicky snadno odlišitelné od obdobných objektů, včetně zvířecích chlupů. Z pohledu vhodnosti ke genetické analýze je důležité věnovat pozornost přítomnosti kořínků, které obsahují zbytky epitelových pochev. Takový vzorek vzniká vytržením či samovolným vypadnutím a je tak možné provést analýzu jaderné DNA. V případě vlasů odstřižených je možná analýza mitochondriální DNA. Stejně pravidlo platí i pro chlupy.

Nehet - nehtová destička - je tvořen převážně keratinem, proteinovou substancí, která tvoří základ každé zrohovatělé tkáně. Má bělavou barvu a skrz něj prosvítá narůžověle zbarvené nehtové lůžko. Jejich využití spočívá převážně v zajištění a analýze DNA z nečistot zpoza nich. Při násilné trestné činnosti lze totiž s velkou pravděpodobností očekávat za nehty oběti biologický materiál pachatele nebo naopak.

Měkké tkáně zajišťované na místě činu představují fragmenty orgánů, svaloviny, vaziva a krycích tkání. Pro genetickou analýzu jsou vyžadovány co nejvíce zachované partie tkání bez hnilobného procesu. V případech sexuálních deliktů se setkáváme se vzorky plodů zajištěných při potratech. Zde je analýza dosti obtížná z důvodu problematického odlišení biologického materiálu plodu od materiálu matky.

Tvrdé tkáně nebo-li kosti a kosterní nálezy tvoří typické pozůstatky po lidském jedinci. Nález je obvykle spojen se zemními pracemi nebo náhodným objevem na obtížně přístupných místech v terénu. Pro genetickou analýzu se zpravidla používá vzorek odebraný z dlouhých kostí (femur, humerus) nebo zubu, který je dokonale zbavena zbytků měkkých tkání.

5.2. Vyhledávání, zajišťování a uchovávání biologických stop

5.2.1. Vyhledávání biologických stop

Vyhledávání biologických stop je náročná práce vyžadující odborné znalosti. Nejčastější, nejznámější a pravděpodobně i nejdůležitější důkazní materiál dnešních dní je krev. Poskytuje nám hned několik důkazních parametrů – krevní skupina může zúžit okruh podezřelých, tvar a rozmístění kapek lze použít k rekonstrukci rozmístění původců krve (zraněných osob) a v neposlední řadě je zde individuální identifikace díky analýze DNA. Bohužel stáří krve přesně určit nedovedeme, protože skvrna podléhá různým zevním vlivům, jako je světlo, vlhkost, vysušení, mikroorganismy, plísně nebo čisticí prostředky (Tesař 1990).

Fyzikální metody (barevná světla)

Vyhledávání latentních biologických stop si lze usnadnit použitím různých optických pomůcek (lupy, mikroskopy), osvětlovacích zařízení využívající jak bílé světlo, tak světlo barevné (použití barevných filtrů před zdroj bílého světla).

Dnes jsou komerčně vyráběny kapesní systémy pro přímé využití na místě činu. Patří mezi ně např. Micro BLUEMAXX (Sirchie Finger Print Laboratories), což je kapesní svítidla s LED diodou o vlnové délce cca 450 nm. Souprava obsahuje oranžový bariérový filtr, který se umístí přímo na svítilnu. Jeho využití je dosti široké od vyhledávání fyziologických výměšků jako je moč, sliny, sperma, latentní otisky zvýrazněné fluorescenčními prášky až po luminolem zvýrazněnou krev.

Další možností je např. sada Crime-lite (Foster + Freeman: forensic science instrument design and manufacture), která nabízí jednotlivé vlnové délky osvětlení úzkého vlnového rozsahu v barvě fialové, modré, modrozelené a zelené. Zejména vlnová délka fialová s převažující hodnotou 405 nm se využívá pro vyhledávání krvavých skvrn a stop střelného

prachu, vlnová délka modrá - 450 nm pak pro detekci tělních tekutin (sperma). Sada je snadno přenosná a tak se stává vhodnou náhradou za neskladné zdroje osvětlení s křehkými a drahými žárovkami. Doplňující výbavou je pak nasazovací lupa a brýle s filtrem.

Na podobném principu je založen megaMAXX vyvinutý firmou Sirchie, který obsahuje sedm speciálních ručních svítilen s UV světlem v dlouhovlnném spektru od 395 nm do 625 nm. Dále je součástí této soupravy příslušenství pro fotografování, bariérové filtry, brýle a speciální stativ. Soupravu lze využít na místě činu nebo v laboratoři.

Chemické metody

KREV

Dalším krokem při vyhledávání je odlišení krve od skvrn podobné barevnosti, které nejsou biologického původu. Nejčastěji se používají předběžné testy, které závisí na změně barevnosti či na fluorescenci. V současné době jsou nejběžnější reagenční proužky s obchodním označením **Hemophan** (Lachema a.s.) – založeny na enzymatickém účinku krevní peroxidázy. Pozitivní reakci indukuje zelenání plošky reagenčního proužku. Nutno vzít v úvahu možnost falešně pozitivních reakcí – méně intenzivní zelenání po delší době poskytují zkorodované povrchy, rostlinné šťávy a řada pracích prostředků s bělicím účinkem.

Kastle-Meyerův barevný test používá směs fenolftaleinu a peroxidu vodíku reagující s hemoglobinem. Výsledkem je fialové zbarvení. Hlavní výhodou tohoto testu je jeho rychlost. Nevýhodou je, že některé druhy zeleniny obsahující peroxidázy také způsobí zfialovění směsi. Jejich výskyt na místě činu však není příliš obvyklý.

Hexagon Obti (Bluestar forensic) je rychlý test založený na imunochemické detekci hemoglobinu reakcí s monoklonální protilátkou proti lidskému hemoglobinu. Na rozdíl od jiných testů zároveň odliší lidskou krev od zvířecí. Detekce proteinu (lidského hemoglobinu) monoklonální protilátkou vylučuje možnost ovlivnění jiným zdrojem hemoglobinu. Test má vysokou citlivost, krev může být silně naředěna až 1:1 000, stačí tak přítomnost pouze 500 krvinek. Set obsahuje lahvičku s roztokem a testovací pole. Testovaný vzorek nabere špejlí umístěné ve víčku lahvičky a přeneseme zpátky do roztoku. Kapátkem na vrcholu lahvičky nanese směs na testovací pole. Pozitivní reakce se projeví modrou linkou.

Fluorescenční metody jsou většinou podstatně citlivější než metody založené na změně barvy. Jednou z chemikálií, která se používá pro prvotní průkaz krevní skvrny je **luminol** (5-amino-2,3-dihydroftalazin-1,4-dion). Reakce je založena na reakci luminolu s

železnatými kationty obsaženými v hemoglobinu, které jsou i v malé koncentraci schopny katalyzovat tuto reakci za vzniku modré fluorescence.

I po několikerém umytí zůstávají na kobercích nebo podlahách zbytky stop krve, běžnému oku neviditelné. Ovšem po nanesení reakční směsi s luminolem se potřísněná místa ve tmě pod ultrafialovým světlem intenzivně rozzáří. Bohužel jeho použití má řadu nevýhod:

- 1) může poskytovat falešně pozitivní reakce - reaguje i s ionty mědi, se sloučeninami mědi, sloučeninami železa, s ionty kobaltu. Reaguje též s manganem draselným, který je obsažen v některých barvách.
- 2) je citlivý na chlornany - v místech čištěných například savem je luminol nepoužitelný
- 3) může způsobit degradaci DNA (Šimsa a Skopal 2008)
- 4) obsahuje jako bázi vodu, což může způsobit, že nebudou detekovány skryté skvrny na mastném podkladě. Luminol může způsobit další zředění již naředěné skvrny a tím ohrozit hranici detekovatelnosti při analýze DNA.

Stejným způsobem se aplikuje i **fluorescein**, červené organické barvivo, které v alkalickém prostředí tvoří červený roztok se zelenou fluorescencí viditelnou i při velkém zředění v kapalině. Pod UV světlem při kontaktu s krví pak velmi silně zeleně fluoreskuje. Fluorescence je buzená již viditelným světlem, absorpční maximum fluoresceinu totiž leží na 494 nm. Má sice nižší citlivost než luminol, ale na druhou stranu nevykazuje problémy s chlornany. Jeho další výhodou je, že je viskóznější než luminol a tak lépe drží na zdech, dveřích a jiných svislých plochách.

Přes popsané problémy s luminolem se jako vhodnější pro forenzní použití jeví chemikálie založené na rychle se odpařujících anorganických rozpouštědlech jako MERBROMIN a ORTHO-TOLIDINE. Pro následnou genetickou analýzu je výhodné použití nových přípravků jako např. **BLUESTAR® FORENSIC** (Bluestar forensic). Jde o nově patentované barvivo speciálně vyvinuté pro práci na místě trestného činu při vyhledávání latentních krevních stop. Je vhodné na zaschlé a umyté krevní stopy, i na silně zředěné a jeho použití je velice rychlé. Nespornou výhodou je, že barvivo nepoškozuje DNA. Modifikací toho testu je **BLUESTAR® FORENSIC Magnum** (Bluestar forensic). Používá se speciálně při vyhledávání velmi slabých, mikroskopických nebo silně zředěných latentních krevních stop. Provedená validační studie demonstruje prokázanou krev až při tisícinásobném zředění (http://www.bluestar-forensic.com/pdf/en/chu_nantes_study.pdf). Do té doby bylo možné prokázat krev pouze do přibližně dvoustnásobného zředění. Velmi dobře využitelný je při vyhledávání krevních stop na oděvech. Peroxid vodíků v kontaktu s buňkou, která obsahuje hemoglobin, oxiduje **BLUESTAR® FORENSIC Magnum** a emituje intenzivní luminiscenční světlo 430 nm.

Světlo je natolik silné a jasné, že není třeba zkoumané prostředí zcela zatemňovat a není potřeba žádné speciální fotografické vybavení. Falešně pozitivní reakci mohou dát přípravky s bělicím účinkem nebo měď. Reakce je však málo viditelná nebo má jiné emisní spektrum, takže ji lze dobře odlišit.

SLINY

Kromě krevních stop se orientačně prokazují i sliny. Ty po zaschnutí tvoří bělavé skvrny někdy podobné skvrnám od spermatu. Průkaz je založen na enzymatické reakci alfa-amylázy, která hydrolyticky štěpí polysacharidy (škrob). Reakci aktivuje přídavek Cl^- iontů. Princip vlastního průkazu vychází z přídavku škrobového substrátu k vyšetřovanému vzorku (Laupy 1987). Úbytek nebo úplné rozštěpení škrobového substrátu se zjišťuje jodoškrobovou reakcí. V pozitivním případě zůstává výluh ze stopy bezbarvý, což značí, že došlo k hydrolýze škrobu amylázou. V opačném případě výluh zmodrá. Specifita průkazu je snížena výskytem menšího množství v případě tzv. smíšených stop (př. sliny se spermatem).

SPERMA

Důležitou skupinu v námi sledovaných případech sexuálního násilí tvoří ve smyslu detekce biologického materiálu detekce spermatu. Jde v první řadě o orientační zkoušky založené na enzymatickém průkazu kyselé fosfatázy (KF). Reakce je založena na uvolnění fosfátové vazby 1-naftyl-fosfátu sodného působením KF a následné tvorbě barevného diazoniového produktu. Z barevných podkladů je tedy vhodné stopu přenést na navlhčený filtrační papír, který přitiskneme na předpokládané místo výskytu. Detekci pak provádíme na filtračním papíře, do něhož kyselá fosfatáza difundovala (Tesař a Klír 1990). V pozitivním případě se test zbarvuje do fialova.

KF se však vyskytují i v dalších tělních tekutinách (v buňkách kostní tkáň = osteoklastech, tkáni ledvin, v erytrocytech a trombocytech). Pro odlišení jednotlivých skupin lze využít faktu, že KF mají dva izoenzymy - tartarátstabilní (prostatický) a tartarátstabilní (kosti, ery atd). Ty se od sebe liší stupněm enzymatické aktivity, reakcemi s inhibitory, zastoupením aminokyselin při elektroforetické separaci apod. Nejběžněji používaná způsob jejich odlišení je reakce s vlnanem sodným, který prostatický izoenzym inaktivuje. Po těchto testech vždy následuje specifické mikroskopické vyšetření.

Výsledky stanovení KF jsou dle dostupných zkoušek ovlivněny zředěním a stavem stopy. Z testování vyplývá, že detekce aktivity KF je u čerstvého vzorku možná až do zředění 1:100 - 150. Po vyschnutí se citlivost snižuje, pozitivní reakce byla získána ještě při zředění 1:50 - 80 (Laupy a Makovec 1994). Na druhou stranu vysušení prodlužuje

stabilitu KF na několik let. Významný je naopak negativní účinek vlhkosti umožňující činnost degradativní mikrobiální flóry. V takovém případě aktivita KF poměrně rychle klesá a již po čtyřech dnech je nedetekovatelná. Odolnost spermií je za uvedených podmínek vyšší, a proto jejich mikroskopický průkaz zůstává v podstatě nezměněn.

Pro rychlou detekci spermatu většinou přímo na místě činu je dnes dostupný test na sperma **PHOSPHATESMO KM** (MACHEREY-NAGEL). Testovací pásek navlhčený fyziologickým roztokem se přikládá na místo předpokládaného výskytu spermatu. Barevná změna nám určí výsledek testu. Phosphatesmo KM je specifický pro kyselé fosfatázy. Kontrolní testy slin, hlenu či ženských pohlavních sekretů dají negativní výsledky. I tak reakce není vhodná jako náhrada mikroskopického stanovení spermií.

Testy **RSID-SEMEN (Rapid Stain Identification)** firmy IFI Independent Forensics jsou navrženy pro rychlou, snadnou a spolehlivou detekci seminální tekutiny z různých vzorků jako jsou oděvy, lůžkoviny či poševní sekret. Test pracuje s duální monoklonální protilátkou proti lidskému antigenu semenogelinu. Nespornou výhodou je, že tento test nevykazuje křížové reakce s ostatními tělními tekutinami a to lidskými ani zvířecími.

Mezi nejnovější metody používané při vyhledávání a zajišťování spermií ve smíšených stopách případů sexuálního násilí, zejména při analýze poševních stěrů, patří **laserové mikrodisekce (LM)**. Ta umožňuje ze vzorku cíleně odebrat jen spermatické buňky a výsledkem následné genetické analýzy tak nejsou smíšené profily DNA (tvořené DNA oběti a pachatele), ale již čistý profil DNA pachatele.

Technika LM se používá ve spojení se specifickým fluorescenčním barvením spermií. Tato metoda využívá specifických molekul na membráně spermií, díky nimž je lze obarvit s využitím specificky značených protilátek a jednoznačně je tak identifikovat i v převaze ostatních buněk. Povrchové molekuly spermií lze fluorescenčně nejsnáze obarvit pomocí komerčně vyráběného kitu **SPERM HY-LITERTM** (IFI Independent Forensics). Spermie se v tomto případě barví pomocí myších monoklonálních protilátek svázaných s barvivem Alexa 488, které se specificky váže na hlavičky spermií. Kromě toho, kit obsahuje interkalační barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), které nespecificky barví všechna buněčná jádra. Samotná detekce se provádí ve fluorescenčním mikroskopu.

Ve smíšeném vzorku, který neobsahuje spermie, lze mužské epitelové buňky odlišit od ženských pomocí luminiscenčně nebo fluorescenčně značených sond specifických na X a Y chromozom. Tímto způsobem tak lze označit a následně odebrat somatické buňky pachatele, např. epitelové či krevní buňky z poševního stěru v případech muže aspermika (Laupy 1987) nebo v případech, kdy nedošlo k ejakulaci.

5.2.2. Zajišťování biologických stop

Zajišťování biologických stop podléhá ve všech případech velmi přísným pravidlům. Jejich smyslem je zabránit znehodnocení stopy kontaminací jiným biologickým materiálem. Špatným nakládáním může dále dojít k degradaci stopy vlivem např. vlhkého prostředí, kdy je mokřý materiál vložen do neprodyšného obalu a všudypřítomná mikroflóra DNA zcela zničí.

Způsoby zajišťování jednotlivých stop se liší podle jejich charakteru. Mnohdy lze tutéž stopu zajistit několika odlišnými způsoby, což může být významné pro další práci se stopou. Základními způsoby zajišťování stop je *in-natura* a v podobě substituentů (Straus a kol. 2006).

Zajišťování *in-natura* je možné řadou postupů:

- Stopa spolu s nosičem - nosičem se rozumí materiál, na kterém je stopa fixována (textilie, plast, sklo, nástroje, odlomené části zařízení atd.)
- Oddělení části se stopou od celku – zpravidla se jedná o oddělení kovových nebo dřevěných částí z velkých objektů.
- Sejmutí stopy z nosiče – princip spočívá v mechanickém, fyzikálně-chemickém, výjimečně i chemickém oddělení hmotné substance stopy od podkladu (ze zdí, podlah, vozovky apod.)

Při všech uvedených způsobech je nutné zvažovat možnost, že zajišťovaná stopa, může obsahovat komplexní informaci, tj. že obsahuje informace o několika současně působících vlivech. Typickým příkladem je daktyloskopický otisk vytvořený krví. V takových případech je nutné stopu zajišťovat tak, aby ji bylo možno zkoumat z pohledu několika expertizních oborů.

V neposlední řadě, je důležité i dostatečně chránit osobu provádějící zajištění před případnou infekcí. Na základě všech těchto skutečností byla přijata specifická pravidla pro zajišťování stop biologického původu:

- a) Používat ochranné pomůcky (rukavice, roušky, čepice, návleky) a sterilní nástroje – stopy se nikdy nedotýkat holou rukou a nástroje před každou další stopou čistit např. etanolem
- b) Orientačně se přesvědčit zda jde o biologický materiál
- c) Tekutý materiál se odebírá na vhodný materiál – vatový tampon a tento uložit do prodyšného obalu
- d) Pokud je to technicky proveditelné, zajistí se celý předmět – expert až v laboratoři vhodným způsobem sejme stopu z podkladu

- e) V opačném případě se stopa sejme na místě - nejčastěji navlhčeným sterilním vatovým nebo nylonovým tamponem (http://dna.com.cz/files/file/4n6_BIO_A.pdf), který poté necháme vyschnout
- f) Každou stopu zajišťujeme odděleně (Musil a kol. 2004).

5.2.3. Uchovávání biologických stop

Postupy uchovávání se řídí druhem biologické stopy. Pokud jde o materiál na nějakém nosiči, je důležité jeho dostatečné vysušení a následně balení do prodyšného obalu. Pro tento způsob uchovávání, ale i transportu na expertizní pracoviště se osvědčil Stericlin (Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, obr. 3) Podobný postup se využívá i pro tekutý materiál. V takovém případě je vhodné jej převést na nějaký pevný nosič (vatový tampon, gázový čtverec, buničitá vata), dokonale vysušit a uložit rovněž do prodyšného obalu. Pokud toto není možné, ukládáme tekutý materiál do lednice, kde ho můžeme uchovávat cca měsíc. Pro dlouhodobější použití je vhodné vzorek zamrazit a to až na -80°C v hluboko mrazicím boxu. Takto upravený lze uchovávat i několik let.



Obr. 3. Obalový materiál Stericlin

Převzato http://www.vp-group.de/Systemverpackungen_Klarsicht_Papier_Folie_Pic_20_alle_Sprachen_LIVE.jpg

6 Analýza biologických stop

6.1. Mikroskopická analýza

Mikroskopické metody se uplatňují zejména při specifikaci materiálu (průkaz přítomnosti spermií) nebo při některých komparativních postupech (např. při porovnávání trichologického materiálu).

Spermie

Průkaz spermatu vychází z mikroskopického zjištění spermií. U zdravého jedince je počet spermií přibližně 10^8 v jednom mililitru ejakulátu. Proto lze oprávněně tvrdit, že mikroskopické vyšetření je jeden z nejcitlivějších průkazů biologického materiálu vůbec. V rámci vyšetření se využívají klasické histologické barvicí techniky.

Zvlhčená skvrna se přenese seškrabem na podložní sklíčko. V případě, že jde o špatně ohraničenou skvrnu, provádí se macerace odštířené textilie destilovanou vodou. Po 20 - 30 min se látku odstraní a provede se centrifugace. Následně se peletka přenese na podložní sklíčko a obarví krystalvioletí (případně metylénovou modří či hematoxylinem). Preparát se překryje krycím sklíčkem a vyšetří pod mikroskopem (Laupy 1987).

Mikroskopický průkaz selhává v případech tzv. aspermiků - Při podezření na tuto skutečnost je mikroskopie nahrazena průkazem látek, které tvoří součást prostatických sekretů nejčastěji jde o spermin a cholin (Laupy 1987).

Trichologický materiál

Jak již bylo dříve popsáno, do této kategorie zařazujeme nejen vlasy, ale i chlupy. V případech sexuálního napadení nám přítomnost pubických chlupů přináší cenné informace o kontaktu pachatele s poškozenou. V rámci mikroskopické analýzy lze zjistit původ trichologického materiálu, zda jde o materiál lidský či zvířecí a dále lze provést výběr materiálu vhodného pro genetickou analýzu. S ohledem na využití vlasů v rámci molekulárně genetické expertizy je třeba věnovat pozornost vlasovým kořínkům (Tesař a Klír 1990) kde zůstávají ulpělé epitelální buňky pokožky hlavy, které slouží jako hlavní zdroj pro extrakci jaderné DNA.

Vlas se na podložním sklíčku zakápně destilovanou vodou nebo glycerinem a překryje podložním sklíčkem. Pod mikroskopem je vždy velmi dobře patrná charakteristická stavba, zejména uspořádání vrstev – kutikuly, kůry a dřene. Díky tomu lze jednoznačně odlišit vlasy od jiných vláken. Pro genetická zkoumání je důležité určení druhové příslušnosti. Vyšetření základních znaků spočívá v morfologických rozdílech vlasů/chlupů různých živočišných druhů. Samotné provedení je totožné s výše popsaným postupem.

Laserová mikrodisekce

Jedna z nejnovějších a nejmodernějších metod - laserová mikrodisekce nám umožňuje separaci buněk pod mikroskopem laserovým paprskem. Ve forenzní genetice se ji využívá převážně při odlišení spermií ve směsných vzorcích poševních stěrů při znásilnění. V těchto případech bývá nalezeno většinou jen několik málo mužských pohlavních buněk, které jsou masivně převrstveny buňkami ženskými. Izolace mužské frakce je při běžných postupech proto velmi obtížná. Dříve využívaná metoda diferenciální lýzy (podrobněji v kapitole izolace) narážela na mnohá úskalí způsobených zejména degradací spermií. Jedna z nich ovlivňuje výsledek i při zajištění vzorku LM a to je čas odběru, který uplynul od skutku. Po určité době zahajují spermie programovanou buněčnou smrt, na jejímž počátku je degradace DNA. Rovněž dochází k mikrobiálnímu rozkladu vzorku.

Laserová mikrodisekce může pracovat na základě několika principů. V naší laboratoři je využívána a i pro další účely testovaná laserová mikrodisekce CellCut system (MMI, Molecular Machines & Industries AG) v kombinaci s invertovaným fluorescenčním mikroskopem Olympus (Olympus C&S s.r.o.). Vzorek se fixuje na membránu z polyetylen naftalátu o tloušťce cca 1 μm , která se vyznačuje vysokou absorpcí v UV-A oblasti. Preparát se obarví (viz. Vyhledávání biologických stop) a přiklopí podložním sklíčkem, do mikroskopu se umístí membránou nahoru. Buňky nebo celé komplexy buněk určené k mikrodisekci se pod mikroskopem identifikují a označí, a to ručně nebo pomocí definovaných geometrických obrazců. Laserový paprsek pak ořízne určené oblasti, které se automaticky oddělí od preparátu přitisknutím sběrného víčka mikroskopavky s adhezivním silikonovým povrchem. Tato mikroskopavka je umístěna v držáku mikroskopu a díky tomu je vzorek chráněn před nechtěnou kontaminací, neboť během celého procesu nepřichází do kontaktu s rukou personálu.

Univerzálnost systému spočívá v jeho schopnosti zpracovávat téměř všechny typy preparátů, jako například parafinové bločky, ultratenké řezy, archivní preparáty, nátěry a živé buňky. Bohužel každá metoda má svá omezení a to i ty nejmodernější, mezi něž LM bezesporu patří. Systém není schopen rozdělit materiál více jedinců, pokud se jedná o shodný typ buněk.

6.2. Imunologická analýza

6.2.1. *Druhovú příslušnost krve*

Pod pojmem druhová příslušnost označujeme určení původu živočišných bílkovin, přítomných ve vyšetřovaném vzorku. Vzhledem k dalším analýzám je na prvním místě zjištění, zda jde o materiál lidský. Vlastní princip určení druhové příslušnosti krve je založen na reakci známého diagnostika (precipitačního séra) s neznámou bílkovinou

(Laupy 1987). V současné době je k dispozici paleta deseti základních typů sér proti bílkovinně lidské, hovězí, vepřové, drůbeží, králičí, koňské, psí, kočičí, ovčí a srnčí. Reakce je spojena s tvorbou bělavého amorfního precipitátu. Pozitivní je nejen s krví, ale i se spermatem, hnísem, potem, poševním hlenem a slinami (Laupy 1987).

V praxi je využíváno několik metod:

- a) **Kontaktní metoda** - do připravených zkumavek se napipetuje výluh a po jejich náklonu přibližně 60° se nechá po stěně přímo z pipety stékat diagnostické sérum. Zákal se objeví během 5 min, někdy okamžitě. V takovém případě se reakce hodnotí jako pozitivní. Vždy se provádí zkouška i s neposkvřenou látkou, pro vyloučení nespecifické reakce.

Modifikací je zkouška na podložním sklíčku, kde se nechá splynout kapku výluhu a sérum. Případný zákal se odečítá na tmavém pozadí.

- b) **Imunodifúze** – setkání putující bílkoviny zkoumané skvrny s příslušným precipitačním sérem probíhá v polotuhém prostředí agarového gelu. Do agarové plotny se vyřízne středový otvor a ve vzdálenosti cca 8 mm se vyříznou další čtyři otvory ve směru světových stran. Do středu se pak aplikuje vyšetřovaný výluh. Po 24 h v uzavřené komoře (se zajištěnou vlhkostí) se v místě střetu vytvoří precipitační linie.
- c) **Elektroimunoprecipitace** – principem, kvantitativní výkonností a nenáročností odpovídá předchozí metodě. Podstatně je však zkrácena doba vyšetření, působením vloženého elektrického pole a uspořádáním otvorů v agarové plotně, které jsou orientovány ve směru probíhajícího elektrického proudu. Na straně kladného pólu jsou pak rozmístěna precipitační séra, u záporného pólu vyšetřované vzorky, podložní materiál a standardy (Laupy 1987).

6.2.2. *AB0 systém*

Tento systém dědičných krevních znaků, který se vyskytuje na povrchu erytrocytů, vytvářejí dva základní antigeny A a B spolu s doprovodným antigenem H, odpovědným za antigenní aktivitu skupiny 0. Část populace vykazuje přítomnost antigenů i ve svých sekretech a pak hovoříme o vylučovatelství. Kromě posledně jmenovaného jsou základní antigeny AB0 systému doprovázeny i protilátkami alfa a beta, vyskytujícími se v séru.

Absorpčně - eluční metoda

V principu zde antigen vyšetřovaného vzorku specificky reaguje s protilátkou v nadbytku diagnostického séra - fáze absorpční. Vzniklá vazba je termolabilní, proto se nezreagovaný přebytek odstraní promytím zchlazeným fyziologickým roztokem.

Působením vyšší teploty dochází ke zrušení vazby – fáze eluční. Uvolněná protilátka následně reaguje s testovanými erytrocyty – fáze reabsorpční.

Materiál krevní stopy se přenesou na gázová vlákna zvlhčená destilovanou vodou a nechá se volně vyschnout na porcelánové tečkovací destičce. Lze provést i vystřížení malé části stopy. V systému ABO se vždy testuje i podložní materiál z důvodu možné falešně pozitivní sérologické aktivity. Následně se gázová vlákna přenesou do zkumavek označených anti-A, anti-B a přidají se po kapkách diagnostická séra, tak aby materiál byl dokonale ponořen. Poté se zkumavky inkubují přes noc v lednici. Druhý den se odsají diagnostická séra a provede se 5-10 krát promývání zchlazeným fyziologickým roztokem. Dnes tento proces zajišťují automatické chlazené promývačky. Na konec se přidá po kapce čerstvého fyziologického roztoku a zkumavku zahřejeme, čímž dojde k eluci specificky absorbovaných protilátek. Následně se zchladí na 25-30 °C a přidá se suspenze testovacích erytrocytů homologních k diagnostickým sérům (A₁ do řady anti-A, B do řady anti-B). Obsah se protřepe, nechá se inkubovat 5 min při laboratorní teplotě a poté centrifuguje 1-2 min při 500 – 700 g. Vzhledem k malým reagujícím množství se odečet provádí pod mikroskopem, kde je v pozitivním případě zaznamenána aglutinace. Získané výsledky se zaznamenávají do rastru laboratorního razítka.

V případě většího množství vzorků se používají polystyrénové mikroplotny. Snižuje se tím i pracovní objem výchozího vzorku, reagentie i suspenze ery.

V krevních stopách jsou kromě erytrocytů přítomny i zbytky krevního séra s obsahem protilátek alfa a beta (aglutininy). Ty po převedení do fyziologického roztoku jsou schopny specificky aglutinovat testovací erytrocyty A₁ a B. Stanovení nachází využití při hodnocení smíšených biologických stop typu krev – krev nebo krev – sekret při sexuálních deliktech, kdy výskyt více osob se projeví tzv. atypickým výskytem protilátek.

Sklíčková metoda

Při této metodě dochází k reakci jen části vyšetřovaného materiálu a části testovaných erytrocytů. Suchý krevní materiál (fragment krevní krusty) se rozdělí na dvě části a umístí na podložní sklíčko označené A₁ a B. Do míst se vzorky se umístí dva distanční kroužky, tak aby se materiál nacházel uprostřed, následně se střed vyplní suspenzí testovacích erytrocytů a překryje podložním sklíčkem. Inkubuje se ve vlhké komůrce, při laboratorní teplotě 1-2 hod. Reakce se hodnotí pod mikroskopem.

Zkumavková metoda

Výhodou této modifikace původní metody je možnost zpracování i značně znečištěných materiálů, materiálů získaných smytím či silně zhemolyzovaných sér. Určitou

nevýhodou jsou zvýšené nároky na výchozí množství materiálu. Krevní skvrny se extrahují fyziologickým roztokem až do úplného rozpuštění. Extrakt se přes filtr (chomáček vaty) odsaje do další zkumavky – 1. fáze odstranění nečistot a zcentrifuguje – 2. fáze. Vyčreňený supernatant se rozdělí do dvou zkumavek označených A₁ a B a přidá se suspenze testovacích ery. Obsah se jemně protřepe a nechá 5 min v klidu. Zkumavky se doplní fyziologickým roztokem, centrifugují a znovu doplní na plný objem – 3. fáze odstranění hemolyzátu. Po centrifugaci a odsátí supernatantu jsou vzorky připraveny k hodnocení. To se stejně jako u aglutinačního testu provádí pod mikroskopem.

V systému AB0 lze vyšetřovat i lidské sekrety, díky již dříve zmíněnému vylučovatelsví. Je dáno zvýšenou koncentrací mukopolysacharidů zodpovědných za příslušnost daného sekretu k příslušné krevní skupině. Vysokou sérologickou aktivitu vykazují i nepatrné stopy slin, spermatu a potu (Laupy 1987). Z toho vyplývá skutečnost, do jaké míry mohou i malé stopy potu v podložním materiálu zkreslit a ovlivnit výsledek. Samotné vyšetření se provádí metodou absorpční eluce (viz výše). V pozitivním případě lze stanovit krevní skupinu i potvrdit vylučovatelsví, v opačném případě může jít o nositele krevní skupinové vlastnosti 0 nebo o nevylučovatele, který může být nositelem jakékoliv krevní skupiny.

Systém AB0 je k diferenciaci krevních stop v kriminalistice využíván již po desetiletí, proto je k dispozici i řada údajů týkající se rušivých vlivů jako je stáří stopy, denaturace teplem, narušení mikrobiální činnosti. Uvedené se vztahuje především k antigenům, odolnost protilátek je podstatně nižší. Odolnost vůči stáří je značná, ale je závislá na řádném uskladnění v suchu. Tepelná odolnost je podstatně nižší, při teplotách 100 - 200 °C vyhasíná aktivita již po několika minutách. V případě mikrobiálního účinku je situace poněkud složitější. Odbouráváním oligosacharidových postranních skupin mukopolysacharidů krve dochází k falešně negativním výsledkům. Na druhou stranu mikrobiální činností dochází k tvorbě biochemicky příbuzných molekulárních struktur vykazující sérologickou pseudoaktivitu a s tím spojené falešně pozitivní výsledky.

6.3. Genetická analýza

6.3.1. Izolace

Ve většině případů trestné činnosti jsou ke genetické analýze dodány vzorky degradované, kontaminované či smíšené. Způsoby izolace závisejí především na druhu biologického materiálu. Zřejmě nejméně odolné jsou epitelové buňky, na něž lze s úspěchem použít všechny níže popsané postupy. Problémy nastávají např. u kostí či spermií, kdy je k uvolnění DNA do roztoku nutný přídavek agresivních činidel (detergenty, redukční činidla aj.) Dalším typem problematických biologických stop jsou vlasy, které

v cytoplazmě buněk obsahují látky bránící namnožení DNA (tzv. inhibitory amplifikace), např. keratin. U takových vzorků musí před amplifikací dojít k oddělení DNA od ostatních biomolekul. V případech sexuálních zločinů jsou většinou dodány vaginální stěry, stěry spermatu, nebo epitelových či krevních buněk pachatele. Podstatou jednotlivých postupů je získat požadovanou DNA v dostatečném množství a kvalitě. Proto byly vyvinuty speciální komerční kity pro forenzní účely.

Extrakce chelatační pryskyřicí Chelex® (Bio-Rad Laboratories)

Jednou z nejběžněji užívaných metod je rychlá extrakce DNA založená na vyvázání dvojmocných kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} . Buňky jsou lyzovány za uvolnění DNA do roztoku pomocí destilované vody. Po 30 minutách následuje centrifugace a odstranění supernatantu. K sedimentu je přidána 5% suspenze chelatační pryskyřice, která na sebe váže dvojmocné kationty - kofaktory enzymů odbourávajících DNA. Případně lze přidat i proteinázu K, která velmi účinně inaktivuje DNázy a RNázy. Směs je po 20-30 min inkubována při 56 °C a poté denaturována při 100 °C. Po následné centrifugaci supernatant obsahuje analyzovatelnou DNA, avšak často i celou řadu inhibitorů PCR. Přesto je tato rychlá a levná metoda jednou z nejužívanějších ve forenzní praxi pro získávání DNA z relativně standardních vzorků – tekutá krev, krevní skvrny, buňky apod. Pro extrakci z kostní kompakty však není tato metoda vhodná.

Fenol-chloroformová extrakce

Jde o základní a zřejmě i nejdéle užívanou metodu izolace DNA. Ke vzorku je přidán extrakční pufr, obsahující obvykle následující složky:

- silné detergenty rozrušující buněčné membrány, např. Triton-X-100 či SDS
- proteázu či proteinázu K, enzymy štěpící bílkoviny
- EDTA, která funguje jako chelatační činidlo
- DTT, redukční činidlo zabraňující oxidativnímu narušení DNA během izolace
- případně RNAázu, enzym štěpící přítomnou RNA.

Potřebná doba působení extrakčního pufru na vzorek závisí na typu tkáně, pohybuje se od několika desítek minut po několik dní. Proces urychluje zvýšená teplota, nesmí však překročit kritickou hodnotu, při níž dojde k denaturaci přítomných enzymů (56 °C).

Po extrakci následuje rozdělení hydrofilních a hydrofobních složek do polární a nepolární fáze roztoku. Ke vzorku je přidána směs fenol/chloroform (obvykle v poměru cca 1:1), popřípadě fenol/chloroform/izoamylalkohol (v poměru 25:24:1). Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Následným vytřepáním a

centrifugací dojde k vytvoření fázového rozhraní. Spodní organická fáze tvořená fenol/chloroformem obsahuje veškeré nepolární látky, střední tzv. mezifáze je tvořena bílkovinami - objeví se bílý prstenec sražených proteinů a horní vodná fáze obsahuje všechny látky polární, tedy i DNA.

Protože však nerozpustnost fenolu ve vodě není absolutní, obsahuje vodná fáze též malé množství fenolu. Ten by v následných analýzách vadil (je to např. silný inhibitor PCR), proto musí být získaná DNA přečištěna, nejčastěji srážením koncentrovaným ethanolem (96 %) a následně resuspendována do vody nebo vhodného pufru (např. TE).

Protože více než 95 % objemu nukleových kyselin v buňce tvoří RNA, převažuje RNA i v tomto roztoku. Pokud potřebujeme pracovat s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy. Roztok musí být poté znovu přečištěn fenol-chloroformovou extrakcí a DNA sražena etanolem.

Tato metoda byla již mnohokrát úspěšně využita k extrakci DNA z kosterního materiálu, neboť při ní dochází k účinnému odstranění všech inhibitorů následné PCR reakce.

Extrakce založené na adsorpci na silikát

Do této skupiny metod patří několik postupů, které využívají faktu, že v přítomnosti tzv. chaotropních solí (solí zvyšujících iontovou sílu) se volná DNA váže na silikát (QIAGEN). Tyto metody jsou pro extrakci z forenzních vzorků velmi vhodné, neboť účinně eliminují PCR inhibitory a extrahují velké množství přítomné DNA.

QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN) – silikátová kolona

QIAamp DNA Mini Kit zjednodušuje izolaci DNA z biologických vzorků. Není zde nutná žádná fenol-chloroformová extrakce. Vzorek je nejprve inkubován s extrakčním pufrem, poté je přidán pufr s obsahem chaotropních solí a etanolu. Suspenze je převedena do zkumavky se silikátovou kolonkou. DNA se váže na křemičitý gel tvořící membránu v kolonce, zatímco nečistoty prochází. PCR inhibitory, jako jsou dvojmocné kationty a proteiny jsou zcela odstraněny ve dvou účinných promývacích krocích. Čistá DNA je následně po několikaminutové inkubaci při laboratorní teplotě s elučním pufrem uvolněna z membrány v důsledku změny iontové síly a centrifugací převedena do nové zkumavky.

DNA IQ[™] Systém (Promega) – magnetosilikátové partikule

Systém DNA IQ[™] může být použit na extrakci DNA z různých typů vzorků, zahrnujících biologické stopy na pevných nosičích i tekuté vzorky. Unikátní systém je vyvinut na odstranění inhibitorů PCR a kontaminantů, které se často u vzorků vyskytují. Metoda je optimalizována tak, aby při velkém množství DNA ve vzorku bylo izolováno

pouze množství cca 1 ng/μl, což je optimální množství pro PCR reakci. Při malém množství DNA ve vzorku naopak dochází k velmi účinnému vychytávání DNA na partikule.

Systém DNA IQ™ je specificky vyvinutý na izolaci DNA pro forenzní laboratoře. Obsahuje novou technologii založenou na silikátových paramagnetických částicích pro izolaci čisté DNA.

Vzorek je nejprve inkubován s lyzačním pufrem (délka inkubace záleží na typu vzorku). Po cca 60 min je k němu přidána suspenze paramagnetických partikulí s pryskyřicí s navázanými částicemi silikátu, na které se naváže DNA. Zkumavky jsou poté vloženy do magnetického stojánku, dochází k migraci partikulí na boční stěnu zkumavky. Díky tomu lze pufr se zbytkem lyzátu buněk snadno odebrat. Následně jsou partikule několikrát přečištěny přidáním promývacího pufru, který je opět odstraněn pomocí magnetického stojánku vázajícího partikule s navázanou DNA. Ta je z partikulí uvolněna inkubací s elučním pufrem, který je společně s čistou DNA nakonec odebrán do čisté zkumavky.

Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™)

Tento kit byl speciálně vyvinut pro extrakci DNA z vlasů a tkání. Tyto vzorky vyžadují před samotnou izolací předtrávení, aby mohlo dojít k úplné lýze buněk. Rozpad zcela dokonale zajistí IB pufr s přísadami DTT a proteinázy K. Úspěch je podmíněn několikahodinovou inkubací při 56 °C. Následuje izolace výše popsaným kitem DNA IQ™.

Diferenciální lýza

Ve většině případů sexuálních zločinů se snažíme DNA z přítomných spermií oddělit od DNA ostatních buněk. K tomu se dříve využívala metoda diferenciální lýzy.

V prvním kroku této metody se pomocí detergentu (TE pufru) a proteázy rozruší membrány epitelových a krevních buněk, zatímco odolné buňky, jako jsou spermie, zůstanou neporušené. Po centrifugaci se lyzované buňky a jejich DNA přenesou se supernatantem do nové zkumavky. Získáme tím ženskou frakci. Následuje izolace pomocí 20% Chelexu. Na zbylou peletu spermií se nanese opět směs detergentu (Digest Buffer) a proteázy, obohacená o redukční činidlo. Tato směs rozruší i membránu spermií a tak dojde k uvolnění DNA. I zde následuje izolace metodou Chelex, tentokrát 5% s přísadou DTT.

Podobný princip v počátečních krocích využívá i komerčně dodávaný set **Differex™ Systém** (Promega). Výhodou je, že první - ženská frakce je barevně odlišena, což značně

usnadňuje její separaci. Dále ale už následuje postup izolace, kterým je vazba na paramagnetické partikule.

V nezanedbatelném počtu případů však z různých důvodů dochází k selhání diferenciální lýzy a čistý genetický profil pachatele znásilnění pak nelze touto metodou stanovit.

Jedním z důvodů, který vede k selhání diferenciální lýzy vaginálního stěru, je vysoký stupeň degradace spermií. Proces závisí jednak na době, která uplynula od znásilnění do odebrání vzorku vaginálního stěru, jednak i na individuálním pH a obsahu bakterií ve vagině poškozené. Degradované spermie pak nejsou dostatečně odolné, dochází k jejich předčasné lýze a výsledkem následné analýzy je smíšený profil DNA oběti a pachatele. Proto se od těch metod postupně upouští a jsou nahrazovány modernějšími a dokonalejšími jako je např. laserová mikrodisekce.

Zakoncentrování DNA v roztoku pomocí koncentrátorů

Pomocí komerčně dodávaných koncentrátorů je možné izoláty získané ze vzorků chudých na DNA zakoncentrovat. Na trhu je jich dostupná celá řada a jejich princip je vesměs stejný – jedná se o mechanický filtr tvořený nylonovou membránou s různou velikostí pórů. Během centrifugace jsou zachyceny všechny molekuly větší než „oko“ síta, tedy i DNA. Následným přidáním požadovaného množství pufru, krátkou inkubací, obrácením membrány a rychlou centrifugací je získán potřebný koncentrát. Nevýhodou je, že tímto způsobem neodstraníme kontaminující látky (inhibitory,...), které jsou rovněž větší, než „oka“ membrány. Mezi běžně užívané filtry patří koncentrátoři **Microcon** (Millipore), **Centricon** (Millipore), **VivaSpin** (Vivascience) a další.

6.3.2. Kvantifikace

Kvantifikace je metoda určení koncentrace DNA ve vzorku. Její hodnota je podstatná pro následný krok genetické analýzy – PCR reakci. Kvantifikací lze určit množství izolátu, které použijeme k amplifikaci, tedy jestli izolát musíme zkoncentrovat či zředit, abychom dosáhli co nejkvalitnějšího genetického profilu.

Nejběžnějším způsobem měření koncentrace je stanovování absorbance UV záření. Jedná se o nejjednodušší přístup, který však neumožňuje detekci nukleových kyselin v nízkých koncentracích. Naproti tomu se fluorometrické stanovení nukleových kyselin vyznačuje mnohem vyšší citlivostí, která je vyžadována pro naprostou většinu molekulárně-biologických postupů.

Výchozí počet kopií určitého fragmentu ve vzorku lze rovněž zjistit pomocí kvantitativní PCR. Tato metoda již dnes zahrnuje celou řadu postupů a má mnoho variant.

Podstatou každé této metody je určování množství amplifikovaných kopií, a to buď jednorázově na konci reakce, nebo opakovaně v jejím průběhu. Porovnáním s vhodně zvolenými standardy je pak možné velmi přesně určit výchozí množství specifického fragmentu DNA ve vzorku. Většina těchto postupů však vyžaduje specializované a často velmi nákladné laboratorní vybavení.

Metoda kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) je moderní technika molekulární biologie umožňující rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Stala se tak proto neocenitelným nástrojem pro kvantifikaci genové exprese.

Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce přímo během jejího průběhu (tzv. „v reálném čase“) pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu zvýšením nebo snížením své fluorescenční aktivity. Fluorescence je měřena během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo či nepřímo úměrná množství amplifikátu přítomného v reakční směsi. Kvantifikace se vyhodnocuje prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vnesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu.

Na tomto principu fungují komerční kity firmy Life Technologies, vyvinuté pro forenzní účely:

Quantifiler® Human DNA Quantification Kit – kvantifikuje celkovou lidskou DNA,

Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit – kvantifikuje jen mužskou DNA,

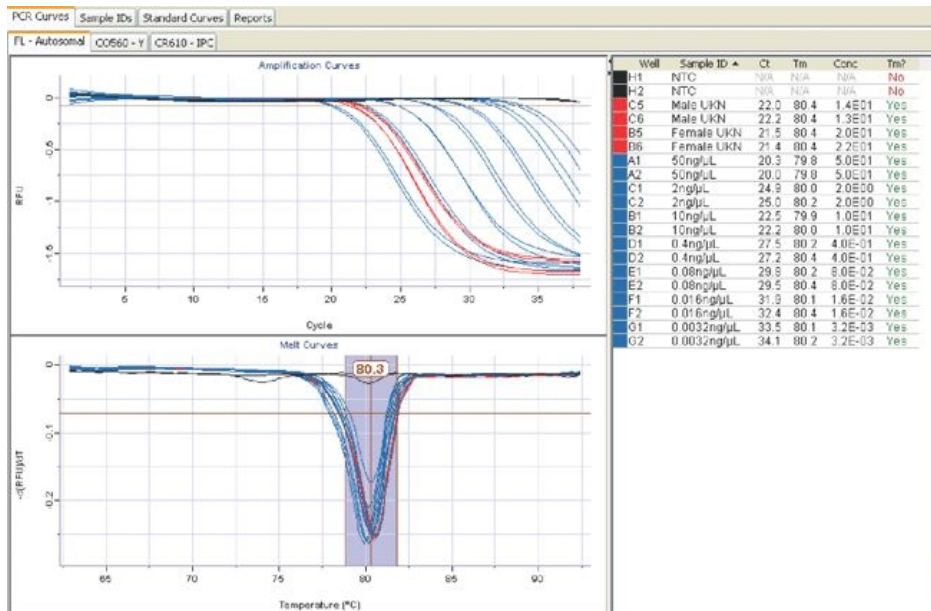
Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit – výhodou tohoto kitu je, že dokáže stanovit mužskou i celkovou DNA v jedné reakci.

Konkurenčním produktem k posledně zmíněnému je **Plexor® HY System** firmy Promega. Je specificky vytvořený pro současné určení koncentrace celkové lidské DNA a mužské DNA.

Kit obsahuje interní PCR kontrolu (IPC) pro testování chybných negativních výsledků, které mohou vzniknout v přítomnosti inhibitorů PCR. Následná analýza křivky tání (melt curve function), nám potvrzuje amplifikaci správného produktu – vytváří tedy ochranu před falešně pozitivním výsledkem.

Plexor® HY System je citlivý multiplexní produkt s konzistentní a reprodukovatelnou detekcí od 6,4 pg celkové DNA. Příprava PCR amplifikace je provedena za pokojové teploty a je kompatibilní s automatizovanými systémy např. Applied Biosystems 7500 (Life technologies) nebo LightCycler® 480 System (Roche). Technologie Plexor® měří redukci fluorescenčního signálu během amplifikace. K amplifikaci je třeba pouze dvou primerů pro každou cílovou sekvenci, jeden z nich obsahuje fluorescenční konec a

modifikovanou bázi. Jak amplifikace postupuje, fluorescence je snižována včleněním zhášedce fluorescence, který se zařadí naproti komplementární modifikované bázi. Zhášedce se nachází v blízkém sousedství k fluorescenčnímu barvivu, které je na konci primeru, takže výsledkem je redukce fluorescenčního signálu. (obr. 4)



Obr. 4. Záznam analýzy Plexor HY z LightCycler® 480plexor2_20090906184617_0.jpg

6.3.3. Amplifikace

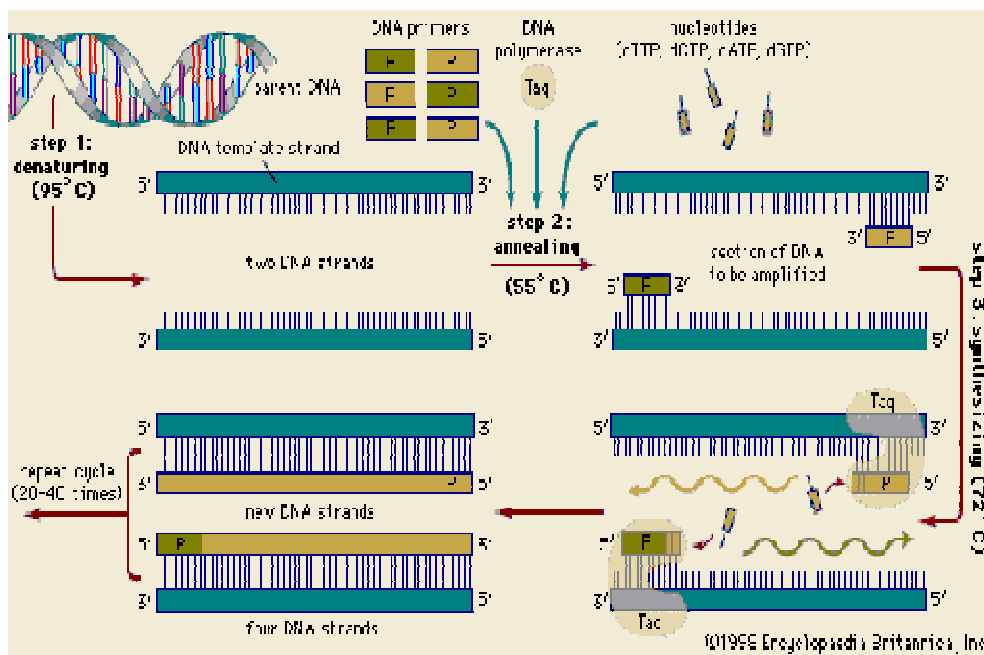
Množství DNA izolované z biologického materiálu je ovšem velice malé a není jednoduché ho geneticky analyzovat. Proto se používá metoda namnožení molekul DNA *in vitro*, tzv. polymerázová řetězová reakce - PCR, kterou mezi metody molekulární biologie zavedl K. B. Mullis v roce 1983 a která byla publikována o dva roky později. Jde o univerzální metodu využívanou k rychlé, přesné a masivní amplifikaci cílových oblastí DNA.

Podstatou PCR je schopnost enzymu ze skupiny DNA-polymeráz opakovaně syntetizovat podle matricové DNA pouze námi vybraný fragment. Toho je dosaženo následujícím cyklickým postupem:

1. Teplotní denaturace dsDNA→ssDNA - aby mohla matricová DNA sloužit jako templát pro syntézu DNA musí být ve stavu, kdy jsou oba komplementární řetězce odděleny.
2. Hybridizace - pro každý z komplementárních řetězců templátu musí být v reakční směsi přítomen primer – krátký úsek DNA, který s ním hybridizuje - nasedá před – kopírovaný úsek. Bez tohoto kroku by DNA-polymeráza nemohla zahájit syntézu připojováním volných nukleotidů na 3' konec.

3. Elongace – nebo-li prodlužování. DNA-polymeráza začne syntetizovat komplementární vlákno. Její nejvyšší aktivita je závislá na optimální teplotě, která je vyšší než teplota hybridizační a nižší než teplota denaturační.

Celý děj se cyklicky opakuje změnou teploty pro jednotlivé výše uvedené kroky – po ukončení elongace následuje denurační krok dalšího cyklu. Jako templátové jsou v ideálním případě vždy využity všechny přítomné řetězce DNA (obr. 5) Ve druhém cyklu jsou syntetizována podle zcela původní matrice další dvě vlákna, navíc ale jsou jako matrice použita i vlákna vzniklá v prvním cyklu. Podle nich syntetizuje polymeráza rovněž nové řetězce, ale posléze se posune na konec matrice a syntézu ukončí. V každém dalším cyklu jsou jako matrice užita opět všechna vlákna – tedy původní „dlouhá“ templátová vlákna, podle nich vzniknuvší „polodlouhá“ vlákna a i ve druhém cyklu vzniklá „krátká“ vlákna. V ideálním případě po 30 cyklech získáme až miliardu kopií z jednoho amplifikovaného úseku DNA (Butler 2005). Celý proces dnes zajišťují automatické přístroje nazývané cyklery.



Obr. 5. Průběh polymerázové řetězové reakce

6.3.4. Fragmentační analýza

Po úspěšné amplifikaci proběhne fragmentační analýza, při které se amplifikační směs DNA separuje podle své velikosti. Fragmentační analýza probíhá v DNA analyzátoru na principu kapilární elektroforézy.

Kapilární elektroforéza (CE)

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám, která využívá pohyb nabitých částic v elektrickém poli v kapiláře naplněné nosným mediem, kterým je například vodný elektrolyt nebo specifický gel. Gel funguje nejen jako nosné medium, ale také jako molekulární síto, které rozděluje nabitě částice podle jejich molekulové hmotnosti (velikosti). Molekuly DNA, které ve vodném roztoku uvolňují H^+ ze svých fosfátových skupin, se stávají záporně nabitým iontem a v elektrickém poli proto putují ke kladné elektrodě. Je-li uvedený pohyb skutečně v nějakém „hustém“ prostředí, jsou v něm fragmenty DNA tím pohyblivější, čím jsou menší.

Při použití komerčních PCR kitů pro forenzní analýzu jsou fragmenty DNA během PCR reakce fluorescenčně značeny pomocí barevně značených specifických primerů. V průběhu jediného běhu kapilární elektroforézy se může současně analyzovat několik různých fragmentů za předpokladu, že se navzájem liší svou délkou nebo jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Nezbytnou součástí každé elektroforézy je zařazení tzv. žebříčku, což je směs fragmentů DNA o definovaných délkách, vůči kterým se pak srovnávají fragmenty vzorku.

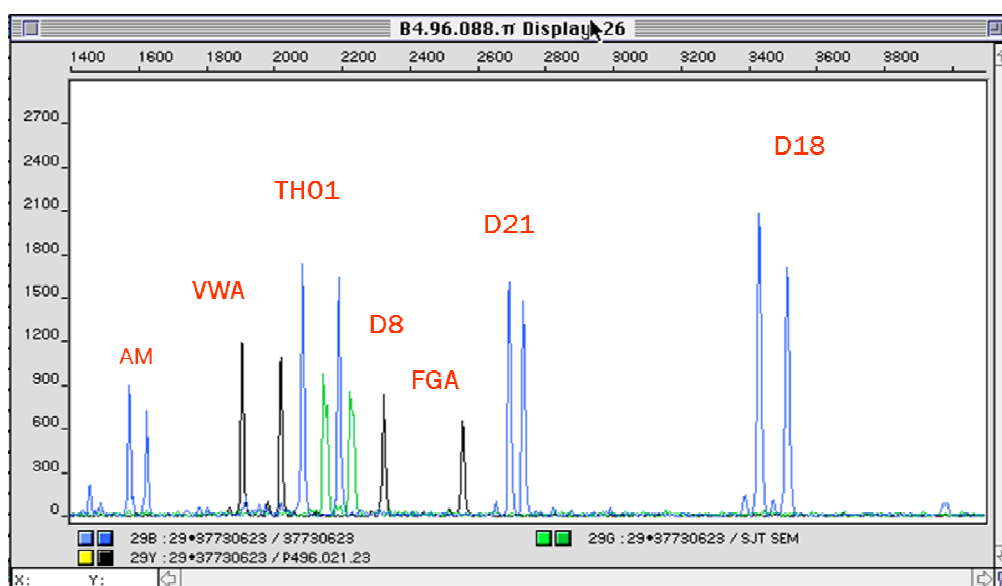
Základními prvky DNA analyzátoru jsou tenké kapiláry, dvě zásobní nádoby a dvě elektrody připojené na zdroj vysokého napětí. CE systémy také obsahují laserový zdroj buzení fluorescence, fluorescenční detektor, autosampler na destičky a počítač, který ovládá nejrůznější parametry analýzy vzorků a jejich detekci. Kapiláry jsou vyrobeny z křemenného skla o vnitřní průměru 50-100 μm a délce 25 až 75 cm. Separační prostředí zajišťuje polymer, který zároveň přispívá k udržení DNA v denaturovaném stavu během analýzy.

Předním výrobcem a dodavatelem přístrojů pro CE je firma Life Technologies. Dnes používaný přístroj ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, případně modifikace ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer obr. umožňují analýzu až 16 vzorků najednou. Stanovení probíhá v mikrodestičkách o 96 jamkách a analýza jedné takovéto desky trvá cca 8 hodin (Butler 2005). Výrobce se snaží vyhovět požadavkům zákazníka a proto nové běžné sekvenátory jsou 8 a 24 kapilárové a dělají se i 96 kapilárové.

Hodnocení elektroforetogramů (primárních dat)

Kapilární elektroforézou se získají hrubá data, která mohou být zobrazena v podobě elektroforetogramu (obr. 6) nebo tabulky. Elektroforetogram ukazuje migraci fluorescenčně značených fragmentů v čase, které putují polymerem působením elektrického pole. Intenzita fluorescence je dána výškou píků a je znázorněna na ose y, osa x pak znázorňuje migrační čas jednotlivých fragmentů, od kterého se odvíjí jejich délka. Fragmenty DNA jsou reprezentovány jednotlivými píky v elektroforetogramu. Čím vyšší

je migrační čas, tím je fragment delší. Tabulka naopak podává přesné kvantitativní údaje. Pro vyhodnocování nasbíraných dat se využívají speciální softwary jako je **Genotyper® Software** (Life Technologies) nebo **GeneMarker** (SoftGenetics).



Obr. 6. Příklad elektroforetogramu

6.3.5. Autozomální STR analýza

V tomto případě se analýza zaměřuje na oblasti s krátkými tandemovými repeticemi (STR oblasti), které vykazují vysokou variabilitu v populaci. STR sekvence se liší nejen v délce opakování daného úseku, ale i v počtu opakování. Často jsou rozděleny do několika kategorií: jednoduché obsahují jednotky stejné délky a sekvence, složené se skládají ze dvou nebo více sousedních jednoduchých jednotek. Analýza autozomálních STR je v dnešní době nejvíce využívanou metodou pro účely stanovení individuální identifikace osob a určování příbuzenských vztahů. Pro tuto oblast zkoumání, ale nejen pro ni, se neustále vyvíjejí nové, komerčně dostupné amplifikační kity. Výhodou metody je potřeba mnohem menšího množství vstupního materiálu (DNA) potřebného pro analýzu a spolehlivější výsledky.

S rozvojem technologií roste počet STR lokusů amplifikovaných v jednom multiplexu. Původní multiplex obsahovaly 3-4 STR lokusy značené stříbrem, dnes používané kity obsahují 16 a někdy i více STR lokusů značených fluorescenčními barvami. Mezi hlavní dva výrobce STR kitů využívaných ve forenzní praxi patří americké firmy Life Technologies a Promega Corporation. Jejich kity se liší nejen v počtu zastoupených lokusů, ale i vnitřním standardem. Kity Applied Biosystems obsahují vnitřní standard se 16 fragmenty DNA, který je značený oranžovou fluorescenční barvičkou LIZ pro pětibarevnou analýzu. Kity PowerPlex® od Promega Corporation obsahují vnitřní standard

Internal Lane Standard 600 (ILS 600), který obsahuje 22 DNA fragmentů v rozpětí 60-600bp a je značen červenou fluorescenční barvou (Butler 2005). Výše popsané platí pro kity PowerPlex® 16 System.

Pokrok v oblasti vývoje amplifikačních kitů jde poměrně rychle kupředu, zejména v souvislosti s požadavkem na mezinárodní porovnávání dat. Nové kity firmy Promega, např. ESI-17 a ESX-17 obsahují tedy již 17 lokusů a vnitřní standard CC5 ILS 500 (podrobněji viz komerční kity Promega).

Příklady komerčních kitů firmy Promega pro STR analýzu

PowerPlex® 16 System

Jedná se o autozomální amplifikační kit, který zahrnuje celkem 16 STR lokusů: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin (pro určení pohlaví). Používá tři fluorescenční barvy (fluorescein, TMR, JOE) a jako vnitřní standard Internal Lane Standard 600 (ILS 600) značený fluorescenční barvou CRX (červená) (Promega 2008).

PowerPlex® ESX a ESI Systems

Firma Promega vyvinula ve spolupráci s ENFSI a EDNAP čtyři nové kity (PowerPlex® ESX 17, PowerPlex® ESI 17, PowerPlex® ESX 16 a PowerPlex® ESI 16) pro použití v evropských laboratořích, z důvodu lepšího porovnávání forenzních vzorků mezi jednotlivými státy. Každý z nich obsahuje pět nových lokusů (mini STR lokusy menší než 125 bp - D10S1248, D22S1045, D2S441, a midi STR lokusy od 125 do 185 bp - D12S391, D1S1656) společně s 11 obvykle využívanými STR lokusy po celé Evropě (D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D2S1338, D3S1358, D16S539, D19S433 a Amelogenin). Kity PowerPlex® ESX 16 a PowerPlex® ESI 16 jsou navrženy stejně jako PowerPlex® ESX 17 a PowerPlex® ESI 17, jediným rozdílem je, že neobsahují lokus SE33. Primery v těchto kitech jsou značeny fluoresceinem, JOE, TMR-ET nebo CRX-ET a vnitřní standard, v tomto případě CC5-labeled Internal Lane Standard 500 (CC5 ILS 500) je značen oranžově. Kity PowerPlex® ESX 16/17 a PowerPlex® ESI 16/17 se liší pouze v uspořádání jednotlivých STR lokusů (Promega 2009a, Promega 2009b).

Příklady komerčních kitů firmy Life Technologies pro STR analýzu

AmpF ℓ STR® Identifiler® Plus

Tento kit zahrnuje celkem 15 lokusů obsahujících tetranukleotidové repetice a amelogeninový systém pro určení pohlaví. AmpF ℓ STR® Identifiler® Plus obsahuje tyto STR lokusy: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF 1PO, D3S1358, TH01, D13S317,

D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, amelogenin, D5S818, FGA. Identifiler® Plus využívá pětibarevné fluorescenční značení, kde je jedna barva - oranžová vyhrazena pro vnitřní standard - GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems 2009a).

AmpFISTR® NGM™

AmpFISTR® NGM™ patří mezi nejnovější kity firmy **Life Technologies** a obsahuje STR lokusy doporučené pro evropské populace na základě spolupráce s ENFSI. Zahrnuje celkem 16 STR lokusů a amelogeninový systém pro určení pohlaví. Jde o deset lokusů běžně stanovovaných (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01 a FGA). Dále amplifikuje tři mini STR lokusy (D10S1248, D22S1045 a D2S441) a dva vysoce polymorfní lokusy (D1S1656 a D12S391). Kit využívá vnitřní standard GS500 Size Standard kompatibilní s GeneMapper softwarem (Applied Biosystems 2009b).

6.3.6. Analýza Y chromozómu

Zvláštní skupinu, které je v souvislosti se sexuálními delikty věnována velká pozornost, tvoří **Y-STR** – krátké tandemové repetice lokalizované na nerekombinantní části chromozomu Y. Jsou děděny pouze v paternální linii a díky nízké mutační frekvenci má syn ve většině případů stejný haplotyp jako jeho otec (kromě případů mutace). Této vlastnosti lze využít k určování otcovství. Ve forenzní praxi je význam Y-STR analýzy spojený s řešením problematiky smíšených vzorků. Typickým je vaginální stěr po znásilnění, kde je masivně zastoupena ženská buněčná frakce. Díky Y-specifické analýze lze detekovat mužskou DNA bez nutnosti diferenciální extrakce (Carracedo 2005). Použitím této analýzy lze tedy amplifikovat pouze Y-STR markery.

Příkladem je kit firmy Promega pro Y-STR analýzu s obchodním názvem **PowerPlex® Y System**, který umožňuje současnou amplifikaci 12 lokusů (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438 a DYS439). Primery specifické pro jednotlivé lokusy jsou značeny Fluoresceinem (FL), TMR nebo JOE a jako vnitřní standard je použit Internal Lane Standard 600 (ILS 600) značený fluorescenční barvou CRX (červená) (Promega 2008).

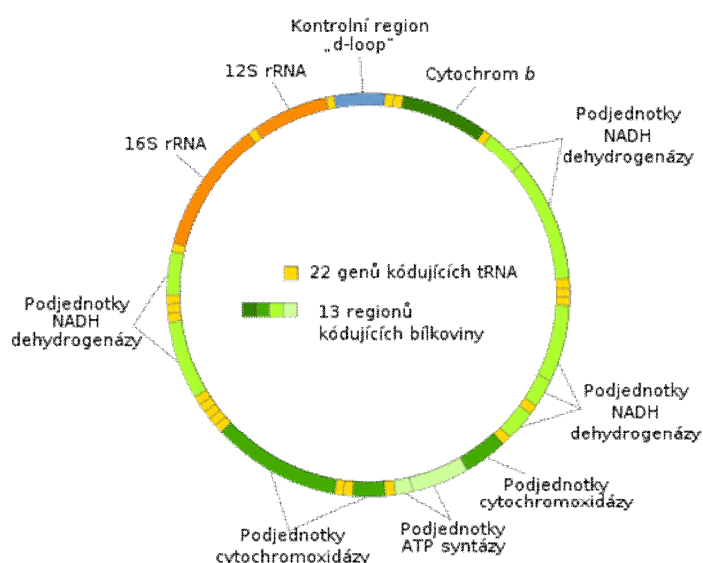
AmpFISTR® Yfiler™

Yfiler™ je kit, který amplifikuje celkem 17 STR lokusů vyskytujících se na nerekombinantní části Y-chromozómu. Jedenáct z nich je doporučeno SWGDAM. DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 a DYS439, zbylých šest lokusů je vysoce polymorfních a jsou to tyto: DYS437, DYS448,

DYS456, DYS458, DYS635 (Y-GATA C4) a Y-GATA H4. Lokusy jsou značeny fluorescenčními barvami 6-FAM, VIC, NED a PET. Poslední barva je vyhrazena pro GeneScan – 500 Size Standard (Applied Biosystems 2006b). Srovnávací studie prokázala vysoký stupeň shodnosti výsledků mezi kitem Yfiler™ (Life Technologies) a PowerPlex® Y (Promega), což umožňuje srovnávání výsledků, i když byly pro analýzu použity rozdílné amplifikační kity. Je to dáno faktem, že Yfiler™ obsahuje 12 shodných lokusů s PowerPlex® Y, liší se tedy jen pěti lokusy, které jsou u Yfiler™ navíc.

6.3.7. Analýza mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (též mtDNA) je označení pro DNA, která se nachází v mitochondriích a tvoří tak součást mimojaderné genetické informace. Uspořádání živočišné mitochondriální DNA je u většiny fylogenetických skupin obdobné, snad s výjimkou některých prvobuněčných organismů, jejichž mtDNA je lineární či smyčkovitá. Typická mtDNA (obr. 7) živočichů je tvořena kružnicovou molekulou dsDNA o délce cca 16-20 kb, obsahuje celkem 37 genů, z toho 24 představují geny pro různou nekódující RNA. Zbývajících 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy podléjící se na enzymatické výbavě mitochondrií. Tyto proteiny jsou využívány během oxidativní fosforylace. Molekula DNA není vázána na žádný bílkovinný nosič typu histonů a je tak vystavena působení látek ve svém okolí (Raplay, Whitehouse 2007). Navíc ve srovnání s jádrem buňky, mají mitochondrie pouze velmi omezené možnosti, jak odstraňovat chyby v DNA. Jediným opravným mechanismem, který se zde uplatňuje, je kontrola zařazení správného nukleotidu během replikace a případná výměna, neboť DNA polymeráza má korekční 3'-5' exonukleázovou aktivitu.



Obr. 7. Příklad molekuly mtDNA

Převzato http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA/ 450px-Mitochondrial_DNA_cs.svg

Analýza mtDNA neposkytuje možnost individuální identifikace jedince, neboť je známo, že drtivá většina mitochondriální genetické informace je děděna pouze po matce – jde o tzv. maternální dědičnost. Je tak používána v následujících případech:

- vzorek neobsahuje jadernou DNA (např. vlas bez vlasové cibulky)
- má být prokázána maternální příbuznost (matka-dítě) – užívá se v kombinaci s analýzou jaderné DNA
- vzorek je již značně degradován a/nebo obsahuje velmi malá množství DNA, nepostačující pro analýzu jaderné DNA

Existuje několik hlavních kroků analýzy mtDNA. Za prvé, je vzorek nutno přečistit. Čištění je velmi důležité, protože ostatní buňky mohou během analýzy snadno kontaminovat vzorek. Obvykle se vzorek ponoří do čistícího prostředku a ultrazvukové lázně. Zuby a kosti jsou broušeny a rozemlety. Prášek je pak umístěn do extrakčního roztoku pro uvolnění buněčného materiálu, včetně mtDNA, z buněk. Druhý krok tedy spočívá v extrakci mtDNA. Toho je dosaženo přidáním směsi chemických látek, které oddělují DNA od ostatních organických molekul. Směs se stočí v ultracentrifuze - mtDNA je soustředěna v horní vrstvě. Třetí krok zahrnuje tzv. PCR (viz. Amplifikace). Následuje sekvenční analýza, která je většinou zaměřena na testování dvou regionů v D-loop oblasti známých jako hypervariable I region (HV1, HVI, nebo HVS-I) a hypervariable region II (HV2, HVII, nebo HVS-II), které obsahují nejrozsáhlejší rozdíly v pořadí nukleotidů mezi jednotlivci v lidské populaci.

Sangerova metoda terminace syntézy je v současnosti asi nejužívanějším způsobem sekvenace. Je založena na specifické modifikaci PCR, kterou označujeme jako *asymetrická PCR*. Asymetrická PCR využívá – na rozdíl od PCR klasické – pouze jeden primer, od něhož jsou nové řetězce DNA syntetizovány. V reakční směsi jsou kromě standardních deoxynukleotidů (dNTP) přítomny tzv. *terminátory* – dideoxynukleotidy (ddNTP), které mají místo deoxyribózy dideoxyribózu – na pentózovém kruhu chybí OH-skupina na uhlíku 3'. Po připojení terminátoru na 3' konec nukleotidového řetězce nemůže být vytvořena vazba s dalším nukleotidem a syntéza řetězce končí. Vzniká tedy řada náhodně dlouhých řetězců, z nichž každý je ukončen terminátorem. Pro sekvenaci jsou dnes již speciálně vyvinuté geneticky modifikované polymerázy, jednotlivé fragmenty jsou značeny fluorescenčně a detekovány pomocí automatizovaných zařízení pro kapilární elektroforézu. Fluorescenčně značeny mohou být buď terminátory nebo primery. Pro cyklickou sekvenci HVI i HVII mtDNA vyrábí firma Life Technologies kit **Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing**.

6.4. Statistické hodnocení

V případech pohlavního zneužívání, ale i znásilnění může dojít k otěhotnění poškozené. Pokud toto není předčasně ukončeno, přistupuje se po porodu ke zjištění pachatele k testu otcovství. Princip stanovení je založen na porovnání genetického profilu dítěte s genetickým profilem domnělého otce. Biologický otec musí předat svému dítěti v každém markeru jednu ze svých dvou alel. Statistické vyloučení otcovství je založeno na srovnání kombinace alel nalezených u dítěte s domnělým otcem. Díky vlivu mutačních změn však ani v případě, kdy dva genetické lokusy neodpovídají, nelze otcovství vyloučit. (Butler 2005). Pokud profily DNA vykazují shodu alespoň jedné alely v každém markeru, lze pravděpodobnost otcovství potvrdit s jistotou přesahující 99 %.

Paternitní index (PI) - srovnává pravděpodobnost, že alelu předal dítěti domnělý otec s pravděpodobností u náhodně vybraných nepříbuzných mužů ze stejné etnické skupiny. Pro výpočet je důležitý zápis nalezených alel matky, dítěte a domnělého otce do tabulky, přiřazení správného vzorce pro výpočet paternitních indexů jednotlivých STR markerů dle kombinace alel matky, dítěte a domnělého otce a dosazení konkrétních populačních frekvencí jednotlivých alel do vzorců.

Celkový (kombinovaný) paternitní index (CPI) – vypočte se vynásobením všech PI - udává, kolikrát je pravděpodobnější, že domnělý otec je biologickým otcem dítěte oproti náhodně vybranému muži z populace

Pravděpodobnost otcovství – jde o převod celkového paternitního indexu dle formule $W = 100 \times CPI / (CPI + 1)$

Výpočet celkového paternitního indexu a pravděpodobnosti udává tabulka 1.

Tab. 1. Př. výpočtu celkového paternitního indexu a pravděpodobnosti

	dítě	matka	otec	vzorec	frekvence alel	paternitní index PI	otcovství
D8S1179	12/12 q	12/14 pq	12/15 pr	1/2q	q12=0,1404	3,561253561	možné
D21S11	28/30 pq	28/28 p	30/31 qr	1/2q	q30=0,2521	1,983339944	možné
D7D820	8/11 pq	11/11 p	8/10 qr	1/2q	q8=0,1648	3,033980583	možné
CSF1PO	12/12 q	11/12 pq	12/12 q	1/q	q12=0,3381	3,047851265	možné
D3S1358	15/17 pq	14/17 pr	15/17 pq	1/2q	q15=0,2536	1,971608833	možné
THO1	7/9 pq	7/9 pq	9/9 q	1/(p+q)	q9=0,1619 q7=0,2178	2,633658151	možné
D13S1338	10/11 pq	9/10 pr	11/11 q	1/q	q10=0,2980	3,355704698	možné
D16S539	9/12 pq	12/12 p	9/13 qr	1/2q	q9=0,1046	4,780114723	možné
D2S1338	25/26 pq	20/26 pr	17/25 ps	1/2q	q25=0,1060	4,716921132	možné
D19S433	14/15 ,2 pq	14/14 p	14,2/1 5,2 ps	1/2q	q15,2=0,0272	18,38235294	možné
vWA	17/18 pq	15/18 pr	15/17 qr	1/2q	q17=0,3450	2,040816327	možné
TPOX	8/8 q	8/8 q	8/8 q	1/q	q8=0,5330	1,876172608	možné
D18S51	11/18 pq	11/14 pr	13/18 qs	1/2q	q18=0,0774	6,45994832	možné
D5S318	11/11 q	11/11 q	11/12 qr	1/2q	q11=0,3926	1,273560876	možné
FGA	19/21 pq	21/23 pr	19/21 pq	1/2q	q19=0,0616	8,116883117	možné
AMG	XY	XX	XY				
p - dítě + matka			celkový paternitní index		120611531,1	CPI	
q- dítě + otec			pravděpodobnost otcovství				
r,s – nenalezeny u dítěte			W=100*CPI/(1+CPI)		99,9999917 %	W	

7 Využití v kriminalistice

7.1. Příklady využití z praxe

Jedním z mediálně známých případů, kdy genetická analýza pomohla k odhalení pachatele, je vražda nezletilé Barbory Němečkové z Kmetiněvsi. Třináctiletá žačka byla nalezena mrtvá okolo 23:00 hodin dne 1. ledna 2004 u potoka nedaleko silnice mezi obcemi Černuce a Velvary. Ze zajištěných stop se podařilo úspěšně analyzovat pouze jeden ze vzorků, označený jako nečistota za nehty levé ruky poškozené. Výsledkem byl smíšený profil DNA - poškozené a osoby mužského pohlaví. V počátcích vyšetřování bylo natypováno několik možných podezřelých, ale genetická analýza je jako pachatele vyloučila. A tak bylo, i díky ochotě občanů z blízkého okolí pomoci s vyšetřováním, v historii české kriminalistiky, překročeno k prvnímu plošnému odběru tzv. „screeningu“ bukálních stěrů (Straus a kol. 2006). Přestože valná většina mužů dobrovolně odevzdala svůj vzorek DNA, stále nedošlo k posunu v případě. Proto bych okruh podezřelých rozšířen i na osoby mladší 15 let. Počet odebraných vzorků se vyšplhal až na číslo 650. Nakonec se úspěch dostavil a vzorek 632 odhalil pachatele. Patřil spolužákovi zavražděné a jeho profil se shodoval s profilem ze stopy.

Jiným případem je pak vražda matky a dcer Kudláčkových z obce Klučov na Kolínsku, ubodaných v dubnu 1990. Poloha mrtvých žen a jejich od pasu dolů svlečené spodní prádlo pak jednoznačně svědčily o tom, že vrahem byl muž a útočil ze sexuálních pohnutek. Soudní pitvy zavražděných žen jen potvrdily předpokládanou příčinu smrti. Rozhodujícím a po léta jediným důkazem bylo sperma nalezené soudními znalci v genitáliích nejmladší ženy. Znalci však nedokázali zodpovědět otázku, zdali se tam ocitlo před dívčinou smrtí, v její době, nebo po ní. Sperma, jakož i další biologické stopy z místa činu putovaly do mrazicích boxů k dalšímu možnému využití. To přišlo s nástupem analýzy DNA. Pátrání po pachateli trojnásobné vraždy, bylo vedeno několika směry, ale postupně byli všichni podezřelí jako možní vrazi vyloučeni. Až na jaře 2003 zatkli brněnští kriminalisté Jaroslava Gančarčíka (35), kterého podezírali ze série znásilnění brněnských žen. V minulosti byl celkem jedenáctkrát trestán pro mravnostní a násilné trestné činy. V průběhu trestu mu byl odebrán srovnávací vzorek k určení genetického profilu, který byl zanesen do policejní databáze DNA. Tam jsou ukládány i profily DNA geneticky analyzovaných biologických stop z dosud neobjasněných závažných trestných činů. Součástí tedy byl i profil DNA spermatu z Klučova. Jen byly informace o Gančarčíkovi do databáze vloženy, byla nalezena shoda. Tak se podařilo po třinácti letech zjistit muže, který byl skutečným trojnásobným vrahem.

7.2. Databáze DNA

Policejní Národní databáze DNA vznikla na základě ZP PP č.88/2002. Jde o počítačový informační systém obsahující informace o vzorcích a profily DNA. Národní databáze DNA se skládá ze dvou elektronických databází.

První část tvoří databázový systém INFO – DNA, kde jsou vedeny osobní údaje o evidovaných osobách poskytujících srovnávací vzorky k analýze DNA, dále pak podrobný popis zajištěných biologických stop a průběh jejich zpracování. Každému vzorku je v tomto systému automaticky přiřazen tzv. jedinečný identifikátor, pod kterým je pak vzorek ukládán do systému CODIS.

Druhou část Národní databáze tvoří elektronický databázový systém CODIS (**C**ombined **D**NA **I**ndex **S**ystem). Na Kriminologický ústav byl instalován v prosinci 2001 odborníky z FBI a ostrá verze databáze zde funguje od června 2002.

V tomto systému jsou evidovány pod různými kategoriemi profily DNA získané ze stop z dosud neobjasněných případů, od osob obviněných, odsouzených, z těl mrtvol neznámé totožnosti, od osob příbuzných k pohřešovaným, od osob pracujících v laboratořích, případně osob přicházejících do styku se zkoumaným biologickým materiálem (tzv. eliminační vzorky). Systém umožňuje porovnávat buď jednorázově jeden vybraný profil proti určité kategorii či celku, kategorii proti kategorii či celku a v neposlední řadě vše proti všemu.

8 Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vytvoření přehledu vývoje v zajišťování a analýze biologických stop v případech sexuálního násilí. Tento cíl byl splněn, během zpracování jsem se seznámila s klasickými i nejnovějšími metodami zajišťování, uchovávání a analýzy biologických stop v případech sexuálního násilí. Podrobně je zde popsáno zpracování standardních i problematických vzorků jak kriminalistickou biologickou, tak i genetickou expertízou.

Kriminalistická genetická expertíza je dnes jedním z nejpožadovanějších stanovení v rámci vyšetřování trestných činů. Na oddělení genetiky na Kriminalistický ústav Praha přichází cca 18 500 požadavků ročně, z toho je cca 3500 požadavků se stopami a cca 15 000 samostatných kontrolních bukalních stěrů. A to i přesto, že analýza DNA je časově, finančně, personálně i technicky dosti náročná. Samotné zpracování jednoho vzorku trvá v optimálních podmínkách několik hodin. U složitějších vzorků, jako jsou vzorky malé, smíšené či degradované, trvá zpracování až několik týdnů z důvodu opakování analýzy. Trendem je samozřejmě zkvalitnění a zrychlení služeb, čemuž i v tomto odvětví napomáhá zavádění automatických pipetorů (Biomek® 3000 firmy Promega) a izolačních robotů (BioRobot Universal System firmy QIAGEN).

Z příkladů z praxe je patrné, jak neocenitelnou pomocí je v dnešní době analýza DNA při odhalování těch nejzávažnějších trestných činů. Díky neustálému rozvoji této forenzní disciplíny je možné pracovat s minimálním množstvím biologického materiálu a přesto vydávat úspěšné závěry v rovině individuální identifikace. Zejména pak u smíšených vzorků poškozená - pachatel, dosahujeme díky novým metodikám zajišťování a speciálním kitům, velmi dobrých výsledků. A to zejména v oblasti získání čistého profilu z mužské frakce.

9 Použité zdroje

Použitá literatura

- BŘEZINA, M., LAUPY, M., MAKOVEC, P., *Stopy a srovnávací materiály pro biologickou expertizu*, Odborná sdělení Kriminalistického ústavu, č. 2, Praha, 1994., s. 33-41
- BUTLER, J., M., *Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, 2005, ISBN 0-12-147952, s. 65, 320 - 345
- CARRACEDO, A., *Forensic dna typing protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005, ISBN 1-59259-867-6, s. 67 – 70
- FIŠER, J. a spol., *Pokroky v kriminalistice*, 1. vydání, Praha, 2006, ISBN 80-7251-214-5, s. 16-23
- HLAVÁČEK, J., PROTIVINSKÝ, M. a kol., *Praktická kriminalistika*, 1. vydání, KÚP Praha, Praha, 2006, ISBN – nepřiděleno
- KOČÁREK, E., *Molekulární biologie v medicíně*, 1. vydání, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, Brno, 2007, ISBN 978-80-7013-450-4, s. 33-35
- KOUT, M., MÁJSKÝ, A., HERZOG, P., *Sérologické vyšetřovací metody v imunohematologii*, 1. vydání, Státní zdravotnické nakladatelství Praha, 1964, s. 78 - 88
- LAUPY, M., *Kriminalistická biologie, sérologie*, 2. vydání, KÚP Praha, 1987, s.23 – 24, 41, 68, 76 - 77
- LAUPY, M., MAKOVEC, P., *Vědecká sdělení, Detekce spermatu fosfátovou orientační zkouškou*, KÚP Praha, 1994, s. 34-39
- MUSIL, J., KONRÁD, Z., SUCHÁNEK, J., *Kriminalistika*, 2. přepracované vydání, C. H. Beck, Praha, 2004, ISBN 80-7179-878-9, str. 173 – 174
- RAPLEY, R., WHITEHOUSE, D., *Molecular Forensics*, 1st edition, Wiley, 2007, ISBN 978-0-470-02495-9 HB, s. 128 – 134
- STRAUS a kolektiv, *Kriminalistika, kriminalistická technika*, 1. vydání, Policejní akademie ČR a Kriminalistický ústav Praha, 2006, ISBN 80-7251-165-3, s.25, s.83
- ŠEDA, O., LIŠKA, F., ŠEDOVÁ, L., *Aktuální genetika - Multimediální učebnice lékařské biologie, genetiky a genomiky*, Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN © 2005 – 2006
- ŠIMSA, D., SKOPAL, J., *Chemické Listy*, Gymnázium Josefa Jungmanna, Litoměřice, 2008, s. 1017-1019
- TESAŘ, J., KLÍR, P., *Vyšetřování stop biologického původu*, 1.vydání, Praha, 1990, str. 44, 57, 72
- WEISS, P., ZVĚŘINA, J., *Sexuální chování v ČR – situace a trendy*, 1.vydání, Praha 2001

ZVĚŘINA, J., *Sexuologie (nejen) pro lékaře*, 1. vydání, Brno, 2003, ISBN 9788072042647

Materiály komerčních firem

Promega Corporation, 2008a, PowerPlex® 16 System - Instructions for Use of Products DC6530 and DC6531, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd012/tmd012.pdf>.

Promega corporation, 2009a, PowerPlex® ESX 17 System - Instructions for Use of Products DC6720 and DC6721, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd024/tmd024.pdf>.

Promega Corporation, 2009b, PowerPlex® ESI 17 System - Instructions for Use Of Products DC6780 and DC6781, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd028/tmd028.pdf>.

Applied Biosystems 2006a, AmpFISTR® Identifiler®PCR Amplification Kit, User's Manual,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041201.pdf .

Applied biosystems 2006b, AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit, User's Manual,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041477.pdf.

Applied Biosystems 2009b, AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit, User's Guide,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_074250.pdf.

Promega Corporation, 2008b, PowerPlex® Y System - Instructions for Use of Products DC6760 and DC6761, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd018/tmd018.pdf>

QIAamp DNA Mini Kit, For isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite, or viral DNA, Product details
<http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnaminikit.aspx#Tabs=t1>

Promega, DNA IQ™ System
<http://www.promega.com/products/pm/genetic-identity/dna-iq/dna-iq/>

Promega, Differex™ System—For Use With the Differex™ Magnet, Technical Manual
<http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/101/differex-system-for-use-with-the-differex-magnet-protocol/>

IFI Independent Forensic, Sperm HY-LITER, Documentation
http://www.spermhy-liter.com/sperm_documents.php

Internetové zdroje

Počátky forenzní genetiky. Poslední revize 22.8.2011

<http://www.cssfg.org/cz/1112/historie-forezni-genetiky/,posledni> [cit. 2011-04]

JEDLIČKA, M., *Milan Lubas - sexuální agresor a vrah*. Poslední revize 18. července 2011

<http://www.kriminalistika.eu/muzeumzla/lubas/lubas.html>, [cit. 2010-11]

Genom. Poslední revize 23. dubna 2006

<http://wiki.medik.cz/wiki/Genom>, [cit. 2011-01]

Genetické haraburdí - repetitivní DNA, Tandemové repetice. Poslední revize 22. listopadu 2006

http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/repetitivni_dna.htm#tandem, [cit. 2010-11]

BLUESTAR FORENSIC. Poslední revize 22. srpna 2011

www.krimi-ltsezam.cz (technika pro kriminalisty), [cit. 2010-10]

Crimelite. Poslední revize 7. ledna 2010

www.elmes.cz/daktyloskopie.html#crimelite, [cit. 2010-10]

Compare BLUESTAR® FORENSIC to other reagents. Poslední revize 22. srpna 2011

www.bluestar-forensic.com, [cit. 2010-10]

ACP – kyselá fosfatáza. Poslední revize 29. července 2011

<http://zdravotnictvi.studentske.cz/2008/07/acp-kysel-fosfata.html>, [cit. 2011-05]

Rychlé testy speciálně vyvinuté pro kriminalistiku. Poslední revize 15. dubna.2009

<http://www.bangco.cz/Down/KRIMINALISTIKA.pdf>, [cit. 2010-11]

Molekulární biologie, Sperm HY-LITER. Poslední revize 22. srpna 2011

<http://www.dynex.cz/molekularni-biologie>, [cit. 2011-06]

Nová generace laserové mikrodisekce. Poslední revize 2.května 2005

<http://www.iolympus.cz/mikroskopy/prospekty/CellCut.pdf>, [cit. 2011-06]

Izolace nukleových kyselin. Poslední revize 24. června 2004

<http://biologie.upol.cz/metody/Izolace%20nukleovych%20kyselin.htm>, [cit. 2010-11]

Genetické testování identity, Forenzní analýza / Kvantifikace DNA/ Plexor HY. Poslední revize 22. srpna 2011

<http://www.eastport.cz/plexor-hy-system.html>, [cit. 2011-06]

Mitochondriální DNA. Poslední revize 19. srpna 2011

http://cs.wikipedia.org/wiki/Mitochondri%C3%A1ln%C3%AD_DNA, [cit. 2011-04]

World of Forensic Science, *Mitochondrial DNA Analysis*. Poslední revize 22. srpna 2011

<http://www.enotes.com/forensic-science/mitochondrial-dna-analysis>, [cit 2011-04]

Současné metody paternitních analýz

<http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:hOUlt9sGCP4J:kgn.umbr.cas.cz/prednasky/245%2520Genetika%2520cviceni/Cv13-Paternity.pdf>, [cit 2011-04]

Vrazi.cz, Fenomén masových vražd, Zaváté stopy. Poslední revize 18. července 2011
<http://www.vrazi.cz/?item=5-zavate-stopy>, [cit. 2011-02]

JEDLIČKA, M., *Vraha tří žen našli kriminalisté po třinácti letech. Díky DNA*, 20. září 2008. Poslední revize 22. srpna 2011
http://brno.idnes.cz/Brno-zpravy.aspx?c=A080920_1051265_brno_taj, [cit. 2011-05]

77 případů z historie sexuální vraždy v Čechách, na Moravě a ve Slezsku v letech 1926-1999 - 5.díl, Tři ženy, dva šálky, (1990). Poslední revize 22. srpna 2011
<http://www.vrazi.cz/?item=77-pripadu-z-historie-sexualni-vrazdy-v-cechach-na-morave-a-ve-slezsku-v-letech-1926-1999-5-dil>, [cit 2011-05]

Persefona o. s., *Stop znásilnění, Analýza stavu pomoci obětem znásilnění v České republice*. Poslední revize 15. února 2010
<http://persefona.cz/download/analyzaStopZnasilneni.pdf>, [cit. 2011-02]

Národní databáze DNA a odběr biologického materiálu obviněným. Poslední revize 22. srpna 2011
http://www.ippravnik.cz/cz/clanky/trestni-pravo/art_3732/narodni-databaze-dna-a-odber-biologickeho-materialu-obvinenym.aspx, [cit. 2011-06]

Trestní zákon – § 241 zák .Oddíl druhý: Trestné činy proti lidské důstojnosti , § 235 Vydírání. Poslední revize 22. srpna 2011
<http://zakony-online.cz/?s4&q4=3> [cit 2010-11]

Purin. Poslední revize 22. srpna 2011
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Purin> [cit 2011-01]

Pyrimidin. Poslední revize 20. července 2011
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Pyrimidin> [cit 2011-01]

amyláza. Poslední revize 22. srpna 2011
<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Amyl%C3%A1za> [cit 2011-03]

Dodecylsíransodný. Poslední revize 20. července 2011
http://cs.wikipedia.org/wiki/Dodecyls%C3%ADran_sodn%C3%BD [cit 2011-02]

Soubor metodik a laboratorních protokolů používaných v laboratoři Aplikované molekulární biologie. Poslední revize 12. září 2003
http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/lamb/e-amos/metod_mb.pdf [cit 2011-04]

Digest Buffer. Poslední revize 2. února 2006
<http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/38083.html0> [cit 2011-04]

Sangerova metoda terminace syntéz. Poslední revize 24. června 2004
<http://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.htm> [cit 2011-04]

Genetická expertiza v kostce, prezentace KÚP, vytvořeno 9. února 2011
[Genetickaexpertizavkostce.pdf](#)