

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Charakteristika DNA ve forenzních vzorcích**

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Magdalena Fišerová**  
Osobní číslo: **C19218**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Charakteristika DNA ve forenzních vzorcích**  
Téma práce anglicky: **Characteristics Of DNA In Forensic Samples**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o zadaném tématu.
- 2) Definujte téma z hlediska genetického a forenzního.
- 3) Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.  
Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem „*Charakteristika DNA ve forenzních vzorcích*“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

Magdalena Fišerová v.r.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Lucii Stříbrné Ph.D. za ochotu, přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu psaní této práce.

## **ANOTACE**

DNA každého jedince obsahuje mnoho sekvencí, které jsou v populaci variabilní, a díky nim je možné geneticky spolehlivě odlišit jednoho člověka od druhého. Těchto odchylek využívá forenzní genetická analýza při stanovování jedinečného DNA profilu, který napomáhá při mnoha soudních řízeních.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Forenzní genetika, typizace DNA, DNA profil, identifikace osob, testy paternity, trestné činy

## **TITLE**

Characteristics of DNA in forensic samples

## **ANNOTATION**

The DNA of each individual contains many sequences that are variable in the population, and thanks to them it is possible to genetically reliably distinguish one person from another. These variations are used by forensic genetic analysis to establish a unique DNA profile that aids in many court cases.

## **KEYWORDS**

Forensic genetics, DNA typing, DNA profile, identification of persons, paternity tests, crimes

# OBSAH

<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>10</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....</b>	<b>11</b>
<b>TERMINOLOGIE.....</b>	<b>13</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>21</b>
<b>1 FOREZNÍ VĚDY .....</b>	<b>22</b>
<b>2 FOREZNÍ GENETIKA.....</b>	<b>23</b>
2.1 První použití forezní DNA analýzy.....	23
2.2 První usvědčení analýzou DNA u nás.....	24
<b>3 DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA.....</b>	<b>26</b>
3.1 Struktura deoxyribonukleové a ribonukleové kyseliny.....	26
3.2 Uložení deoxyribonukleové kyseliny.....	27
3.2.1 Chromozómy .....	27
3.3 Funkce deoxyribonukleové kyseliny.....	28
3.3.1 Transkripce .....	29
3.3.2 Translace.....	29
3.3.3 Replikace .....	30
<b>4 BIOLOGICKÉ STOPY.....</b>	<b>31</b>
4.1 Určení původce stopy.....	31
4.2 Odběr, kontaminace a degradace biologických stop.....	32
<b>5 ANALÝZA DNA.....</b>	<b>34</b>
5.1 Extrakce (Izolace) DNA.....	34
5.2 DNA kvantifikace .....	36
5.3 DNA Amplifikace .....	38
5.4 Forezní typizace DNA.....	39
5.4.1 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů.....	40
5.4.2 Krátké tandemové repetice .....	41
5.4.3 Jednonukleotidové polymorfismy.....	44
5.4.4 Analýza mitochondriální DNA.....	45
5.4.5 Sekvenování nové generace.....	47

<b>6</b>	<b>INTERPRETACE FORENZNÍCH DAT .....</b>	<b>48</b>
	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>52</b>
	<b>ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>59</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

<b>Obr. 1</b> - Porovnání výsledků STR typizace jednoho heterozygotního lokusu vzorku z jednoho zdroje.....	36
<b>Obr. 2</b> - Výsledky DNA testování v případě znásilněné ženy.....	43
<b>Obr. 3</b> - Stanovení DNA profilů pomocí čtyř markerů při paternitním testování.....	43
<b>Tab. 1</b> - Lokusy obsažené v ESS (Evropa) .....	44
<b>Tab. 2</b> - Lokusy obsažené v CODIS Core Loci (USA).....	44

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>A</b>	adenin	adenine
<b>AMK</b>	aminokyselina	amino acid
<b>C</b>	cytosin	cytosine
<b>CE</b>	kapilární elektroforéza	Capillary Electrophoresis
<b>CODIS</b>	kombinovaný systém indexů DNA	Combined DNA Index System
<b>CR</b>	kontrolní oblast	control region
<b>ddATP</b>	dideoxyadenin 5'-trifosfát	dideoxyadenosine 5'-triphosphate
<b>ddCTP</b>	dideoxycytosin 5'-trifosfát	dideoxycytidine 5'-triphosphate
<b>ddGTP</b>	dideoxyguanin 5'-trifosfát	dideoxyguanosine 5'-triphosphate
<b>ddNTP</b>	dideoxynukleotidtrifosfát	dideoxynucleoside-triphosphate
<b>ddTPT</b>	dideoxytymin 5'-trifosfát	dideoxythymidine 5'-triphosphate
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
<b>dNTP</b>	deoxynukleotidtrifosfát	deoxynucleoside-triphosphate
<b>ESS</b>	Evropský standardní soubor	European Set of Standards
<b>G</b>	guanin	guanine
<b>HSE</b>	haplotypově specifická extrakce	Haplotype-Specific Extraction
<b>HV-I</b>	hyper-variabilní region I	Hyper-Variable regions I
<b>HV-II</b>	hyper-variabilní region II	Hyper-Variable regions II
<b>HVR</b>	hyper-variabilní region	Hyper-Variable region
<b>LR</b>	poměr pravděpodobnosti	likelihood ratio
<b>MPS</b>	masivně paralelní sekvenování	Massive Parallel Sequencing
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA	messenger RNA
<b>mtDNA</b>	mitochondriální DNA	mitochondrial DNA

<b>nDNA</b>	jaderná DNA	nuclear DNA
<b>NSG</b>	sekvenování nové generace	Next-Generation Sequencing
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce	Polymerase Chain Reaction
<b>pre-mRNA</b>	prekurzorová mRNA	precursor mRNA
<b>qPCR</b>	kvantitativní polymerázová řetězová reakce	quantitative PCR
<b>RFLP</b>	polymorfismus délky restrikčních fragmentů	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina	ribonucleic acid
<b>rRNA</b>	ribozomální RNA	ribosomal RNA
<b>SNP</b>	jednonukleotidový polymorfismus	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SS</b>	Sangerovo sekvenování	Sanger sequencing
<b>STR</b>	krátké tandemové repetice	Short Tandem Repeats
<b>T</b>	tymin	thymine
<b>tRNA</b>	transferová RNA	transfer RNA
<b>U</b>	uracil	uracil
<b>VNTR</b>	variabilní počet tandemových repetice	Variable Number of Tandem Repeats

## TERMINOLOGIE

<b>Alela</b>	jedna z konkrétních forem genu
<b>Amplifikace DNA</b>	proces, jehož výsledkem je zvýšení počtu kopií molekuly DNA nebo DNA sekvence (plazmidu, části chromozómu, vektoru, DNA fragmentu)
<b>Annealing</b>	připojení určitého úseku řetězce nukleové kyseliny ke druhému komplementárnímu vlákně
<b>Antikodón</b>	specifický triplet na tRNA, jehož prostřednictvím se tRNA přechodně váže ke komplementárnímu kodónu na mRNA
<b>Antiparalelní orientace</b>	uspořádání řetězců v opačné orientaci ve dvouřetězcové DNA nebo RNA
<b>Autoradiografie</b>	identifikace, lokalizace a měření množství radioaktivních látek ve zkoumaných objektech při kontaktu s fotografickou emulzí, laboratorní metoda, při níž citlivý fotografický film zachycuje radioaktivní alfa či beta, event. světelné chemiluminiscence záření vydávané zkoumaným objektem
<b>Autozóm</b>	somatický nepohlavní chromozóm
<b>Bukální stěr</b>	stěr ze sliznice vnitřní strany tváře v ústech
<b>Degradace</b>	snížení hodnoty, znehodnocení, přeměnu složitější sloučeniny v jednodušší neboli funkční sloučeniny v nefunkční
<b>Denaturace DNA</b>	rozpojení obou komplementárních řetězců a vznik jednovláknové DNA
<b>Diploidní</b>	obsahující dvě sady chromozómů, jednu od matky, druhou od otce

<b>DNA fingerprinting</b> = DNA typizace = DNA profilování	stanovení DNA profilu jedince
<b>DNA polymeráza</b>	enzym syntetizující DNA, k zahájení syntézy potřebuje primer
<b>DNA profil</b>	charakteristický profil malých polymorfních fragmentů DNA nebo proteinů
<b>Elektroforéza</b>	metoda umožňující rozdělit látky v elektrickém poli podle jejich velikosti a náboje, pohyb částic v elektrickém poli k anodě nebo katodě
<b>Endonukleáza</b>	heterogenní skupina enzymů, které štěpí vazby mezi nukleotidy jednořetězcové nebo dvouřetězcové DNA nebo RNA
<b>Exon</b>	část kódující sekvence DNA, která je přítomna ve zralé mRNA eukaryot
<b>Exprese</b>	pozorované efekty aktivního genu
<b>Extrakce</b>	vynětí, vytažení
<b>Forenzní antropologie</b>	vědní obor zabývající se zejména zkoumáním lidské kostry nebo jejích částí pro potřeby identifikace
<b>Forenzní balistika</b>	odvětví balistiky zabývající se analýzou pohybu střel a funkčních změn na nich v souvislosti s vyhledáváním, zkoumáním a zajišťováním důkazů
<b>Forenzní digitální analýza</b>	oblast forenzní vědy, která se zabývá získáváním, ukládáním a analýzou elektronických dat, která mohou být užitečná při vyšetřování trestných činů, to zahrnuje informace z počítačů, pevných disků, mobilních telefonů a dalších zařízení pro ukládání dat

<b>Forenzní entomologie</b>	nauka o přítomnosti hmyzu v závislosti na době uplynulé od smrti oběti
<b>Forenzní genetika</b>	vědní obor využívající znalostí z obecné, molekulární genetiky k provádění genetických zkoumání pro nejrůznější důkazní účely, zejména poté soudní
<b>Forenzní vědy</b>	vědy aplikující vědecké poznatky na právní problémy
<b>Gen</b>	dědičný faktor, který tvoří jednotku genetické informace, odpovídající úseku DNA, který kóduje syntézu polypeptidového řetězce nebo molekuly RNA
<b>Genealogický výzkum</b>	zkoumání rodokmenů, historie původu a příbuznosti jedince či rodiny
<b>Genetický marker</b>	polymorfní sekvence DNA, která může být použita k odlišení rodičovského původu alel
<b>Genom</b>	soubor všech struktur nesoucích genetickou informaci ve formě DNA, je tvořen chromozómy uloženými v buněčném jádře
<b>Genotyp</b>	celková genetická informace jedince nebo buňky
<b>Gonozóm</b>	pohlavní chromozóm
<b>Haploidní</b>	obsahující jen jednu sadu chromozómů
<b>Haplotyp</b>	skupina alel ve dvou nebo více silně vázaných lokusech
<b>Helikáza</b>	enzym, který rozplétá a odděluje vlákna DNA dvoušroubovice rozrušením vodíkových můstků, uplatňuje se zejména při replikaci
<b>Heterozygotní</b>	mající dvě různé alely v daném genetickém lokusu
<b>Histon</b>	protein v nukleozómu asociovaný s chromozómem
<b>Homozygotní</b>	mající identické alely v daném genetickém lokusu

<b>Chromatin</b>	barvitelná hmota interfázního jádra eukaryotické buňky složená z dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy
<b>Chromozóm</b>	struktura nesoucí geny složená z chromatinu a viditelná v průběhu dělení jádra jako vláknitá nebo tyčkovitá tělíska, obsahují DNA, histony a nehistonové bílkoviny kyselého charakteru
<b>Indigo</b>	modré barvivo původně z rostlin <i>Indigofera</i> , nyní včetně mnoha derivátů vyráběné synteticky
<b>Inhibitor</b>	látko schopná tlumit určitý děj
<b>Intron</b>	segment nekódující DNA uvnitř genu, je přepisován, ale následně odstraněn z primárního RNA transkriptu před translací
<b>Izolát</b>	produkt izolace
<b>Karyotyp</b>	kompletní chromozomální sada buňky, jedince, nebo druhu
<b>Kodón</b>	sekvence tří nukleotidů (triplet) v DNA nebo RNA kódující určitou aminokyselinu nebo signál k ukončení translace
<b>Kódující řetězec</b>	DNA řetězec mající stejnou sekvenci jako transkribovaná RNA daného genu, je komplementární k antiparalelnímu pracovnímu řetězci, který slouží jako templát pro syntézu RNA
<b>Komplementarita</b>	doplňkovost, schopnost se doplnit, u řetězců nukleových kyselin je dána specifickým párováním bází A-T, resp. A-U, G-C pomocí vodíkových můstků
<b>Kontaminace</b>	znečištění
<b>Kyselina huminová</b>	kyselina, která je obsažena v půdě

<b>Lokus</b>	místo na chromozómu, kde je lokalizován určitý gen
<b>Mapování</b>	různé metody zjištění pozice genu na chromozómu nebo jeho relativní vzdálenosti od ostatních genových lokusů a jejich pořadí
<b>Laserová mikrodisekce</b>	technologie zajišťující oddělení příslušných objektů od ostatního biologického materiálu pomocí laserového paprsku a přenesení světelným pulzem do čisté zkumavky
<b>Minisekvenování</b>	metoda prodlužování primeru specifického pro určitou alelu pomocí dideoxynukleotidtrifosfátu (ddNTP) značeného fluorescenčním barvivem.
<b>Mitochondrie</b>	buněčné organely obsahující DNA, důležité z hlediska energetického metabolismu buňky a organismu
<b>Monosacharid</b>	jednoduchý sacharid, tvořený šesti uhlíky, označuje se jako hexosa
<b>Non-humánní DNA</b>	DNA nepocházející od člověka
<b>Nukleotid</b>	základní stavební kámen polynukleotidového řetězce vytvářejícího nukleovou kyselinu, skládá se z purinové nebo pyrimidinové báze, cukru a fosfátové skupiny
<b>Nukleová kyselina</b>	molekula, jako například DNA a RNA, ve které je uložena genetická informace
<b>Nukleozóm</b>	podjednotka chromatinu skládající se z DNA obtočeného okolo histonových proteinů v definovaném prostorovém rozložení
<b>Okazakiho fragmenty</b>	krátké jednořetězcové úseky DNA, které jsou syntetizované na opožděném vlákně DNA během replikace



<b>Opožd'ující se řetězec</b>	nový řetězec DNA vznikající replikací z 3'-5' řetězce DNA, je syntetizován ve formě krátkých fragmentů ve směru 5'-3', které jsou následně spojeny
<b>Parciální náboj molekuly</b>	částečný náboj
<b>Paternitní zkoumání</b>	testování otcovství
<b>Polymerázová řetězová reakce</b>	technika reprodukce dané DNA sekvence
<b>Polymorfismus</b>	existence více než jedné alelické varianty v genetickém lokusu
<b>Polynukleotid</b>	polymer, s mononukleotidy spojenými navzájem fosfodiesterovými vazbami
<b>Primer</b>	krátký DNA nebo RNA oligonukleotid, který se specificky váže na cílovou sekvenci a umožňuje zahájení syntézy komplementárního řetězce
<b>Proteosyntéza</b>	tvorba bílkovin z aminokyselin
<b>Rehydratace buněk</b>	obnovení ztráty vody v buňkách
<b>Repetice</b>	repetitivní sekvence
<b>Replikace</b>	identické zdvojení DNA dvoušroubovice buněčným dělením
<b>Replikační vidlice</b>	oddělení vláken DNA dvoušroubovice, ve které probíhá replikace
<b>Restrikční endonukleáza</b>	endonukleáza, která štěpí DNA ve specifické sekvence
<b>Sekvence</b>	pořadí nukleotidů v genu nebo aminokyselin v proteinu
<b>Sekvenování</b>	určení pořadí nukleotidů v genu nebo aminokyselin v proteinu

<b>Semikonzervativní replikace</b>	jeden DNA řetězec je kompletně zachován, druhý je nově syntetizován
<b>Sonda</b>	definovaný jednořetězcový fragment DNA nebo RNA, označený fluorescenčním signálem kvůli detekci, pro identifikaci komplementárních sekvencí pomocí hybridizace
<b>Soudní inženýrství</b>	vědní obor využívající inženýrských postupů pro stanovení, zda prvky z oblasti inženýrství byly zmanipulovány a poškozeny, přestaly správně pracovat nebo selhaly
<b>Soudní lékařství</b>	forenzní medicína, která zabývá se medicínskou problematikou
<b>Soudní psychiatrie</b>	vědní obor využívající poznatků psychologie a sociální psychologie pro potřeby vyšetřování
<b>Soudní psychologie</b>	forenzní věda aplikující poznatky psychologie při zjišťování psychických charakteristik
<b>Start kodón</b>	kodón, který iniciuje translaci
<b>Stop kodón</b>	kodón, který ukončuje translaci (UAG, UAA, UGA)
<b>Chromatinová doména</b>	strukturní jednotka, která vzniká při kondenzaci chromatinu, je tvořena smyčkou nukleozómového řetězce, která je svým počátkem vázána k tzv. proteinovému lešení.
<b>Taq polymeráza</b>	termostabilní DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie <i>Thermus thermophilus</i> , která odolává teplotám, při nichž se DNA denaturuje
<b>Templát</b>	molekula, která určuje nukleotidovou sekvenci pro komplementární molekulu
<b>Transkripce</b>	proces, při němž je vyráběn řetězec RNA podle templátu DNA

<b>Transkript</b>	RNA kopie segmentu DNA aktivního genu
<b>Translace</b>	překlad pořadí tripletů v mRNA do odpovídajícího pořadí aminokyselin, které tvoří polypeptid
<b>Triplet</b>	sekvence tří nukleotidů tvořících kodón v rámci nukleové kyseliny, představující kód pro aminokyselinu
<b>Tripletový genetický kód</b>	založený na skutečnosti, že každá aminokyselina je kódována trojicí nukleotidů v nukleové kyselině

## ÚVOD

Forenzní analýza DNA je v posledních letech hojně využívaným postupem k potvrzení nebo vyvrácení hypotéz v řadě soudních líčení. Využití nachází především v kriminalistice v rámci vyšetřování trestné činnosti nebo při identifikaci živých či mrtvých osob. Jelikož se genetická informace obsažená v DNA dědí po rodičích, je její analýzou také možno určit biologickou příbuznost jedinců, a proto bývá aplikována i v testech otcovství.

Tato bakalářská práce se zaměřuje především na forenzní analýzu DNA získanou z trestné činnosti. Jejím cílem je přiblížit celý postup analýzy DNA, od zajištění stopy na místě činu, přes detailní popis postupů a metod, kterými vzorky obsahující DNA ve forenzní laboratoři prochází až po výslednou interpretaci získaných výsledků.

# 1 FORENZNÍ VĚDY

Termín „forezní“ pochází z latinského slova *forensis*, odvozeného od *forum*, označující náměstí, kde se v antickém Římě konala veřejná soudní jednání. Moderní definice slova „forezní“ je týkající se soudu či dokazování. (Šimková, 2012)

Forezní vědy se zabývají aplikací vědeckých poznatků na právní problémy a jsou důležitými nástroji pro odhalování pravdivých skutečností v řadě soudních řízení. Využívají se při řešení občanskoprávních sporů, ke spravedlivému vymáhání trestního práva a vládních nařízení i k ochraně veřejného zdraví. (Katz & Halánek, 2016)

Nejčastější a také nejznámější využití forezních věd je však v kriminalistice při identifikaci obětí trestných činů nebo usvědčování zločinců pomocí analýzy DNA či otisků prstů. (Katz & Halánek, 2016)

Forezní vědy ale zahrnují mnohem více než jen tyto dvě výše zmíněná odvětví. Z těch nejznámějších se k nim řadí forezní balistika, forezní antropologie, forezní entomologie, forezní genetika a forezní digitální analýza. V České republice se také můžeme setkat s nahrazením slova „forezní“ termínem „soudní“. Proto mezi forezní vědy patří i soudní lékařství, soudní inženýrství, soudní psychologie a soudní psychiatrie. (Porada a kol., 2019)

## 2 FORENZNÍ GENETIKA

Forenzní genetika, někdy také označována jako forenzní DNA analýza je relativně mladým samostatným specifickým oborem, využívající znalostí z obecné, a především z molekulární genetiky k provádění genetických zkoumání pro nejrůznější důkazní účely, zejména poté soudní. (Forenzní genetika)

Využití forenzní genetiky najdeme především v kriminalistice, při identifikaci osob a při posuzování biologické příbuznosti jedinců. Hlavním účelem kriminalistické genetiky bývá určení původce biologických stop v rámci vyšetřování a dokazování trestných činů. Identifikační genetika se zabývá identifikací živých osob z důvodu imigračního řízení či ověřování totožnosti, nebo naopak osob již mrtvých při nálezech neznámých mrtvol, hromadném neštěstí či u válečných konfliktů atd. Posouzení biologické příbuznosti jedinců se využívá především při paternitním zkoumání, kdy je zapotřebí určit otce dítěte, ale lze ho aplikovat i pro posouzení jiných příbuzenských vztahů např. pro potřeby dědických řízení či genealogického výzkumu. (Šimková, 2012)

Forenzní genetika se však nezaměřuje pouze na výzkum lidské DNA, využití nachází i v analýze non-humánní DNA (zvířecí, rostlinné, virové a bakteriální). Dále se její postupy uplatňují při analýzách starodávné DNA z paleontologického a archeologického biologického materiálu. (Forenzní genetika)

### 2.1 První použití forenzní DNA analýzy

Zásadní objev v historii forenzní genetiky učinil v roce 1984 britský genetik Alec John Jeffreys, působící na univerzitě v Leicesteru. Zjistil, že určité oblasti DNA obsahují sekvence, které se vedle sebe stále dokola opakují a také, že se počet opakovaných sekvencí může mezi jednotlivými osobami lišit. Následným vyvinutím techniky pro zjištění rozličné délky těchto opakujících se sekvencí DNA Jeffreys umožnil provádění genetické identifikace osob. Tuto metodu nazval *DNA fingerprinting*. Nyní je známá, také pod pojmy typizace DNA či DNA profilování.

Metoda *DNA fingerprinting* byla poprvé použita k identifikaci pachatele při sexuálním napadení a následnému zavraždění dvou mladých dívek Lyndy Mann a Dawn Ashwort v okolí hrabství Leicestershire v letech 1983 a 1986. Tyto vraždy měly podobné rysy, což vedlo policii

k podezření, že oba trestné činy spáchal stejný muž. Tuto domněnku potvrdil i Jeffreys analýzou spermatu odebraného z obou míst činu.

Po nějaké době se k zavraždění jedné z dívek přiznal jistý mladý muž. Jeho krev byla proto srovnána se spermatem získaným z obou míst činu, aby bylo možné prokázat spáchání i druhé vraždy. Analýza však ukázala, že DNA podezřelého muže neodpovídá DNA získané ze spermatu a tím prokázala mužovu nevinu.

Vyšetřovatel tedy přistoupil k dosud nevídanému kroku – hromadné analýze DNA z krevních vzorků odebraným více než 4000 mužů ze tří okolních vesnic. Avšak bez jakékoliv shody. Později však bylo zjištěno, že muž jménem Colin Pitchfork místo své krve záměrně podstrčil vzorek krve jiné osoby. Policie následně provedla nový odběr a analýza DNA tehdy prokázala shodu se vzorkem spermatu z obou vražd. Muž byl usvědčen a odsouzen na doživotí.

Tento vyřešený případ se zapsal do dějin nejen jako první kriminalistické použití analýzy DNA k identifikaci osob, ale také jako první případ masového testování a první případ, kdy analýza DNA vedla k osvobození nevinného. (Butler, 2010; Historie forenzní genetiky; Šimková, 2012)

## **2.2 První usvědčení analýzou DNA u nás**

Dne 27. června 1990 byla na toaletách Pedagogické fakulty Masarykovy univerzity v Brně nalezena brutálně ubodaná devatenáctiletá studentka Jana Krkošková. Na kachličkách nedaleko od ní byly zajištěny krevní kapky, o kterých se vyšetřovatelé domnívali, že patří pachateli. Podezřelým byl čerstvě propuštěný Milan Lubas, již trestaný za sexuální napadení. Muž byl s pořezanou rukou zadržen u přítelkyně a v jejich prádelním hrnci bylo objeveno zakrvácené oblečení.

V této době se u nás kriminalistické stopy přiřazovali k jednotlivým pachatelům pomocí určení krevních skupin. Jana Krkošková a Milan Lubas měli však oba krevní skupinu A. Tato krevní skupina byla také stanovena v kapkách krve nalezených na kachličkách a na zakrváceném oblečení. Nešlo tedy určit, komu krev ze zajištěných vzorků patří, a tak nebylo možné vraždu Milanu Lubasovi dokázat.

V té době začínal s analýzou DNA v Bratislavě doc. RNDr. Vladimír Ferák, CSc. Vyšetřovatelé se tedy na něj obrátili s prosbou, zda by nezkusil analýzu DNA aplikovat na tento případ. Doc. Ferák se případu ujal a zjistil, že krev na kachličkách má shodný genetický profil s osobou Milana Lubase a krev z oblečení nalezeného v prádelním hrnci patří oběti Janě Krkoškové.

Milan Lubas byl následně usvědčen a odsouzen na 23 let do vězení, kde spáchal sebevraždu.  
(Kanál Expertiza, 2018; Šimková, 2012)



### 3 DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA

DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je nositelkou genetické informace všech živých organismů, s výjimkou některých nebuněčných, kde tuto úlohu zastává RNA neboli ribonukleová kyselina. (Porada a kol., 2019)

#### 3.1 Struktura deoxyribonukleové a ribonukleové kyseliny

Nukleové kyseliny (DNA i RNA) jsou dlouhé řetězce tvořené opakujícími se podjednotkami – nukleotidy. RNA obvykle existuje jako jednovláknový polynukleotid, kdežto DNA jako dvouvláknová molekula.

Každý nukleotid je složen ze tří částí: fosfátové skupiny, dusíkaté báze a monosacharidu s pěti atomy uhlíku neboli pentózy. V DNA je cukernou složkou 2-deoxyribóza a vyskytují se zde celkem čtyři typy dusíkatých bází: adenin (A), guanin (G), thymin (T) a cytozin (C). U RNA je thymin (T) nahrazen uracilem (U) a cukernou složkou je zde ribóza. Dusíkaté báze adenin a guanin patří mezi puriny a jsou bicyklické, kdežto cytozin, thymin a uracil jsou monocyklické a patří mezi pyrimidiny. (Snustad a kol., 2009)

Řetězec nukleotidů v DNA je tvořen spojením fosfátové skupiny v pozici C-5 (5' uhlík) jednoho cukerného zbytku s hydroxylovou skupinou v pozici C-3 (3' uhlík) sousedního cukerného zbytku pomocí fosfodiesterové vazby. Na jednom konci řetězce se proto vyskytuje volná fosfátová skupina (5' konec), kdežto druhý konec řetězce je zakončen volnou hydroxylovou skupinou (3' konec). DNA je také díky tomuto propojení mezi cukernými zbytky polární. (Passarge, 2019)

Z pořadí nukleotidů, tzv. sekvence nukleotidů, vzniká jednoduchý kód obsahující čtyři znaky, které zapisujeme písmeny označující jednotlivé dusíkaté báze.

Např.:

*„ACCAGTGAGATCCCAATATAGTACACACACTGCTGCTACTTCTAGAGGCAAA“*

(Šimková, 2012).

DNA je tvořeno dvěma polynukleotidovými řetězci otáčejícími se navzájem kolem sebe ve spirále, čímž vytvářejí pravotočivou dvoušroubovici. Tento zásadní objev byl v roce 1953 proveden Jamesem Watsonem a Francisem Crickem. Udržení tvaru dvoušroubovice zajišťují vodíkové vazby mezi dusíkovými bázemi opačných vláken. Báze jsou párovány specificky.

Adenin se vždy pomocí dvou vodíkových vazeb páruje s thyminem a cytosin je vždy třemi vodíkovými vazbami párován s guaninem. Všechny páry jsou tedy složeny z jedné purinové báze a jedné pyrimidinové. Díky tomuto specifickému párování dusíkatých bází lze z jednoho vlákna DNA určit sekvenci druhého vlákna. Vlákna DNA jsou tedy vzájemně komplementární. (Snustad a kol., 2009)

Vlákna dvoušroubovice DNA mají zároveň opačnou (antiparalelní) orientaci. Jedno z vláken je orientováno ve směru 5'→3' naproti tomu druhé vlákno je orientováno ve směru 3'→5'. Pořadí dusíkatých bází v DNA je však standartně zapisováno ve směru 5'→3'. (Passarge, 2019)

## **3.2 Uložení deoxyribonukleové kyseliny**

V běžné tělní buňce najdeme dvoušroubovici DNA o délce cca 2 metry, která je složena zhruba z 6,6 miliardy nukleotidů. Velikost lidských buněk je však mnohonásobně menší, a proto zde musí být DNA náležitě smotána. (Šimková, 2012)

První zkrácení vzniká obtočením dvoušroubovice DNA s průměrem 2 nm okolo komplexů proteinů zvaných histony. Takto vytvořená struktura se nazývá nukleozóm a její velikost je 11 nm. Nukleozómy jsou následně sbaleny těsně k sobě, čímž vzniká 30 nm chromatinové vlákno. Chromatinové vlákno je poté pomocí přichycení k bílkovinovému lešení rozčleněno do chromatinových domén neboli smyček a následně rozděleno na kusy zvané chromozómy. (Passarge, 2019; Snustad a kol., 2009)

Chromozómy jsou uloženy v jádře lidských buněk, proto tuto DNA označujeme jako jadernou DNA (nDNA). Dalším typem buněčných organel, kde lze nalézt DNA, jsou mitochondrie. Tyto organely obsahují kruhovou DNA, kterou nazýváme mitochondriální DNA (mtDNA). Kompletní genetickou informaci v rámci jedné buňky poté nazýváme genom. (Šimková, 2012)

### **3.2.1 Chromozómy**

Většina lidských buněk je diploidní, což značí, že mají dvě kopie každého chromozómu. Výjimkou jsou buňky pohlavní, které jsou haploidní, tudíž obsahují pouze jednu kopii každého z chromozómů, u mužů se jedná o spermie a u žen o vajíčka.

Diploidní buňky obsahují ve svém jádře 46 chromozómů uspořádaných ve 23 párech, které jsou v idiogramu karyotypu očíslované. V každém z těchto párů je jeden z chromozómů zděděn

od matky a druhý od otce. Soubor všech jaderných chromozómů se označuje karyotyp. Chromozómové páry 1 až 22 jsou nazývány autozómy. Posledním párem jsou gonozómy, označované písmeny X a Y, které určují pohlaví jedince. U žen se obvykle vyskytují dva chromozómy X, u mužů jeden chromozóm X a jeden Y. (Buckleton a kol., 2016; Passarge, 2019)

Odlíšné biologické druhy mají různý počet chromozómů. U druhově stejných organismů je však počet, tvar i velikost chromozómů v jádře konstantní. Karyotyp lze tedy využít jako druhový znak. Samotný počet chromozómů ale ještě neudává informaci o velikosti genomu (celkovém počtu bází), pouze poukazuje na to, do kolika částí je tato DNA rozdělena. (Porada a kol., 2019; Šimková, 2012)

### **3.3 Funkce deoxyribonukleové kyseliny**

Genetický materiál buněk (DNA) obsahuje informace k řízení buněčných aktivit, fungování a chování organismu a také k usměrňování vývoje. Dále má schopnost se měnit tak, aby se organismy mohly přizpůsobit odlišným podmínkám života, a především umožnit přenos genetické informace z rodičů na potomstvo. Tyto informace jsou zakódovány v sekvencích nukleotidů tvořících genom. (Snustad a kol., 2009)

Pouze 2 % lidského genomu jsou tvořena geny. V těchto specifických sekvencích nukleotidů jsou zakódovány informace o pořadí aminokyselin v buněčných bílkovinách. Pokud se v genové sekvenci vyskytne chyba, může jedinec trpět různými genetickými poruchami či onemocněními. Zbýlých 98 % genu je tvořeno nekódujícími sekvencemi nukleotidů, které mají v těle své vlastní funkce. Nicméně změny v této části DNA jedince obvykle nijak neovlivňují. (Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

Expresí genů probíhá ve dvou krocích. Nejprve je genetická informace z DNA zkopírována do RNA, tento proces nazýváme transkripce (přepis). Poté následuje translace (překlad), při níž je genetická informace obsažená v RNA přenesena do proteinu. Veškerá genetická informace musí být zároveň v těle přenášena z mateřských buněk na dceřiné a během reprodukce z rodičů na jejich potomky. Toto zajišťuje proces replikace. (Snustad a kol., 2009)

### 3.3.1 Transkripce

Proces transkripce probíhá v jádře buněk a začíná rozvolněním dvoušroubovice DNA. Jedno z vláken DNA, které je ve směru 3'→5' slouží jako templát pro syntézu molekuly RNA. Nové vlákno RNA se je syntetizováno ve směru 5'→3' dle templátového vlákna na základě komplementarity bází. T v DNA je přepisováno jako A do RNA, C jako G, G jako C a A v DNA je do RNA přepisováno, jako U. Vzniklé vlákno RNA se nazývá transkript nebo také pre-mRNA. (Passarge, 2019; Snustad a kol., 2009)

Většina jaderných genů obsahuje kódující sekvence genů zvané exony, které jsou odděleny nekódujícími sekvencemi nazývanými introny. Vzniklá pre-mRNA tedy obsahuje přepis obou těchto sekvencí. Po oddělení pre-mRNA od templátového vlákna jsou nekódující sekvence (introny) z vlákna transkriptu vystřiženy, čímž vzniká mRNA. (Snustad a kol., 2009)

### 3.3.2 Translace

Po svém vzniku mRNA z jádra putuje do cytoplasmy, kde na ribozómech probíhá proces translace, známý také jako proteosyntéza. Ribozómy jsou složité makromolekuly, které se skládají z velké a malé podjednotky a jsou tvořeny proteiny a rRNA (ribosomální RNA). (Snustad a kol., 2009)

K translaci na mRNA dochází v oblasti čtecího rámce, který začíná start kodómem (AUG) a probíhá ve směru 5'→3'. Každá trojice nukleotidů v tomto vlákně, tzv. kodón nebo triplet, představuje kód pro konkrétní aminokyselinu. Schopnost „číst“ tyto kodóny má transferová RNA (tRNA), s charakteristickou strukturou jetelového listu. Na spodní straně této struktury se nachází antikodón – trojice nukleotidů, která je komplementární k některému z kodónů v mRNA. K opačné straně tRNA je připojena aminokyselina. Díky komplementaritě kodónů a antikodónů jsou dle pořadí nukleotidů ve vlákně mRNA aminokyseliny vázány za sebe. Spojováním aminokyselin se postupně tvoří buněčná bílkovina. Translace je ukončena, jakmile se v mRNA objeví některý ze stop kodónů (UAA, UGA nebo UAG). Dokončená bílkovina se následně oddělí od mRNA a plní svou úlohu v buňce. (Passarge, 2019; Snustad a kol., 2009; Šimková, 2012)

Genetický kód, určující pořadí aminokyselin v bílkovinách má však pár specifických vlastností. Je tripletový, každou AMK tedy určují tři nukleotidy, tzv. kodón. Zároveň je degenerovaný, všechny AMK (s výjimkou dvou) jsou určovány více než jedním kodómem. A v neposlední řadě

je téměř univerzální. Což značí, že u většiny živých organismů mají kodóny stejný smysl. (Passarge, 2019; Snustad a kol., 2009)

### 3.3.3 Replikace

K replikaci DNA dochází vždy před dělením buňky, jelikož je nutné vytvořit dvojnásobné množství genetického materiálu, aby mohl být rovnoměrně rozdělen mezi buňky dceřiné. Proces replikace je velmi rychlý a zároveň musí být velice přesný. (Passarge, 2019)

V lidských buňkách existuje více replikačních počátků a vždy je replikována jen určitá oblast DNA. Na každém z těchto replikačních počátků dojde k rozvolnění dvoušroubovice přerušením vodíkových vazeb. To zajišťují enzymy helikázy. Obě původní vlákna následně slouží jako templát a určují sekvenci nukleotidů v nově vzniklém vlákně. Tento proces se nazývá semikonzervativní replikace, jelikož se v nově vzniklé dvoušroubovici vždy jedno z rodičovských vláken zachová. V místě, kde je dvoušroubovice rozvolněna se vytváří replikační vidlice, která se během syntézy nového vlákna DNA po původním vlákně pohybuje. Replikace probíhá na základě komplementarity bází. Syntézu nového vlákna začíná primer, který je tvořen komplementárními bázemi k místu počátku replikace na původním vlákně. Nová vlákna jsou tvořena enzymem DNA polymeráza a to vždy ve směru 5' → 3', proto je jedno z nich syntetizováno kontinuálně (vedoucí vlákno), zatímco druhé se při syntéze opožďuje. K tvorbě vedoucího vlákna je užit pouze jeden primer a syntéza dále pokračuje kontinuálně dle původní DNA. Naopak opožďující se vlákno je tvořeno pomocí Okazakiho fragmentů, malých částí, začínajících primerem. Tyto primery jsou následně odstraněny a prázdné místo zaplní řetězec, který je tvořen sousedním Okazakiho fragmentem. Vlákno je nakonec spojeno dohromady DNA ligázou.

Výsledkem replikace jsou dvě dceřiné molekuly DNA, složené z jednoho původního a jednoho nově syntetizovaného vlákna, které jsou naprosto totožné s původní dvoušroubovicí DNA. (Passarge, 2019; Snustad a kol., 2009)

## 4 BIOLOGICKÉ STOPY

Jako biologická stopa je označován veškerý biologický materiál, který byl zajištěn na místě činu a stal se předmětem zkoumání pro potřeby vyšetřování. (Šimková, 2012)

Biologické stopy užívané pro potřeby forenzní analýzy mohou být různého původu. Prvním typem stop jsou ty, jež byly z organismu odloučeny samovolně. Nejčastěji se jedná o odumřelé povrchové části organismu či produkty tělní látkové výměny, zahrnující moč, sliny, pot, stolici, slzy, nosní sekret, zvratky, ejakulát, poševní sekret, menstruační krev, vypadlé vlasy a chlupy, mateřské mléko, plodovou vodu a placentu. Dále bývá zkoumán biologický materiál odloučený z organismu pomocí zevního násilí, které může být způsobeno pachatelem trestného činu, ale třeba také zvířetem či některou z přírodních sil. Do této skupiny řadíme krev, části tkání a orgánů a vytržené či jinak oddělené části vlasů, chlupů, nehtů a pokožky. V neposlední řadě bývá zajišťován materiál po smrti osoby. (Porada a kol., 2019)

### 4.1 Určení původce stopy

U biologických stop je obvykle zjišťován tkáňový a druhový původ a následně skutečný původce stopy. Při zjišťování tkáňového původu se určuje, zda se jedná o krev, moč, sliny atd. pomocí mikroskopických, imunologických a biochemických zkoušek. Využívají se k tomu orientační zkoušky, které signalizují, zda by se mohlo jednat o zamýšlený materiál. Stanovování bývá obvykle zaměřeno na detekci určitých chemických látek či enzymů nebo se jedná o zkoušky fyzikální povahy využívající světelné zdroje. Orientační zkoušky bývají levné a rychlé a často poskytují falešně pozitivní výsledky. Oproti tomu zkoušky specifické s určitostí prokazují, že se jedná o daný biologický materiál a bývají zaměřeny na stanovení přítomnosti určitých hormonů či bílkovin, které by daný biologický materiál měl obsahovat. Pokud je však ve stopě předpokládáno malé množství genetického materiálu může být zkouška tkáňového původu vynechána, jelikož její provedení většinou znamená odebrání další části biologického materiálu a tím pádem další zmenšení množství genetického materiálu ve stopě. (Šimková, 2012)

Při určování druhového původu biologických stop je cílem zjistit, z jakého živočišného či rostlinného druhu stopa pochází. Nejčastěji se jedná o průkaz lidského původu stopy, který lze provést imunologicky, reakcí lidské bílkoviny se specifickou protilátkou. Obvykle se však toto stanovení neprovádí, jelikož většina genetických testů užívaných pro forenzní analýzu je druhově specifických, tudíž poskytne pozitivní výsledek pouze v případě, že se jedná o lidský

biologický vzorek. Biologický materiál ze zvířete bývá nejčastěji na místě činu zajištěn, při chybné domněnce, že se jedná o materiál pocházející z člověka. Výjimečně může být důkazním materiálem stopa zvířecího původu, poté se pro určení druhu opět využívá imunologické analýzy. Ojediněle dochází i ke zkoumání biologického materiálu rostlinného původu, avšak toto zkoumání obvykle vyžaduje odbornou specializaci. (Porada a kol., 2019; Šimková, 2012)

Pokud je užitím forenzní genetické analýzy biologický materiál tvořící stopu přiřazen ke konkrétnímu jedinci, poté nazýváme toto jednoznačné určení původce individuální identifikace. Aby byla tato identifikace vůbec možná je zapotřebí porovnat materiál ze stopy se srovnávacím vzorkem podezřelého jedince. Pro srovnávací vzorek je nejčastěji využíván bukální stěr. Tento stěr se provádí odběrovým kartáčkem či tampónkem v ústech ze sliznice vnitřní strany tváře a může si ho osoba provést i sama. Dříve byla jako srovnávací vzorek běžně odebírána periferní žilní krev, avšak jelikož se jedná o metodu, kterou musí provádět zdravotnický personál a vzorky se špatně uchovávají, tak se nyní tato metoda téměř nevyužívá. Ve výjimečných případech mohou být jako srovnávací vzorky využity i kožní seškraby, plodová voda, pupečnicková krev choriové klky či plodový materiál zajištěný z dutiny děložní po potratu. (Šimková, 2012)

V případě vyšetřování pohřešované osoby bývají za srovnávací materiály považovány stěry z jejího zubního kartáčku, osobních předmětů nebo např. fixované tkáně z biopsií dříve využívaných pro zdravotnické účely. Pro získání srovnávacího vzorku u pohřešovaných osob, testování otcovství či při identifikaci obětí hromadného neštěstí lze také využít biologický materiál rodinného příslušníka. (Butler, 2010; Šimková, 2012)

## **4.2 Odběr, kontaminace a degradace biologických stop**

Při zajišťování biologických stop pro forenzní genetickou analýzu je nutné, aby bylo odebráno co největší množství biologického materiálu a zároveň aby nedošlo ke kontaminaci či degradaci stopy. (Šimková, 2012)

Dostatečné množství genetického materiálu zvyšuje naději na úspěšné stanovení DNA profilu. Z tohoto důvodu je nejlepší do forenzní laboratoře dopravit stopu i s předmětem, na kterém se nachází. Pokud je však předmět, na němž je stopa příliš velký nebo není možno ho do laboratoře dopravit, je nutné stopu co nejšetrněji sejmout. K tomuto účelu jsou využívány speciální forenzní nylonové mikrokartáčky, které zajišťují odebrání mnohonásobně většího

množství stopy než běžným vatovým tampónem. Pro optimální odběr buněčného materiálu je často využívána technika dvojitého stěru, kdy po vlhkém tampónu následuje suchý. Nejprve se tampónem navlhčeným ve sterilní destilované vodě přetře povrch biologické stopy, aby se uvolnily všechny přítomné buňky a rehydratovaly se. Díky tomu následně buňky snáze přilnou ke druhému suchému tampónu, kterým je stopa přetřena. Pro získání vyššího množství materiálu jsou následně pro analýzu stopy využity oba tampóny dohromady.

Úspěch analýzy může být ohrožen také kontaminací vzorku, při níž je do stopy vnesen další biologický materiál. Cizí DNA se do stopy může dostat například použitím nevhodného odběrového tamponu, ze srovnávacího vzorku zasílaného společně se stopou či od osoby, která se vzorky manipulovala. Proto je zapotřebí při odběru stopy dodržovat určité zásady. Na vzorek se nikdy nesmí sahat holýma rukama nebo nad ním kýchat, kašlat či kouřit a pro odběr je nutno vždy používat čisté latexové rukavice, DNA-free odběrové tampóny a vodu a mezi odebrání různých vzorků rukavice vždy vyměnit. Stopy krve, semene a dalších skvrn musí být na vzduchu před zabalením řádně vysušeny. Každý ze vzorků musí být následně samostatně zabalen a řádně označen. Vzorky by měly být vždy baleny do papírových obálek či sáčků, jelikož v plastových sáčcích se kondenzuje voda, která urychluje degradaci molekul DNA. Srovnávací vzorky by měly být zajišťovány mimo místo činu, nejlépe s časovým odstupem a následně uchovávány odděleně. (Butler, 2010; Šimková, 2012)

K degradaci biologických stop dochází i tehdy, pokud jsou vzorky vystaveny nevhodným fyzikálním, chemickým či biologickým vlivům. Proto je důležité se vyvarovat výrazným změnám teplot a udržovat stopy v trvale suchém prostředí. Dříve doporučované chlazení či amrazování materiálu se ukázalo jako nevhodné. Nejdůležitější ze všeho je však co nejrychlejší dopravení stop do forenzní laboratoře, protože i v případě, že dojde k nesprávné manipulaci či uskladnění biologického materiálu lze rychlou dopravou do laboratoře minimalizovat vzniklé škody. (Porada a kol., 2019; Šimková, 2012)



## 5 ANALÝZA DNA

### 5.1 Extrakce (Izolace) DNA

Biologická stopa získaná z místa činu obsahuje kromě DNA i mnoho dalších látek, které by při následné analýze mohly být na obtíž. Z tohoto důvodu byly vyvinuty extrakční metody, které oddělují molekuly DNA od proteinů a dalších buněčných materiálů. V ideálním případě proces extrakce odstraňuje inhibitory snižující účinnost či plně bránící amplifikaci DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Výsledkem extrakce je poté stabilní roztok, který během skladování nedegraduje a obsahuje DNA je vysoké kvality. (Butler, 2012)

Prvním krokem extrakce je vždy lýza, díky které dojde k rozrušení buněk a uvolnění buněčného obsahu do roztoku. Tento proces je nejčastěji založen na rozdílné osmóze buňky a destilované vody, případně lyzačního pufru. Aby bylo dosaženo rovnováhy v osmóze obou substancí, buňky skrz buněčnou membránu vstřebávají vodu z okolí do sebe, čím zvětšují svůj objem, až nakonec prasknou. (Šimková, 2012)

Pro další krok extrakce DNA lze poté využít několik různých metod. Nejstarší z nich je organická extrakce metodou fenol-chloroform, založená na oddělení polární DNA do vodné směsi a nepolárních látek do organické fáze. Základem mnoha technologií jsou také křemičité matice, které využívají parciálního záporného náboje molekul DNA, díky kterému lze DNA navázat na pevnou fázi. Na stejném principu funguje i extrakce pomocí magnetických kuliček. DNA také může být vyvázána natřením vzorku na FTA karty, kde je absorbentem papír obsahující látky, které inaktivují nukleázy a také brání růstu bakterií. V neposlední řadě lze nukleové kyseliny extrahovat přidáním chelatačních činidel, která vyvazují určité typy iontů. V praxi se nejčastěji využívá pryskyřice Chelex vyvazující dvojmocné ionty kovů, mezi které patří i hořčnaté ionty. Odstraněním těchto iontů z reakce dojde k inaktivaci nukleáz, které za normálních okolností degradují DNA. Některé z těchto metod jsou prováděny manuálně, jiné jsou automatizované. (Ambers, 2023; Butler, 2012; Hegde a kol., 2022; Šimková, 2012)

Výběr vhodné metody je však rozhodující pro úspěch celé analýzy a odvíjí se i od typu zkoumaného biologického materiálu. Se vzorkem plné krve je totiž nutno zacházet jinak, než s krvavou skvrnou či úlomkem kosti. Odlišně je také zapotřebí zacházet s biologickým materiálem z hnilobných těl či s ostatky obětí katastrof. Tvrdé tkáně jako kosti, zuby a nehty jsou nejodolnější proti degradaci, tudíž v těchto případech nejvhodnější pro získávání DNA neznámé oběti. Avšak extrakce z tvrdých tkání je mnohonásobně časově náročnější než extrakce z tkáně měkké. (Ambers, 2023; Butler, 2012; Uerlings a kol., 2021)

Dosud bylo objeveno jen málo metod k rozdělení směsi DNA ze vzorku. V případech znásilnění jsou používány metody diferenciální lýzy nebo mikrodisekce, které oddělují ženské a mužské buňky a díky tomu se vyhnout vytvoření DNA směsi v izolátu. Metoda diferenciální lýzy využívá dvoustupňový proces zahrnující počáteční lýzu nespermií a odstranění této DNA. Druhým krokem je lýza spermií následovaná jejich extrakcí. Techniku Mikrodisekce laserového záchytu lze využít i pro separaci jiných buněk než zajištěných v případech znásilnění. Tato metoda kombinuje mikroskopii s technologií laserového paprsku, což umožňuje zaměřit se pouze na specifické buňky, které je zapotřebí oddělit ze směsi od ostatních. Potřebné buňky jsou nejprve nalezeny pomocí mikroskopu a vyříznuty pomocí vysoce zaostřeného laserového paprsku. Zvýšením výkonu laseru jsou poté vyříznuté buňky katapultovány proti gravitaci do sběrného zařízení a dále mohou být přeneseny do jiných zkumavek dle potřeby. Popsaná technologie využívá ultrafialové laserové paprsky, avšak pro tuto metodu lze využít i infračervené laserové paprsky, jež pro stanovení využívají podobnou metodu. Poměrně novou metodou je haplotypově specifická extrakce (HSE), využívající extrakci pomocí magnetických kuliček ve spojení s alelově specifickými sondami, která umožňuje separaci haplotypů nebo velkých fragmentů chromozómů. (Klein & Buoncristiani, 2017; Rothe & Nagy, 2015; Vandewoestyne a kol., 2013)

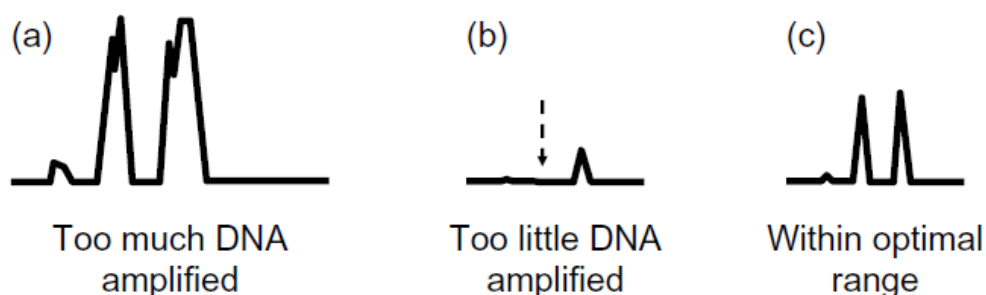
Bez ohledu na zvolenou extrakční metodu je zapotřebí se všemi vzorky zacházet maximálně opatrně, jelikož v průběhu forenzní laboratorní analýzy je právě extrakce částí, kdy je vzorek DNA nejnáchylnější ke kontaminaci. Především je zapotřebí zabránit vnesení cizí DNA do vzorku či kontaminaci jednoho vzorku vzorkem jiným. Z tohoto důvodu bývají vzorky z místa činu obvykle zpracovávány v jiných časech a někdy i na jiných místech než vzorky srovnávací. (Butler, 2012)

Extrahovaná DNA, která není ihned dále analyzována, případně nevyužitý extrakt během stanovování bývá obvykle zamrazena, protože nízká teplota brání aktivitě proteinových enzymů nukleáz v degradaci DNA. Pro krátkodobé uchování bývá materiál uložen v chladničce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , při dlouhodobém skladování v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mrazáku. Pokud je následně nutná nová DNA analýza, extrakt se rozmrazí a nepoužitý zbytek se poté opět zamrazí. Toto rozmražení a zmražení výsledky DNA analýzy neovlivňuje. (Butler, 2012; Forsberg a kol., 2022)

## 5.2 DNA kvantifikace

V DNA izolátu je následně zapotřebí vyhodnotit dosažený produkt. Tento proces se nazývá kvantifikace a určuje, kolik DNA se ze stopy podařilo izolovat. (Porada a kol., 2019)

Množství a kvalita DNA, které lze získat z biologických důkazů se totiž může výrazně lišit v závislosti na použité extrakční metodě, což velmi ovlivňuje následné zvolení metody genotypizace. Jestliže je genotypizační metoda založena na PCR (polymerázové řetězové reakci) je pro její provedení zapotřebí pouze určité množství vstupní DNA. Při použití menšího či naopak většího množství DNA dochází k efektům, které mohou bránit interpretaci výsledků DNA profilu. Malá množství DNA způsobují tzv. stochastické efekty (vypadnutí alel, pokles), velké množství vstupní DNA by oproti tomu mohlo generovat analytické artefakty (zvýšené základní linie, rozdělené vrcholy, hroty, koktání), viz Obr. 1. Určení celkového množství DNA je také důležité určit před tím, než je pro stanovení použita jakákoliv z destrukčních metod, jelikož důležitou součástí forenzní analýzy je zachovat si co nejvíce důkazů pro opakované testování. (Ginart a kol., 2016; Lee a kol., 2014)



**Obr. 1** - Porovnání výsledků STR typizace jednoho heterozygotního lokusu vzorku z jednoho zdroje

- a) s příliš velkým množstvím vstupní DNA vykazujícím rozdělené píky v nadměrné velikosti
- b) s příliš malým množstvím vstupní DNA, kde šipka ukazuje na výpadek alely kvůli stochastickým účinkům
- c) se správným množstvím vstupní DNA

(Převzato z: Advanced topics in forensic DNA typing: methodology, Butler, 2012)

Nejstarší používané metody kvantifikace DNA, které umožňovaly pouze stanovení celkového množství nukleových kyselin byly UV spektrofotometrie a PicoGreen. Technologie UV spektrometrie spočívala v měření absorpance elektromagnetického záření o vlnové délce 260 a 280 nm (UV záření) molekulou DNA. Metoda měla však nízkou citlivost a nebyla schopná rozlišit, zda se ve vzorku nachází DNA nebo RNA a zda je nukleová kyselina neporušená nebo degradovaná. Citlivější metodou byly fluorescenční testy využívající

interkalační barviva PicoGreen. Detekce zde byla založená na zesílení fluorescence barviva po vazbě na molekulu DNA. Ani jedna z těchto metod však nebyla specifická pro lidskou DNA, a proto se dnes již ve forenzních laboratořích nevyužívají.

V biologických vzorcích lze nalézt mnoho různých typů DNA. Metodami kvantifikace je primárně zapotřebí z biologického vzorku určit v jakém množství se zde vyskytuje lidská DNA.

První stanovení pouze lidské DNA bylo provedeno pomocí specifické sondy metodou Slot Blot. Technika využívala přichycení DNA na nylonovou membránu a následnou hybridizaci se specifickou sondou. Detekce byla prováděna pomocí chemiluminiscence nebo kolorimetricky. Pro zefektivnění postupu byly následně vyvinuty techniky, u kterých nebylo zapotřebí provádět hybridizaci DNA se sondou na membráně. Systém využívající tuto techniku byl například AluQuant. Všechny metody založené na specifických sondách tedy poskytovaly informace o celkovém množství přítomné lidské DNA, avšak nebyly schopné identifikovat kvalitu a množství DNA, které je v daném vzorku neporušeno. (Lee a kol., 2014)

V současné době jsou však všechny výše zmíněné metody kvantifikace nahrazeny kvantitativní PCR (qPCR). (Ginart a kol., 2016)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce qPCR je využívána k určení skutečného počtu kopií DNA ve vzorku, díky porovnání se standardy, a může být použita i pro identifikaci druhu. Využívá se qPCR v reálném čase také označovaná jako Real-Time qPCR. Principem této metody je stanovování počtu kopií DNA po každém cyklu amplifikace měřením změny emisí fluorescence z fluorescenčně značených sekvenčně specifických sond či primerů nebo z fluorescenčních barviv vázajících se na DNA. Z toho, jakým způsobem se kopie DNA během qPCR zvyšovaly lze následně zpětně určit, jaké bylo původní množství DNA ve vzorku. Tato metoda je velice citlivá a přesná, dokáže detekovat přítomnost PCR inhibitorů i rozsah DNA fragmentace. V současnosti je dokonce možná simultánní kvantifikace DNA různých živočišných druhů (např. člověka a psa) ze směsi pomocí porovnávání s jejich standardními křivkami. (Conte a kol., 2018; Lederman, 2009; Liang & Coyle, 2021; Nybo, 2011; Søndergaard a kol., 2015; Šimková, 2012; Taniguchi a kol., 2022)

### 5.3 DNA Amplifikace

Během procesu amplifikace je původní množství DNA namnoženo do mnoha identických kopií, k čemuž se využívá metoda PCR. Amplifikována je vždy jen konkrétní cílová sekvence molekuly DNA, která je do té doby obvykle obklopena velkým množstvím necílové DNA. (Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

Polymerázová řetězová reakce (PCR), představená v roce 1983 Kary Mullisem, který za ní později získal Nobelovu cenu za chemii, výrazně usnadnila molekulární analýzu DNA a genů. Jedná se o velice rychlou a citlivou metodu amplifikace, která je plně automatizovaná a je schopná namnožení i velmi malého množství vstupní DNA. Během standardní PCR jsou molekuly DNA cyklicky amplifikovány v zařízených zvaných termocyklery. Během jedné PCR proběhne průměrně 25 až 30 cyklů a každý z těchto cyklů se skládá ze tří kroků.

Prvním krokem je denaturace dvouvláknové molekuly DNA, během které jsou přerušeny vodíkové vazby mezi komplementárními bázemi, čímž jsou získány dvě jednovláknové templátové DNA. Tento proces probíhá při 90 – 94 °C.

Poté následuje annealing při teplotě 50 – 70 °C. Během tohoto kroku nasedají dva oligonukleotidové primery o délce okolo 15 – 25 bází na vlákna templátové DNA vzniklá při denaturaci. Tyto primery jsou vázány dle komplementarity ke 3' koncům obou vláken množeného úseku DNA.

Při třetím kroku jsou při teplotě mezi 70 až 75 °C dříve navázané primery prodlužovány. Syntézu nového řetězce DNA zahajuje termostabilní DNA polymeráza v přítomnosti hořčíkových iontů přidáváním deoxynukleotidfosfátů (dNTPs) za primer dle komplementarity bází k templátovému vláknu. Nejčastěji využívanou polymerázou je Taq polymeráza izolovaná z bakteriálního kmene *Thermua aquaticus*.

Během jednoho cyklu PCR jsou z dvoušroubovice DNA zkopírovány oba templátové řetězce, které dají vznik dvěma komplementárním vláknům. Z jedné původní molekuly DNA se tedy absolvováním cyklu stanou molekuly dvě. Díky tomu počet kopií úseku DNA v průběhu PCR exponenciálně narůstá a na konci PCR je počet kopií ve směsi minimálně  $10^5$ . Po proběhnutí potřebného množství cyklů k dosažení požadovaného počtu amplifikovaných úseků DNA je upravena teplota na 4 °C, což ukončí všechny reakce probíhající v reakční směsi.

Produkt generovaný PCR lze následně analyzovat pomocí různých detekčních metod, mezi které patří např. elektroforéza, spektroskopie, fluorescenční značení a autoradiografie.

Nejjednodušší a nejoblíbenější metodou detekce je však gelová elektroforéza. (Passarge, 2019; Pico, 2020)

Průběh amplifikace pomocí PCR však může být ohrožen, pokud se ve vzorku vyskytnou exogenní kontaminanty, také označované jako PCR inhibitory, které mění schopnost enzymů plně amplifikovat DNA. Mezi běžně známé PCR inhibitory patří krevní barvivo hematin, pigment melanin nacházející se v kůži a vlasech, kostní kolagen a vápník, indigo nacházející se v denimu a kyselina huminová obsažená například v půdě. (Funes-Huacca a kol., 2011)

Pro různé molekulárně biologické účely byly kromě standardní PCR vyvinuty i další modifikace této metody. Například pokud v jedné zkumavce v rámci jedné reakční směsi amplifikujeme pouze jeden lokus DNA pomocí jednoho páru primerů, nazýváme tento proces monoplexová PCR. Je-li amplifikovaných lokusů více, nazýváme metody dle počtu těchto lokusů (2 lokusy = duplexová PCR, 3 lokusy = triplexová PCR). Pokud je však počet lokusů opravdu vysoký, jedná se o multiplexovou PCR. (Passarge, 2019; Šimková, 2012)

PCR můžeme dělit i dle množství jednotlivých primerů přidaných do reakce. Pokud jsou oba primery ve stejném množství, jde o symetrickou PCR. Jestliže hovoříme o asymetrické PCR, znamená to, že jeden primer byl do reakce přidán ve větším množství. Díky této skutečnosti je poté upřednostňováno kopírování DNA v jednom směru. Extrémní formou této metody je PCR s použitím pouze jednoho primeru, které je využíváno např. při sekvenování. (Šimková, 2012)

## 5.4 Forezní typizace DNA

Odhaduje se, že asi 99,7 % genomu je u všech jedinců v lidské populaci shodných. Ve zbývajících 0,3 % genomu je možno nalézt oblasti, které jsou mezi jednotlivci rozdílné. Díky tomu je možné od sebe lidské jedince na genetické úrovni odlišit. (Butler, 2012)

Místa v genomu lišící se mezi jednotlivci jsou označována jako polymorfismy. Slovo pochází z latinského *poly* znamenající mnoho a *morph* neboli forma. V lidské DNA existuje velké množství polymorfismů a díky jejich známé pozici na příslušných chromozómech mohou být použity k mapování genů. Díky tomu jsou také nazývány genomové markery.

Lidské jaderné chromozómy jsou uspořádány do 23 párů, takže každý gen či polymorfnní marker je zde přítomný ve dvou kopiích. Jednotlivé formy markeru / genu jsou nazývány alelami tohoto markeru / genu. Na každém z chromozómového páru je tedy umístěna jedna alela určitého

markeru / genu. Obě alely daného markeru jsou na chromozómech umístěny na stejné pozici (lokusu) a společně se označují jako genotyp jedince pro tento marker. DNA profil jednotlivce se tedy skládá z genotypů všech analyzovaných chromozómových markerů.

Velmi využívanými polymorfismy ve forenzní analýze jsou opakované sekvence, které tvoří asi polovinu nekódující DNA. V současnosti nejpoužívanějšími jsou STR neboli krátké tandemové repetice v anglickém překladu Short Tandem Repeats. (Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

#### **5.4.1 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů**

Nejstarší běžně využívanou technikou pro genetickou analýzu byla metoda RFLP neboli česky polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z anglického Restriction Fragment Length Polymorphism), která byla vyvinuta a poprvé použita Alecem Jeffreyem pro objasnění sexuálního napadení a následné vraždy dvou dívek v Leicesteru v Anglii.

Typizace pomocí RFLP zahrnovala vyhodnocení přítomnosti a počtu VNTR (minisatelitů). VNTR neboli dlouhé tandemové repetice s variabilním počtem opakování jsou repetitivní sekvence o délce 10 až 60 párů bází a v genomu se opakují přibližně tisíckrát. (Elkins, 2013; Pico, 2020)

Technika je založena na použití restrikčních endonukleáz, což jsou enzymy, které rozpoznají určitou specifickou sekvenci nukleotidů ve vlákně DNA a následně v tomto místě molekulu DNA štěpí. Vytvořené fragmenty (VNTR) jsou následně rozděleny dle velikosti elektroforézou na agarózovém gelu. Oddělené fragmenty jsou poté denaturovány (převedeny na jednovláknové molekuly) a procesem Southern blot přeneseny na nitrocelulóзовou membránu, kde je vždy jedno z vláken fixováno. Následuje hybridizace DNA uchycené na membráně s radioaktivně značenou specifickou DNA sondou obsahující sekvenci VNTR. Sondy, které nejsou navázány, jsou následně odstraněny promytím a membrána je dále umístěna do kontaktu s rentgenovým filmem. V místě, kde se sonda navázala na sekvenci DNA se na autoradiogramu objeví linie. Každá linie (délka fragmentu) je považována za alelu, která se mezi jednotlivci liší. Jejich poloha je následně porovnávána s umístěním linií markerů o známé relativní molekulové hmotnosti, které jsou analyzovány paralelně se vzorkem, čímž je zjištěna relativní hmotnost fragmentů obsažených ve vzorku.

Jeffers ve své metodě využíval multilokusové sondy, tudíž jedna sonda označovala více VNTR lokusů. Tyto sondy se navázaly na různé oblasti v lidském genomu a po znázornění na autoradiogramu vytvořily komplexní vzor připomínající čárový kód.

Tato technika však vyžadovala velké množství dvouvláknové DNA s vysokou molekulovou hmotností, což byl problém, jelikož ve vzorcích z místa činu byla obvykle nalezena pouze malé množství DNA. Analýza technikou RFLP navíc dříve trvala velmi dlouho, přibližně 6 až 8 týdnů, nyní lze provést do několika hodin. Z těchto i mnoha dalších důvodů se tato technika v moderní forenzní analýze již nevyužívá. (Butler, 2010; Elkins, 2013; Pico, 2020)

#### **5.4.2 Krátké tandemové repetice**

Identifikace profilů DNA pomocí STR markerů přijata byla před více než čtvrt stoletím a stále je považována za jednu z nejpoužívanějších metod, přestože byly tyto markery původně vyvinuty pro studie genetického mapování.

Krátké tandemové repetice STR označované také jako mikrosatelity či SSR (simple sequence repeats) jsou kratší opakující se oblasti molekuly DNA, které mají délku 2 až 7 párů bází. Tyto markery jsou rozmístěny v celém genomu a vyskytují se přibližně každých 10 000 nukleotidů. Počet repetice v STR markerech je mezi jednotlivci velmi variabilní, a proto se jedná o výborný nástroj pro identifikaci osob. Alely STR se u lidí liší jak délkou, tak sekvencí a jsou pojmenovávány dle délky opakující se sekvence. Pokud se vedle sebe stále dokola opakují dva nukleotidy, jedná se o dinukleotidové repetice, při opakování tří nukleotidů jde o trinukleotidy, čtyři opakující se sekvence nazýváme tetranukleotidy atd. Pro lidskou identifikaci jsou však nejvíce využívány tetranukleotidové repetice. (Butler, 2012; Kayser a kol., 2023)

Variabilita v rámci STR je tak vysoká, že jedinec může mít různý počet repetice v každé z jeho dvou alel. Osoba, která má alely daného STR lokusu stejné, je pro tento lokus označována jako homozygotní. Jestliže však každá z těchto alel obsahuje jiný počet opakování nukleotidové sekvence, je jedinec pro daný lokus heterozygotní. (Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

STR lokusy v rámci DNA pocházející z forenzního vzorku bývají amplifikovány pomocí PCR a produkty této reakce jsou následně detekovány elektroforézou. Na počátku používání této metody okolo roku 1990 byl proces separace a detekce gelové elektroforézy k rozlišení alel STR velmi pomalý, náročný na práci a špatně automatizovaný. Zvrat poté nastal využitím kapilární elektroforézy (CE) umožňující rychlou separaci alel STR v úzkých skleněných



kapilárách a dalším vylepšením této metody bylo následné využití multikapilární CE. (Elkins, 2013; Kayser a kol., 2023)

Pro amplifikaci lidských STR lokusů pomocí standardní multiplexové PCR je využíváno mnoho komerčně dostupných souprav, které jsou primárně zaměřeny na detekci STR v autozomálních lokusech na jednom z jaderných chromozómů 1-22. Dostupné jsou však i sady pro amplifikaci STR lokusů z pohlavích chromozómů X a Y. Následná detekce amplifikované STR může být provedena pomocí různých metod. Lze využít značení radioaktivními nukleotidy či barvení stříbrem, avšak v moderních PCR soupravách jsou STR lokusy nejčastěji detekovány skrz fluorescenční barviva, která jsou během PCR amplifikace navázána na 5' konce jednoho z páru primerů v sadě pro jednotlivé lokusy. (Elkins, 2013)

Dále je zapotřebí stanovit délku fragmentů vzniklých během PCR k čemuž je v současnosti nejvíce využívána kapilární elektroforéza (CE), která je prováděna v genetickém analyzátoru v průběhu času. Část produktu vzniklého PCR amplifikací je společně s vnitřním žebříčkem (standardní fragmenty o známé délce bázi) převedena do zkumavky s formaldehydem, díky kterému fragmenty zůstanou ve formě jednotlivých řetězců. Poté je spuštěn automatický proces, při kterém je vzorek nabrán na začátek tenké skleněné kapiláry pomocí elektrického pulsu. Tato kapilára je plněna polymerem lineárního akrylamidu nebo polydimethylamidu a pomocí elektrod, které jsou zanořeny do pufru je na ní přiváděno napětí.

Díky tomu vzorek začne putovat kapilárou směrem ke kladné části stejnosměrného elektrického pole a dochází k rozdělení fragmentů na základě jejich mobility. Kratší fragmenty putují kapilárou rychleji než fragmenty delší, díky čemuž lze dle času potřebného pro fragment na překonání celé kapiláry určit délku tohoto fragmentu. V koncové části je kapilára prosvěcována laserem skrz tzv. okénko. Ve chvíli, kdy laserovým paprskem projde fluorescenčně označený fragment DNA, dochází u fragmentu k silné fluorescenci v určitém spektru (dle navázaného primeru při PCR) a ta je detekována detektorem. Tyto fluorescence jsou v elektroforetogramu zaznamenávány charakteristickým píkem určité barvy v závislosti v čase.

Srovnáním s píky vnitřního žebříčku také vzniklými separací pomocí kapilární elektroforézy je software schopný vypočítat délku sledovaných STR fragmentů a tu přepočítat na počet opakování sledované sekvence neboli číslo alely. (Šimková, 2012)

Alely STR lokusů jsou pojmenovávány podle počtu repetice sledované sekvence nukleotidů. Pokud se tedy u jedince v jedné z alel sekvence opakuje třikrát a ve druhé alele šestkrát, je genotyp jedince pro tento lokus 3,6.

Jak již bylo výše zmíněno, DNA profil jednotlivce se skládá z genotypů všech analyzovaných chromozómových markerů. Toho lze využít jak při identifikaci pachatele trestného činu, tak při paternitním testování, kdy je zapotřebí určit otce dítěte, viz Obr. 2, Obr. 3. (Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

	Vaginal swab	Fingernails	Victim	Suspect 1	Suspect 2	Suspect 3
Marker 1	19,22,24,26	22,24	19,26	19,29	20,26	22,24
Marker 2	4,6,9	6,9	4,6	5,8	7,11	6,9
Marker 3	13,22,24,27	13,24	22,27	15,17	14,19	13,24
Marker 4	8,10,11,13	8,10	11,13	9,11	9,12	8,10

**Obr. 2** - Výsledky DNA testování v případě znásilněné ženy

Vaginal swab – vaginální tampón, Fingernails – nehty, Victim – oběť,

Suspect 1 – podezřelý 1, Suspect 2 – podezřelý 2, Suspect 3 – podezřelý 3

(Převzato z: DNA and Biotechnology, Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

	Child	Mother	Father 1	Father 2	Father 3
Marker 1	21,30	30,36	31,34	21,29	21,27
Marker 2	4,10	4,9	6,15	10,11	8,13
Marker 3	16,24	11,24	8,10	16,20	6,22
Marker 4	6,12	12,16	6,10	6,14	7,10

**Obr. 3** - Stanovení DNA profilů pomocí čtyř markerů při paternitním testování

Child – dítě, Mother – matka, Father 1 – otec 1, Father 2 – otec 2, Father 3 – otec 3

(Převzato z: DNA and Biotechnology, Fitzgerald-Hayes & Reichsman, 2010)

V rámci Evropy byl dohodou ustanoven seznam lokusů, který by každá laboratoř měla být schopná otestovat tak dobře, aby výsledky analýzy mohly být porovnávány mezi jednotlivými zeměmi Evropské Unie. Tento seznam je nazýván ESS, viz Tab. 1. (anglicky European Set of Standards) a zahrnuje 12 lokusů, které jsou plně kompatibilních s podobným systémem využívaným v USA, který sleduje celkem 20 lokusů a nazývá se CODIS, viz Tab. 2. (Porada a kol., 2019)

**Tab. 1** - Lokusy obsažené v ESS (Evropa)

TH01	vWA	FGA	D1S1656	D2S441	D3S1358
D8S1179	D10S1248	D12S391	D18S51	D21S11	D22S1045

(Převzato z: Porada a kol., 2019)

**Tab. 2** - Lokusy obsažené v CODIS Core Loci (USA)

TH01	vWA	FGA	D1S1656	D2S441	D3S1358
D8S1179	D10S1248	D12S391	D18S51	D21S11	D22S1045
CSF1PO	TPOX	D2S1338	D5S818	D7S820	D13S317
D16S539	D19S433				

(Převzato z: Porada a kol., 2019)

### 5.4.3 Jednonukleotidové polymorfismy

V případech, kdy typizace pomocí STR není možná z důvodu degradace vzorků či nízkého počtu kopií DNA, lze pro určení profilu DNA využít metodu SNP. Metoda jednonukleotidového polymorfismu SNP (anglicky single nucleotide polymorphism) je založena na variabilitě v určité pozici sekvence DNA nukleotidů mezi jednotlivci. (Oosthuizen & Howes, 2022)

Pokud např. jedna o osob má v určitém místě v genomu sekvenci AATGGATA a další z osob na stejném místě sekvenci AATGGGTA, jedná se o jednonukleotidový polymorfismus, jelikož šestý nukleotid v této sekvenci je mezi osobami rozdílný. (Šimková, 2012)

Výhodou SNP oproti STR je pro analýzu jsou zapotřebí pouze velmi malá množství DNA a zároveň je výskyt SNP v genomu mnohem častější. Vyskytují se přibližně každých 1000 bází. Jednou z nevýhod SNP však je, že jejich variabilita je oproti STR velmi nízká. Pro SNP je možná variabilita pouze mezi 4 typy alel – A, C, G, T, kdežto některé alely v STR mohou mít více než 20 variant. Z tohoto důvodu je pro rozlišení jedinců na stejné úrovni jako při STR zapotřebí provést analýzu většího množství SNP, odhadováno je 50 a více. (Elkins, 2013)

Důležitou podmínkou pro metodu analýzy SNP markerů je tedy schopnost zkoumat více markerů současně. Tomuto popisu odpovídá velmi využívaná technika minisekvenování, někdy také nazývána SNaPshot. Tato metoda zahrnuje prodlužování primeru specifického pro určitou alelu pomocí dideoxynukleotidtrifosfátu (ddNTP) značeného fluorescenčním barvivem.

Metoda minisekvenování se skládá ze tří primárních kroků – amplifikace, prodlužování primeru a analýzy. Nejprve je oblast kolem každého lokusu SNP amplifikována pomocí PCR (většinou

je používána multiplexní PCR). Po ukončení amplifikace jsou enzymaticky odstraněny nenavázané zbytky primerů a dNTP.

Následuje extenze neboli prodlužování primeru přidáním směsi extenzních primerů, čtyř různých fluorescenčně značených ddNTP a polymerázy. Každý z těchto ddNTP má svou unikátní barvu, např. ddATP zelenou, ddCTP modrou, ddGPT žlutou (zobrazovanou jako černou) a ddTPT červenou. Extenzní primery nasedají bezprostředně vedle místa SNP, tudíž následně polymerázou připojený ddNTP zobrazí námi sledovaný nukleotid. Ve chvíli, kdy je ddNTP do syntézy nového vlákna přidán již za něj, není možné připojit další nukleotid, jelikož postrádá na uhlíku v pozici 3' hydroxylovou skupinu. Prodlužování primeru probíhá obvykle během 25 cyklů v termocykléru, kde je střídáno zahřívání a chlazení.

Po prodlužovací reakci jsou ze směsi odstraněny nezačleněné fluorescenční ddNTP. Délková separace fragmentů vzniklých při sekvenační reakci a následná detekce je provedena pomocí kapilární elektroforézy využívající laser a detektor, kterou zobrazuje elektroferogram. Každý nukleotid je zde znázorňován píkem určité barvy. Pík nukleotidu A má tedy barvu zelenou, nukleotid C modrou, G černou a T červenou. Pořadí píků s různou barvou tedy udává sekvenci nukleotidů ve sledovaném fragmentu. (Butler, 2012; Passarge, 2019)

Připojením většího počtu nukleotidů k 5' konci jednoho z primerů, vznikne několika nukleotidová vzdálenost mezi dvěma sousedními primery a díky tomu je možné analyzovat několik lokusů současně. K tomu je typicky využíváno připojení různých dlouhých poly-T řetězců (většinou o délce 3 až 5 bází), které jsou tvořeny pouze nukleotidy T a díky nimž je výsledná pozice píku v elektroforetogramu změněna. (Butler, 2012; Šimková, 2012)

#### **5.4.4 Analýza mitochondriální DNA**

Ve forenzní praxi se k analýze mitochondriální DNA (mtDNA) obvykle přistupuje, když daný vzorek postrádá neporušenou jadernou DNA, např. pokud se jedná o biologický materiál ve velmi malém množství či vzorek s vysokou úrovní degradace. Mitochondriální DNA má však využití, i pokud je zapotřebí zkoumat mateřskou příbuznost mezi vzorky (i napříč více generacemi) nebo při analýze starověké DNA. Ve zmíněných případech může mít analýza STR omezenou účinnost, jelikož lidské buňky obsahují tisíckrát více kopií genomu mtDNA než je množství jaderné DNA, může být analýza markerů mateřské linie jedinou možností pro získání genetické informace z těchto vzorků. (Avila a kol., 2019; Strobl a kol., 2018)

Typizace mtDNA ve forenzních případech se obvykle provádí pomocí Sangerovy sekvenace (SS), která je následována metodou kapilární elektroforézy (CE). Toto stanovení se zaměřuje na identifikaci polymorfismů ve kterémkoliv ze tří hyper-variabilních regionů (HVR), které se nacházejí uvnitř nekódující části mitochondriálního genomu, poblíž původu replikace, označovaného jako kontrolní oblast (CR). Většina variabilních částí, díky kterým, je možné jednotlivce odlišit, se nachází v hyper-variabilních oblastech I a II (HV-I a HV-II), a proto jsou považovány za nejvíce informativní části mtDNA genomu. (Avila a kol., 2019)

Variabilita mezi jedinci ve výše zmíněných oblastech je většinou zapříčiněna záměnou jednotlivých nukleotidů (SNP) nebo drobnými změnami délky lokusu. Změna délky lokusu nastane např. při inzerci (neboli vřazení) nebo delecii (vypadnutí) jednoho, dvou či tří nukleotidů. (Šimková, 2012)

Sangerova sekvenace neboli Dideoxy sekvenování DNA je metoda spočívající v ukončení syntézy komplementárního vlákna ve chvíli, kdy se na místo normálního nukleotidu zařadí ddNTP, za který už není možno připojit další nukleotid, jelikož nemá na uhlíku v pozici 3' hydroxylovou skupinu. Reakce probíhá paralelně ve čtyřech zkumavkách, které obsahují sekvenační směs a vždy jeden ze čtyř fluorescenčně značených nukleotidů ddNTP. Pokud je tedy např. ve zkumavce obsažen ddATP, je vždy syntéza nového vlákna ukončena po navázání ddATP na nukleotid T templátového vlákna, čímž je vytvořen DNA fragment o určité délce. Díky tomu, že jsou v každé reakci dNTP ve velkém nadbytku a ddNTP ve velmi nízké koncentraci je možné získat fragmenty všech různých délek. Tento produkt je následně rozdělen kapilární elektroforézou, kde je laserově zaznamenáván fluorescenční signál každého průchozího fragmentu. Každý nukleotid je poté zobrazen jako křivka konkrétní barvy. (Passarge, 2019)

Po kompletním sekvenování mitochondriálního genomu bylo zjištěno, že až 75 % z celkového počtu polymorfních oblastí se nachází v kódující oblasti mtDNA, která technikou Sangerovy sekvenace není analyzována. V současnosti je však možné provést analýzu i těchto oblastí, pokud je místo SS s následnou CE využita nová metoda masivně paralelního sekvenování (MPS), která je schopna analyzovat celý mitochondriální genom. (Avila a kol., 2019)

Při typizaci mtDNA je stejně, jako v dalších forenzních analýzách vytvářena databáze stanovených haplotypů. Vzhledem k tomu, že mitochondriální DNA je děděna pouze od matky, může být využita k získání informací o matčiných předcích a pomocí sledování fylogeografického rozložení větví stromu mtDNA, je možné určit, do které geografické oblasti

daná mitochondriální linie patří. Tyto informace jsou uplatňovány např. při hledání pohřešovaných osob, identifikaci lidských pozůstatků nebo ke sledování dřívějších lidských migrací. (Aizpurua-Iraola a kol., 2023; Wood a kol., 2019)

#### **5.4.5 Sekvenování nové generace**

V posledních letech bylo prokázáno, že technologie masivně paralelního sekvenování MPS, známá také jako sekvenování nové generace NSG (z anglického Next-Generation Sequencing) otevírá nové možnosti pro forenzní genetickou analýzu, především díky zvýšenému množství informací, které lze získat z jediného experimentu provedeného na jednom vzorku. NGS umožňuje v rámci jedné reakce rychlé sekvenování mnoha cílových markerů, zahrnující STR i SNP.

Tato technika nepoužívá na princip oddělování alel na základě jejich velikosti, a proto je možné automatické paralelní sekvenování milionů DNA fragmentů, jehož výstupem může být sekvence celého genomu. Sekvenování je možné v relativně krátkém čase (př. 1-50 gigabází může být přečteno v řádu několika dní) v závislosti na typu NSG platformy. Jedním z prvních forenzních genetických markerů hodnocených pomocí technologie NGS byl úplný mitochondriální genom. (Davenport a kol., 2023; Melchionda a kol., 2020; Passarge, 2019)

Sekvenace pomocí NGS je zahrnuje složitý proces skládající se z různých kroků. Tyto kroky jsou příprava templátů, sekvenování syntézou bez elektroforézy, obrazové zpracování s vysokou rozlišovací schopností, označení sekvenovaných fragmentů do skupin, a nakonec metody porovnání sekvence získané ze vzorků se sekvencí referenční. (Passarge, 2019)

## 6 INTERPRETACE FORENZNÍCH DAT

DNA profil vytvořený v laboratoři analýzou biologického materiálu je dále interpretován pomocí pravděpodobnostního genotypového softwaru. Ve vzorku z místa činu je možný výskyt genetické informace od jedné či více různých osob. Jestliže je v profilu přítomna DNA dvou nebo více osob, je označován jako směs. Pokud se zde nachází genetická informace pouze jednoho člověka, jedná se o profil s jedním zdrojem. (Bai a kol., 2022; Kruijver & Bright, 2023)

Pochází – li stanovovaný DNA profil z trestné činnosti, může být porovnáván s jedním nebo více referenčními genotypy osob, které jsou považovány za zájmové či genotypy jedinců, u nichž lze předpokládat, že svým DNA do vzorku mohli přispět. Např. pokud je na košili nalezena stopa krve, předpokládá se přítomnost DNA toho, kdo košili obvykle nosí. V případech, kdy je profil stanovován z důvodu identifikace pohřešované osoby a její genotyp není z minulosti znám, snaží se analytici o identifikaci této osoby prostřednictvím genotypů jejich potencionálních příbuzných. (Bai a kol., 2022; Lin a kol., 2020)

Vypovídající hodnotu výsledných dat při typizaci DNA určuje poměr pravděpodobnosti (LR). Při výpočtu kteréhokoliv poměru pravděpodobnosti je využívána dvojice hypotéz, které se vzájemně vylučují. Hypotéza představující obžalobu se snaží prokázat sílu důkazů na podporu tvrzení, že se podezřelý podílel na zločinu. Kdežto hypotéza obhajoby předkládá alternativní vysvětlení a to, že podezřelý je nevinný a přispěvatelem genetické informace, je jiná neznámá osoba. Tyto dvě hypotézy jsou nazývány propozice a výsledná data se hodnotí ve vztahu k nim.

Jestliže je např. na místě činu nalezena krvavá skvrna a zdá se, že pochází od jedné osoby a zároveň existuje pouze jedna osoba zájmu (podezřelý), můžou propozice vypadat takto: Hypotéza obžaloby říká, že genetická informace ve stopě patří podezřelému. Oproti tomu hypotéza obhajoby navrhuje, že tato genetická informace pochází od neznámého jedince, který s podezřelým není příbuzný. V případě nalezení více DNA ve stopě, např. dvou, bývají propozice mírně modifikovány a hypotéza obžaloby může tvrdit, že ze dvou přispěvatelů genetické informace je jeden navržen jako podezřelý. Hypotéza obhajoby naproti tomu říká, že DNA pochází od dvou nepříbuzných jedinců. Pokud existuje více podezřelých osob, využívá se několik LR na základě různých dvojic hypotéz. (Buckleton a kol., 2022; Gill a kol., 2020; Slooten, 2022)

Obvykle používané dvojice hypotéz však nejsou vyčerpávající, jelikož vynechávají možnost, že je pachatelem jedinec k podezřelému příbuzný. Příbuznost jedinců totiž způsobuje

komplikace, jelikož tito jedinci sdílejí stejné alely s mnohem větší pravděpodobností než jedinci nepříbuzní. Mnoho softwarových programů však již nyní běžně hlásí LR pro alternativní tvrzení, že původcem genetického materiálu ve stopě je příbuzný podezřelého. (Lin a kol., 2020)

Poměr pravděpodobnosti (LR) tedy udává, která se dvou zvažovaných hypotéz lépe popisuje pozorovaný důkazní profil a zároveň udává o kolik lepší je vysvětlení touto hypotézou ve srovnání s vysvětlením prostřednictvím její alternativy. Lze ho vypočítat jako pravděpodobnost důkazů, pokud je návrh obžaloby pravdivý, který je dělen pravděpodobností důkazů, při pravdivém návrhu obhajoby.

Jestliže je tedy pravděpodobnost důkazů vzhledem k návrhu obžaloby větší než pravděpodobnost důkazů obhajoby, pak je LR větší než jedna a důkazy poskytují podporu návrhu obžaloby. Je – li tomu naopak a pravděpodobnost důkazů obžaloby je menší než obhajoby, LR je menší než jedna a důkazy proto podporují návrh obhajoby. Pokud se stane, že pravděpodobnost důkazů obžaloby i obhajoby je stejná, pak se LR rovná jedné a důkazy jsou neutrální. (Gill a kol., 2020; Slooten, 2022)



## ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce se zabývá charakteristikou DNA ve forenzních vzorcích. Zásadní informace o aktuálně nejvíce používaných metodách a postupech jsou sepsány v šesti kapitolách.

První kapitola je úvodem do forenzních věd a seznamuje s jejich aplikací a klasifikací.

Druhá kapitola představuje již konkrétně forenzní genetiku s přiblížením využití tohoto relativně mladého vědního oboru. Zbylá část kapitoly se zabývá objevem a historií forenzní DNA analýzy ve světě a následně jejímu prvnímu využití ve forenzní praxi u nás.

Jelikož základním průběžným artefaktem zkoumání ve forenzní analýze je kyselina deoxyribonukleová, je třetí kapitola práce podrobněji věnována právě DNA. Na začátku je popsána struktura obou nukleových kyselin DNA i RNA, avšak dále zmíněné informace jsou zaměřeny především na DNA. Kapitola přibližuje její uložení v jaderných chromozómech a jejich kategorizaci a také se dotýká funkce DNA jako nositelky dědičné informace. Poslední část této kapitoly věnuje genové expresi procesem transkripce a translace a také přenosem DNA z mateřských buněk na dceřiné pomocí procesu replikace.

Ve čtvrté kapitole bakalářské práce je pozornost zaměřena na biologické stopy. Nejprve je zde definováno, co je za biologickou stopu považováno a jak se provádí určení tkáňového a druhového původu stopy. Poté jsou zde popsány možnosti, jak lze co nejlépe provést odběr stopy, aby bylo zachováno co možná největší množství přítomné DNA a zabránilo se jejich kontaminaci a degradaci.

Následuje kapitola pojednávající o analýze DNA. V této části jsou popsány veškeré kroky, kterými biologická stopa projde po dopravení do forenzní laboratoře. Nejprve jsou zde rozvedeny metody extrakce, kvantifikace a amplifikace, tedy jak je DNA z biologického vzorku získána, jak je stanoveno její množství a z něj namnoženy lokusy potřebné pro následnou analýzu. Dále jsou zde popsány metody forenzní typizace DNA. Zde je zahrnuta nejstarší používaná metoda využívající polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), v současnosti nejpoužívanější stanovení pomocí krátkých tandemových repetitiv (STR) a technika jednonukleotidových polymorfismů. Na konci kapitoly je také zmíněna analýza mitochondriální DNA a nedávno objevená technologie masivně paralelního sekvenování.

Interpretace stanoveného individuálního DNA profilu je přiblížena v poslední kapitole. K hodnocení je využíván pravděpodobnostní poměr, a proto je zde popsán jeho výpočet a následné vyhodnocení celkové analýzy.

## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

ADAMEC, V. a B. SCHÜLLEROVÁ, 2016. Úvod do problematiky forenzních (soudních) věd. *Soudní inženýrství* [online]. Akademické nakladatelství CERM, **27**(1), 4-9 [cit. 2023-06-28]. ISSN 1211-443X. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/178987>

AIZPURUA-IRAOLA, J., R. RASAL, L. PRIETO, D. COMAS, N. BONET, F. CASALS, F. CALAFELL a P. VÁSQUEZ, 2023. Population Analysis of Complete Mitogenomes for 334 Samples from El Salvador. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **66**(102906) [cit. 2023-06-25]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497323000819>

AMBERS, A., 2023. Chapter 6 - DNA Extraction Methods for Human Skeletal Remains. In: AMBERS, Angie, ed. *Forensic Genetic Approaches for Identification of Human Skeletal Remains* [online]. Academic Press, s. 119-136 [cit. 2023-06-10]. ISBN 9780128157664. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128157664000066>

AVILA, E., P. GRAEBIN, G. CHEMALE, J. FREITAS, A. KAHMANN a C.S. ALHO, 2019. Full mtDNA Genome Sequencing of Brazilian Admixed Populations: A Forensic-focused Evaluation of a MPS Application as an Alternative to Sanger Sequencing Methods. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **42**, 154-164 [cit. 2023-06-21]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497319301437>

BAI, Z., N. ZHANG, J. LIU, H. DING, Y. ZHANG, T. WANG, J. GAO a X. OU, 2022. Identification of Missing Persons through Kinship Analysis by Microhaplotype Sequencing of Single-source DNA and Two-person DNA Mixtures. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **58**(102689) [cit. 2023-06-23]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497322000308>

BUCKLETON, J., T. KALAFUT a J. CURRAN, 2022. Guiding Proposition Setting in Forensic DNA Interpretation. *Science & Justice* [online]. **62**(5), 540-546 [cit. 2023-06-23]. ISSN 1355-0306. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1355030622001022>

BUCKLETON, John S, Jo-Anne BRIGHT a Duncan TAYLOR, 2016. *Forensic DNA Evidence Interpretation* [online]. Boca Raton: CRC press, 508 s. [cit. 2023-06-23]. Second edition. ISBN 9780367778101. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zDH3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=zQ8y49JTJe&sig=xh1GeosxRZ7LARywsjPiwFXMBUG&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zDH3DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=zQ8y49JTJe&sig=xh1GeosxRZ7LARywsjPiwFXMBUG&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

- BUTLER, John M., 2010. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. United States of America: Academic Press is an imprint of Elsevier, 500 s. ISBN 978-0-12-374999-4.
- BUTLER, John M., 2012. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing : Methodology*. China: Academic Press is an imprint of Elsevier, 708 s. ISBN 978-0-12-374513-2.
- CONTE, J., M. J. POTOCZNIAK a S. S. TOBE, 2018. Using Synthetic Oligonucleotides as Standards in Probe-based qPCR. *BioTechniques* [online]. **64**(4), 177 - 179 [cit. 2023-06-19]. ISSN 1940-9818. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2018-2000>
- DAVENPORT, L., L. DEVESSE, D. SYNDERCOMBE COURT a D. BALLARD, 2023. Forensic Identity SNPs: Characterisation of Flanking Region Variation Using Massively Parallel Sequencing. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **64**(102847) [cit. 2023-06-21]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497323000224>
- DIGITAL EVIDENCE, 2009. *The National Institute of Standards and Technology (NIST)* [online]. [cit. 2023-06-28]. Dostupné z: <https://www.nist.gov/digital-evidence>
- ELKINS, Kelly M, 2013. *Forensic DNA Biology* [online]. United States: Academic Press [cit. 2023-06-20]. ISBN 9780123945853. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/book/9780123945853/forensic-dna-biology>
- FITZGERALD-HAYES, Molly a Frieda REICHSMAN, 2010. *DNA and Biotechnology* [online]. 3rd Edition. United States of America: Academic Press [cit. 2023-06-24]. ISBN 978-0-12-048930-5. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpDNABE006/toc?b-q=forensic%20DNA%20samples&cid=kpDNABE006&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpDNABE006/toc?b-q=forensic%20DNA%20samples&cid=kpDNABE006&include_synonyms=no)
- Forezní genetika. ČSSFG – Československá společnost pro forezní genetiku, z.s. [online]. [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: [https://www.cssfg.org/www/cssfg/?page\\_id=36](https://www.cssfg.org/www/cssfg/?page_id=36)
- FORSBERG, CH., L. PETTERSSON a L. BOISO, 2022. The Effect of Freezing, Thawing and Long-term Storage on Forensic DNA extracts. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* [online]. **8**, 77-78 [cit. 2023-06-28]. ISSN 1875-1768. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1875176822000300>

FUNES-HUACCA, M. E., K. OPEL, R. THOMPSON a B. R. MCCORD, 2011. A Comparison of the Effects of PCR Inhibition in Quantitative PCR and Forensic STR Analysis. *Electrophoresis* [online]. **32**(9), 1084-1089 [cit. 2023-06-25]. ISSN 0173-0835. Dostupné

z: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elps.201000584>

GILL, Peter, Øyvind BLEKA, Oskar HANSSON, Corina BENSCHOP a Hinda HANED, 2020. *Forensic Practitioner's Guide to the Interpretation of Complex DNA Profiles*. Academic Press. ISBN 9780128205624.

GINART, S., M. CAPUTO, E. ALECHINE, D. CORACH a A. SALA, 2016. Development of a Quantitation Approach for Total Human and Male DNA Based on Real Time PCR Followed by High Resolution Melting Analysis. *Electrophoresis* [online]. **37**(21), 2734-2741 [cit. 2023-06-25]. ISSN 0173-0835. Dostupné

z: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201600185>

HEGDE, R., S. HEGDE, P. JOSHI, P. P. GAI, S. S. KULKARNI a P. B. GAI, 2022. Rapid and Inexpensive Method of PCR Ready DNA Isolation from Human Peripheral Blood and Saliva. *Analytical Biochemistry* [online]. **655**(114852) [cit. 2023-06-28]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269722003128>

HIRT, Miroslav, František VOREL a Petr HEJNA, 2018. *Velký výkladový slovník soudnělékařské terminologie* [online]. Praha: Grada [cit. 2023-06-27]. ISBN 978-80-247-1979-5. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/velky-vykladovy-slovník-soudnelekarske-terminologie-5105/>

Historie forenzní genetiky. ČSSFG – Československá společnost pro forenzní genetiku, z.s. [online]. [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: [https://www.cssfg.org/www/cssfg/?page\\_id=75](https://www.cssfg.org/www/cssfg/?page_id=75)

KANÁL EXPERTIZA. Krev – Lze pachatele usvědčit pomocí krevní skupiny? Brutální vražda studentky byla klíčovým milníkem. *Stream* [online]. 30. září 2018 [cit. 2023-04-23]. Dostupné z: <https://www.stream.cz/expertiza/krev-lze-pachatele-usvedcit-pomoci-krevni-skupiny-brutalni-vrazda-studentky-byla-klicovym-milnikem-322212>

- KATZ, Evgeny a Jan HALÁMEK, 2016. *Forensic Science: A Multidisciplinary Approach*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 424 s. ISBN 9783527693535.
- KAYSER, M., A. SAJANTILA, J. M. BUTLER, W. PARSON, A. SALAS, P. GILL, T. PARSONS, CH. PHILLIPS, T. EGELAND, Ch. MARSHALL, 2023. Special Issue: Forensic Genetics: Unde venisti et Quo Vadis?. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **65**(102881) [cit. 2023-06-20]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187249732300056X>
- KLEIN, S. B. a M. R. BUONCRISTIANI, 2017. Evaluating the Efficacy of DNA Differential Extraction Methods for Sexual Assault Evidence. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **29**, 109-117 [cit. 2023-06-17]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497317300820?via%3Dihub>
- KRUIJVER, M. a J. A. BRIGHT, 2023. A Comparison of Likelihood Ratios with and without Assuming Relatedness for DNA Mixtures Interpreted Using a Continuous Model. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **62**(102800) [cit. 2023-06-23]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497322001417>
- LEDERMAN, L., 2009. QPCR. *BioTechniques* [online]. **47**(4), 817-819 [cit. 2023-06-19]. ISSN 1940-9818. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113234>
- LEE, S. B., B. MCCORD a E. BUEL, 2014. Advances in Forensic DNA Quantification: A Review. *Electrophoresis* [online]. **35**(21-22), 3044-3052 [cit. 2023-06-25]. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201400187>
- LIANG, J. W a H. M. COYLE, 2021. A Short Interspersed Nuclear Element-based Quantitative PCR Assay for Simultaneous Human and Dog DNA Detection and Quantification. *BioTechniques* [online]. **70**(3), 175-180 [cit. 2023-06-19]. ISSN 1940-9818. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/btn-2020-0144>
- LIN, M.-H., J.-A. BRIGHT, S. N. PUGH aj. S. BUCKLETON, 2020. The Interpretation of Mixed DNA Profiles from a Mother, Father, and Child Trio. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **44**(102175) [cit. 2023-06-23]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497319303229#bib0010>

MELCHIONDA, F., F. STANCIU, L. BUSCEMI, M. PESARESI, A. TAGLIABRACCI a CH. TURCHI, 2020. Searching the Undetected mtDNA Variants in Forensic MPS Data. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **49**(102399) [cit. 2023-06-21]. ISSN 1872-4973. Dostupné

z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187249732030171X>

NYBO, K., 2011. QPCR: Technical Replicate Variation. *BioTechniques* [online]. **50**, 23-25 [cit. 2023-06-19]. ISSN 1940-9818. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113585>

OOSTHUIZEN, T. a L. M. HOWES, 2022. The Development of Forensic DNA analysis: New Debates on the Issue of Fundamental Human Rights. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **56**(102606) [cit. 2023-06-20]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497321001435>

PASSARGE, Eberhard, 2019. *Barevný atlas genetiky*. Ilustroval Jürgen WIRTH, přeložil Milada KOHOUTOVÁ. Praha: Grada Publishing, 454 s. ISBN 978-80-247-3099-8.

PICO, Yolanda, 2020. *Chemical Analysis of Food - Techniques and Applications (2nd Edition)* [online]. Elsevier [cit. 2023-06-20]. ISBN 978-0-12-813267-8. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpCAFTA02/toc?b-q=PCR&cid=kpCAFTA02&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpCAFTA02/toc?b-q=PCR&cid=kpCAFTA02&include_synonyms=no)

PORADA, Viktor, Albert BRADÁČ, Albert BRADÁČ ml., Eduard BRUNA, Markéta BRUNOVÁ, Michal DOGOŠI, Hana ELIÁŠOVÁ, Alena GALAJDOVÁ, Jiřina HOFMANOVÁ, Roman HRADIL, Jan CHMELÍK, Jaroslav IVOR, Přemysl JANÍČEK, Ludvík JUŘÍČEK, Gustáv KASANICKÝ, Zdeněk KONRÁD, Václav KUČERA, Miroslav MATEJÍK, Stanislav NEČAS, Vlastimil PRŠAL, Roman RAK, Sergej ROMŽA, Vladimír SMEJKAL, Miloš SOKOL, Josef STIERANKA, Jiří STRAUS, Přemysl STREJC, Jaroslav SUCHÁNEK, Marián SVETLÍK, Hana ŠULÁKOVÁ, Dušan ŠIMŠÍK, Aleš VÉMOLA, 2019. *Kriminalistika: technické, forenzní a kybernetické aspekty*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 1205 s. ISBN 978-80-7380-741-2.

ROSYPAL, Stanislav, 2001. *Terminologie molekulární biologie: české odborné termíny, jejich definice a anglické ekvivalenty*. Brno: Stanislav Rosypal. ISBN 8090256236.

ROTHER, J. a M. NAGY, 2015. Separation of Y-chromosomal Haplotypes from Male DNA Mixtures via Multiplex Haplotype-specific Extraction. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **19**, 223-231 [cit. 2023-06-17]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497315300387>

SLOOTEN, K., 2022. The Comparison of DNA Mixture Profiles with Multiple Persons of Interest. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **56**(102592) [cit. 2023-06-23]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497321001290>

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, 2009. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 894 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

SØNDERGAARD, M.S.R. a J. HOORFAR, LÖFSTRÖM, C., M.H. JOSEFSEN a T. HANSEN, 2015. 9 - Fluorescence-based Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Technologies for High Throughput Screening of Pathogens. In: BHUNIA, Arun K., Moon S. KIM a Chris R. TAITT. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment: Biosensor Technologies, Hyperspectral Imaging and Practical Applications* [online]. Woodhead Publishing, s. 219-248 [cit. 2023-06-19]. ISBN 9780857098016. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857098016000095>

STROBL, CH., M. EDUARDOFF, M. M. BUS, M. ALLEN a W. PARSON, 2018. Evaluation of the Precision ID Whole MtDNA Genome Panel for Forensic Analyses. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **35**, 21-25 [cit. 2023-06-24]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497318300280>

ŠIMKOVÁ, Halina, 2012. *Breviář forenzní genetiky: forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích* [online]. Brno: Tribun EU, 212 s. [cit. 2023-04-12]. ISBN 978-80-263-0247-6. Dostupné z: <https://www.cssfg.org/www/cssfg/?p=458>

TANIGUCHI, K., T. AKUTSU, K. WATANABE, Y. OGAWA a K. IMAIZUMI, 2022. A Vertebrate-specific qPCR Assay as an Endogenous Internal Control for Robust Species Identification. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **56**(102628) [cit. 2023-06-19]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497321001642>



UERLINGS, S., V. WELTER, B. MADEA a M. GRABMÜLLER, 2021. Comparative Analysis of DNA Extraction Processes for DNA-based Identification from Putrefied Bodies in Forensic Routine Work. *Forensic Science International* [online]. **320**(110707) [cit. 2023-06-28]. ISSN 0379-0738. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907382100027X>

VANDEWOESTYNE, M., K. GOOSSENS, CH. BURVENICH, A. V. SOOM, L. PEELMAN a D. DEFORCE, 2013. Laser Capture Microdissection: Should an Ultraviolet or Infrared Laser Be Used?. *Analytical Biochemistry* [online]. **439**(2), 88-98 [cit. 2023-06-17]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269713002054>

*VELKÝ LÉKAŘSKÝ SLOVNÍK* [online], 1998 - 2023. [cit. 2023-06-27]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/>

WOOD, M. R., K. STURK-ANDREAGGI, J. D. RING, N. HUBER, M. BODNER, M. H. CRAWFORD, W. PARSON a CH. MARSHALL, 2019. Resolving Mitochondrial Haplogroups B2 and B4 with Next-generation Mitogenome Sequencing to Distinguish Native American from Asian Haplotypes. *Forensic Science International: Genetics* [online]. **43**(102143) [cit. 2023-06-25]. ISSN 1872-4973. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497319301644>

## ZDROJE OBRÁZKŮ A TABULEK

BUTLER, John M., 2012. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. China: Academic Press is an imprint of Elsevier, 708 s. ISBN 978-0-12-374513-2.

FITZGERALD-HAYES, Molly a Frieda REICHSMAN, 2010. *DNA and Biotechnology* [online]. 3rd Edition. United States of America: Academic Press [cit. 2023-06-24]. ISBN 978-0-12-048930-5. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpDNABE006/toc?b-q=forensic%20DNA%20samples&cid=kpDNABE006&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpDNABE006/toc?b-q=forensic%20DNA%20samples&cid=kpDNABE006&include_synonyms=no)

PORADA, Viktor, Albert BRADÁČ, Albert BRADÁČ ml., Eduard BRUNA, Markéta BRUNOVÁ, Michal DOGOŠI, Hana ELIÁŠOVÁ, Alena GALAJDOVÁ, Jiřina HOFMANOVÁ, Roman HRADIL, Jan CHMELÍK, Jaroslav IVOR, Přemysl JANÍČEK, Ludvík JUŘÍČEK, Gustáv KASANICKÝ, Zdeněk KONRÁD, Václav KUČERA, Miroslav MATEJÍK, Stanislav NEČAS, Vlastimil PRŠAL, Roman RAK, Sergej ROMŽA, Vladimír SMEJKAL, Miloš SOKOL, Josef STIERANKA, Jiří STRAUS, Přemysl STREJC, Jaroslav SUCHÁNEK, Marián SVETLÍK, Hana ŠULÁKOVÁ, Dušan ŠIMŠÍK, Aleš VÉMOLA, 2019. *Kriminalistika: technické, forenzní a kybernetické aspekty*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 1205 s. ISBN 978-80-7380-741-2.