

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017

ROMANA STUHLOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat (AF)



Forenzní genetik a využívající domestikovaná zvířata
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Vypracoval:
Romana Stuhlová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci:

Forenzní genetika využívající domestikovaná zvířata

vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna 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 v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....
podpis

Zadání

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za jeho ochotu a trpělivost, cenné rady, odbornou pomoc, podněty a připomínky při zpracování této bakalářské práce.

ABSTRAKT

Bakalářská práce uvádí zpracované téma forenzních analýz u domestikovaných zvířat. Cílem práce je vyhledání a popis metod molekulární genetiky, které se standardně používají při forenzní analýze biologického materiálu. Získané informace pochází z vědeckých publikací a literatury, která se uvedenou problematikou zabývá. Úvod práce seznamuje s historií forenzní genetiky a jejím vývojem. Dále práce uvádí přehled a popis metod, které jsou využívány především v kriminalistice. Text převážně pojednává o způsobech identifikace jedince na základě analýzy materiálu získaného z místa trestného činu. Uvedené metody jsou řazeny chronologicky dle postupu zpracování vzorku. Většina klasifikačních metod používaných v živočišných forenzních analýzách je na základě PCR amplifikace za použití druhově specifických primerů. V závěru práce jsou uvedeny příklady genetických markerů využívaných ve forenzní genetice. Pro snadnější orientaci v uvedené problematice poskytuje práce stručný přehled metod forenzní analýzy.

Klíčová slova: forenzní analýza, genetické markery, PCR, domestikovaná zvířata

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with forensic analyses of domesticated animals. The aim of this work is to search and describe the methods of molecular genetics, that are used in forensic analysis of biological material. This information comes from scientific publications and literature, that deal with this problematic. The introduction of this work presents the history of forensic genetics and its evolution. The work further provides an overview and a description of methods used in criminology. It mainly focuses on methods of identifying a person based on analysis of material acquired from a crime scene. These methods are sorted chronologically by the processing of a sample. Most of the classification methods used in animal forensic analyses are based on PCR amplification with the use of species-specific primers. Examples of genetic markers used in forensic genetics are presented at the end. This work provides an overview of forensic analysis methods for better orientation in this problematic.

Keywords: forensic analysis, genetic markers, PCR, domesticated animals

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Forenzní genetika a její význam	10
2.1	Historie forenzní genetiky	11
2.2	Hospodářská zvířata jako objekty zájmu.....	12
2.2.1	Forenzní materiál.....	13
2.2.1.1	Krev	15
2.2.1.2	Sperma.....	15
2.2.1.3	Sliny.....	16
2.2.2	Skladování biologického materiálu	17
3	Metody využívané při forenzních analýzách	18
3.1	Základní metody, výčet	18
3.2	Izolace DNA	19
3.2.1	PCR Inhibitory a DNA degradace	20
3.2.2	Izolace nukleových kyselin a kvantifikace	20
3.2.3	Elektroforéza	22
3.2.4	PCR.....	24
3.2.5	Sekvenování	24
4	Genetické markery využívané ve forenzních analýzách.....	25
4.1	STR markery a jejich využití.....	26
4.2	SNP – jednonukleotidové polymorfizmy	28
4.3	SNP v porovnání s STR lokusy	29
5	Závěr.....	31
6	Seznam zkratk	32
7	Přehled použité literatury.....	33

1 ÚVOD

Forenzní genetická analýza je velmi aktuálním a zajímavým tématem současné doby. Její aplikace na domestikovaná zvířata je důležitá, vzhledem ke skutečnosti, že člověk s těmito živočichy přichází velmi často do kontaktu. Forenzní genetika využívající domestikovaná zvířata může být aplikována v mnoha odvětvích. Může jít především o identifikaci jedince, čehož je využíváno především v kriminalistice a soudních případech. Další velmi významné odvětví, ve kterém je forenzní genetika aplikována je chovatelství a zemědělství, kde jde především o určení příbuznosti a původu jedinců.

Cílem práce je vyhledání a popis metod molekulární genetiky, které se standardně používají při forenzní analýze biologického materiálu. Jedná se o sumarizaci výsledků z vědeckých publikací a literatury, která se uvedenou problematikou zabývá. Práce seznamuje čtenáře s historií forenzní genetiky a jejím vývojem. Dále je zde uveden přehled a popis metod, které jsou využívány především v kriminalistice. Text převážně pojednává o způsobech identifikace jedince na základě analýzy materiálu získaného z místa trestného činu. Metody jsou řazeny chronologicky dle postupu zpracování vzorku. Většina klasifikačních metod používaných v živočišných forenzních analýzách je na základě PCR amplifikace za použití druhově specifických primerů.

Zvolením tématu mé bakalářské práce jsem chtěla získat více informací o forenzní analýze a seznámit se se zpracováním biologických vzorků z genetického hlediska. Ke zvolení tématu mě vedlo také zjištění, že analýza DNA nemusí být vždy stoprocentně úspěšná a dostačující. Ne všechny analýzy totiž poskytují individuální identifikaci. Patří sem například analýza rodových linií, mtDNA a Y chromozomu. Především tu jde ale o to, jak důležité je správně interpretovat výsledky těchto analýz a jak tyto výsledky správně a konkrétně aplikovat a zároveň tyto důkazy nepřecenit. Zpracování biologických vzorků však s sebou nese určitá úskalí. Proto je nutné dodržovat určitá pravidla, aby mohla být analýza správně provedena. Jde zde především o preciznost při manipulaci se vzorky. Kontaminace nebo záměna vzorků může nastat prakticky kdykoli během analýzy.

V této práci jsou popsány metody a genetické markery, které jsou využívány při zpracování biologického materiálu. V závěru práce jsou uvedeny příklady genetických markerů využívaných ve forenzní genetice. Pro snadnější orientaci v uvedené problematice poskytuje práce stručný přehled metod forenzní analýzy.

2 FOREZNÍ GENETIKA A JEJÍ VÝZNAM

Forezní genetika, někdy také označovaná jako forezní DNA analýza, je definována jako věda, která je aplikována při dokazování a objasňování v trestních i civilních řízeních před státními orgány. Forezní genetika je využívána také pro posuzování hypotéz mimo tato řízení, jako jsou například soukromé záležitosti fyzických osob (Šimková, 2012). Tato věda může být bezpochyby aplikovaná do mnoha odvětví, jako jsou například zemědělství a chovatelství (především k identifikaci živočišných plemen), dále do archeologie, potravinářství a mnohých dalších. Hlavní aplikací je však především kriminalistika, identifikace a posuzování biologické příbuznosti jedinců (Šimková, 2012). Tyto směry jsou často vzájemně propojeny a s rozvojem tohoto oboru přibývají směry další. Některé z nich nám mohou pomoci předpovídat různé biologické charakteristiky původce biologického materiálu, jiné nám zase mohou podpořit či vyvrátit naše hypotézy.

Při forezních analýzách je využíváno velké množství metod molekulární genetiky, jako je například genotypizace jednonukleotidových polymorfismů (SNP), sekvenční metody, polymerázová řetězová reakce (PCR) a amplifikace.

„Non-human“ forezní genetika je zaměřena zejména na domestikované druhy živočichů. Genetická analýza u těchto člověku nejbližších zvířat se prakticky neliší od genetické analýzy člověka, jakožto jednoho z živočichů. Nejčastěji analyzovanými zvířaty jsou kočka a pes, a dále hospodářská zvířata, jako je skot, koně, ovce prasata atd.“ (Šimková, 2012). Např. na místě činu může být často nalezena biologická stopa, která pochází od nějakého domestikovaného zvířete, protože člověk ve svém běžném životě s nimi přichází do styku velmi často. Tyto biologické stopy mohou být často rozhodujícím faktorem či důkazem při vyšetřování trestných činů. Uchování a správné nakládání s těmito vzorky je velmi důležité pro následné analýzy. Vlivem různých fyzikálních nebo i chemických faktorů může docházet k degradaci genetického materiálu. Může dojít například k fragmentaci, anebo k narušení jeho struktury, což může následně vést k částečné či úplné ztrátě někdy tak cenného materiálu.

Proces zpracovávání těchto biologických vzorků se od sebe značně liší v závislosti na laboratořích a zemi, ve které je analýza vykonávána. Ať už se analýza vzorků týká testování otcovství, identifikace ostatků nebo testování příbuznosti (Goodwin, 2007).

2.1 Historie forenzní genetiky

Prvním krokem ve vývoji forenzní genetiky byl v roce 1900 objev ABO systému krevních skupin vídeňským lékařem Karlem Landsteinerem (Klementa, 1981). Za svůj objev krevních skupin v roce 1930 získal Nobelovu cenu. Tento objev rozdělil jednotlivce podle typu krve. Spoluobjevitelem krevních skupin systému ABO byl také český psychiatr Jan Jánský, a to v roce 1907 (Rokyta, 2002). Následně byla vyvinuta adsorbčně-inhibiční ABO klasifikační technika, která se stala standardem ve forenzních laboratořích. Tuto metodu poprvé popsali Boyd a Boyd v roce 1934 (Thieme, 2005).

V závislosti na tomto objevu byly charakterizovány početné markery krevních skupin a rozpustné markery proteinů krevního séra. Tyto sérologické techniky byly mocným nástrojem identifikace, byly však značně omezeny v mnoha případech množstvím biologického materiálu, který byl potřebný k poskytnutí kvalitních výsledků. V letech 1960 až 1970 umožnil vývoj v molekulární biologii počínaje restričními enzymy, Sangerovým sekvenováním a Southernblottingem prozkoumat sekvence DNA. V roce 1987 byl detekován DNA polymorfismus pomocí Southern blottingu a v roce 1980 byla zaznamenána první analýza vysoce polymorfního lokusu (Goodwin, 2007). V září 1984 Alec Jeffreys realizoval potenciální forenzní aplikaci variabilního počtu tandemového opakování (VNTR), které studoval (Jeffreys, 1985).

Tyto polymorfizmy jsou využívány metodou DNA fingerprintingu. Analýza VNTR byla sice silným nástrojem, bohužel však měla několik omezení. Pro analýzu bylo požadováno velké množství DNA a nebylo možné použít degradovanou DNA. Dále bylo velmi obtížné porovnávání mezi laboratořemi a analýza byla celkově časově náročná (Goodwin, 2007). Poprvé byl DNA fingerprinting využit k identifikaci pachatele trestného činu znásilnění a následné vraždy dvou žen v anglickém hrabství Leicestershire (Šimková, 2012).

Kritický vývoj v historii forenzní genetiky však nastal s příchodem polymerázové řetězové reakce (PCR) a to procesem, který může amplifikovat specifické oblasti DNA. PCR byla objevena Karym Mullisem v roce 1983 (Saiki, 1988). Za tento objev mu byla v roce 1993 udělena Nobelova cena za chemii (Nobelprize.org, 2014).

Tato metoda přivedla citlivost analýzy až do bodu, kdy je k vytvoření DNA profilů potřeba jen malé množství buněk. Tím došlo ke snížení doby, potřebné pro vytvoření těchto profilů a může tak být analyzován jakýkoliv polymorfismus v genomu.

První aplikace PCR v soudním případě zahrnovala analýzu jednonukleotidových polymorfismů v DQ α lokusu. Toto využití bylo brzy následované analýzou krátkých tandemových repetitiv (STR), které jsou v současné době nejčastěji používané jako genetické markery v soudní vědě.

Kombinace technických pokroků, vysoká míra standardizace a kontrola kvality vedly k uznání forenzní DNA analýzy, jakožto robustního a spolehlivého forenzního nástroje na celém světě (Goodwin, 2007).

2.2 Hospodářská zvířata jako objekty zájmu

Už od pravěku jsou zvířata nedílnou součástí lidského života, a to buď jako domácí mazlíčci, nebo hospodářská zvířata chovaná pro užitek, práci či zábavu. Z domácích mazlíčků je to nejčastěji kočka nebo pes, kteří člověku zpříjemňují život. Za hospodářská zvířata sem patří především skot, koně, prasata a ovce.

Pouze pro představu, v USA žije přibližně 96 milionů koček domácích a 83 milionů psů domácích. (American Pet Products Association) V Evropě (podle průzkumu IFAH-Europe – Federace pro zdraví zvířat z roku 2012) žije 66 milionů koček domácích a 60 milionů psů. Z toho vyplývá, že v každé druhé domácnosti vlastní zvířecího společníka. Proto kočičí a psí srst patří mezi nejčastěji objevený zvířecí biologický materiál na místě trestného činu (Halverson, 2005).

Biologický materiál z těchto zvířat je nejčastěji zkoumán především v souvislostech s kriminálními případy, například při napadení člověka zvířetem.

Kromě toho, že zvířata bývají také oběťmi trestných činů, mohou být sami také pachatelé. Například, pokud zvíře ničí nemovitosti nebo napadá jiná zvířata. V nejednom případě analýza psích chlupů, které byly nalezeny na místě dopravní nehody, osvobodila psa od jeho podílu na zavinění této nehody (Schneider, 1999).

Americká společnost, která se zabývá prevencí týrání zvířat (ASPCA) pomohla objasnit dva případy týrání zvířat v USA na základně DNA analýzy provedené ve Veterinární genetické laboratoři, která sídlí na californské univerzitě v Davisu. První případ se týkal týrání zvířat při vloupání a zhárství čtvrtého stupně, zatímco druhý případ se týkal zabití kočky, kterou pachatel ubil deštníkem. V obou případech zvířata zemřela na následky svých zranění. Analýza je také využívána v případě psích zápasů nebo se běžně používá pro kontrolu dopingu soutěžních koní.

Analýza biologického materiálu může také probíhat za účelem určení druhové příbuznosti nebo pro chovatelské potřeby. Dále z důvodu pytláctví či nelegálního obchodu s chráněnými živočišnými druhy. Případy s forenzní podstatou zahrnují dobytek, drůbež a ryby, a to z důvodu integrace uvedených zvířat do lidského potravního řetězce. Ostatky ukradených zvířat a nelegálně získané maso a ryby mohou být identifikovány pomocí prostředků genetického testování (Vasquez et al., 2004; Rodriguez-Ramirez et al., 2011).

Při forenzních analýzách je velmi často zkoumán rostlinný materiál či různé mikroorganismy (viry, bakterie). Důvodem zkoumání rostlinné DNA je především identifikace jedince, a tím i zjištění místa původu biologického vzorku (Šimková, 2012). Dalším aspektem pro zkoumání je bezpochyby identifikace rostlinných drog a následné dopadení pašeráků či drogových dealerů. Na tyto odvětví ale není tato práce zaměřena.

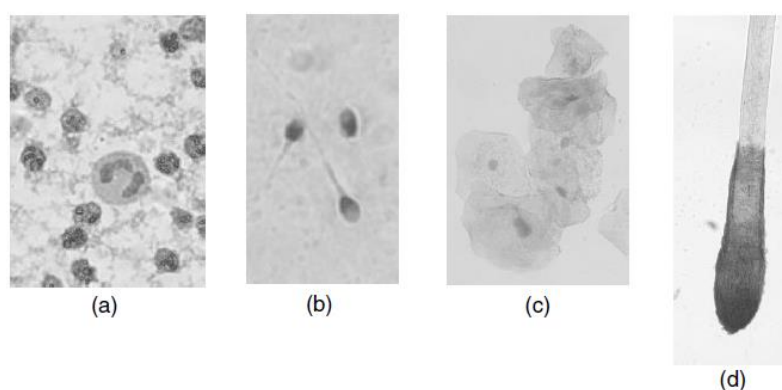
2.2.1 Forenzní materiál

Biologickými stopami sebranými z místa činu, které mohou být představeny u soudu jako důkazní materiál, jsou krev, sliny, sperma, moč, výkaly, vlasy, kůže, chlupy, nehty i další jiné tkáně. Kůže, epitelální buňky, srst a vlasy, které se přirozeně odlupují nebo odpadávají od těla a vytváří tak prostor pro růst nových částí, představují současně hojnou formu biologického materiálu v domácnostech především s domácími mazlíčky. Většina lidí nevědomky přenáší biologické stopy, jako je například srst zvířete, protože jsou z oděvu špatně odstranitelné. Tyto biologické stopy, jako jsou například psí chlupy, jsou velmi perzistentní (D'andrea, 1998) a mohou být přeneseny dopravními prostředky, na oblečení, či různých věcech na místo činu obětí nebo mohou být přeneseny samotným podezřelým.

Tyto stopy jsou důležité nejen proto, že pomáhají zmenšit okruh pátrání na základě již známých faktů, ale také proto, že obsahují dostatečné množství genetického materiálu, který může být po získání amplifikován pro identifikaci zvířete, od něhož biologický materiál pochází.

Biologický materiál, se kterým se setkáváme nejčastěji na místech trestných činů, je krev. Je to především z důvodu násilné povahy mnoha trestných činů, a také proto, že krev je snáze rozpoznatelná/viditelná než jiné biologické tekutiny, jako jsou např. sliny. Dalšími často nalezenými vzorky jsou semenné tekutiny, které mají zásadní

význam v případech sexuálního napadení; sliny, které lze nalézt na předmětech, které byly drženy v ústech, jako jsou nedopalky a nádoby na pití, nebo kousnutí; a epitelové buňky, které jsou zanechávány například jako lupy. Chlupy přirozeně vypadávají, ale mohou být také vytrhnuty při fyzickém kontaktu, a tak mohou být nalezeny na místě činu. Přirozeně vypadávající chlupy mají na sobě připojené jen velmi malé množství folikulu a nejsou dobrým zdrojem DNA. Zato vytrhnuté chlupy mají často připojený kořen, který je bohatým zdrojem buněčného materiálu. S bílými krvinkami, spermii a epitelovými buňkami patří vlasové folikuly mezi čtyři nejběžnější jaderné buňky, které se nachází na místě činu (Goodwin, 2007).



Obr. 1 Časté buněčné typy nalezené na místě činu. (a) bílé krvinky; (b) spermie; (c) epitelální buňky ze slin; (d) kořen chlupu s připojeným folikulem (buňky byly barveny hematoxylinem-eosinem) (Zdroj: Goodwin 2007)

Presumpční testování

Identifikace červené skvrny na stěně nebo světlé skvrny na prostěradle může signalizovat přítomnost krve nebo spermatu. Řada presumpčních testů je dostupná pomocí identifikace tří hlavních tělních tekutin: krve, spermatu a slin. V ideálním případě by měly presumpční testy být bezpečné, levné a snadno proveditelné i z pouze velmi malého množství vzorku. Měli by poskytovat jednoduché informace o přítomnosti nebo nepřítomnosti tělních tekutin. Presumpční testy by neměly mít žádný negativní vliv na DNA profilování. Kromě toho, že pomáhají lokalizovat materiál pro analýzu DNA, může charakterizace skvrny rovněž poskytnout důležité soudní a nepřímé důkazy.

2.2.1.1 Krev

Krev, jakožto tekutá tkáň, se skládá z krevní plazmy a buněčných krevních elementů, jako jsou červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty) (Kočárek, 2010). Většina presumpčních testů pro krev se zaměřuje na detekci přítomnosti molekuly hemoglobinu, která se nachází v červených krvinkách a je používána pro přenos kyslíku a oxidu uhličitého. Pro představu, v 1 ml krve může být až 5 milionů červených krvinek (Goodwin, 2007).

Jednoduchý imuno-chromatografický test pro identifikaci lidské krve je k dispozici od Abacus Diagnostics (West Hills, CA) jako ABACard HemaTrace kit. Tato zkouška má limit detekce hemoglobinu 0,07 ug / ml a vykazuje specifickosti pro humánní krev zároveň s vyššími primáty (Butler, 2012).

Luminol je jeden z presumpčních testů pro identifikaci krve. Toto činidlo se připraví smícháním 3-amino-ftalhydrazid a uhličitanu sodného s destilovanou vodou. Před použitím se přidá k roztoku peroxoboritanu sodný (Saferstein, 2001). Velké plochy vzorků mohou být rychle vyhodnoceny na přítomnost krve postříkáním činidla luminolu na položku, která je předmětem šetření. Objekty, které byly nastříkány, musí být umístěny v zatemněné komoře, abychom mohli luminiscenci snadněji sledovat. Při použití luminolu bylo prokázáno, že neinhibuje DNA testování STR lokusů, kterého je zapotřebí k získávání důkazů z místa činu (Gross, 1999).

Kromě luminolu jsou k dispozici další dva hlavní presumpční testy pro krev a pracují podobným způsobem. Hem skupina může být detekována pomocí barviv Kastle-Meyer (KM) a LEUCO-malachitové zeleně (LMG). Je-li přítomna hem, bezbarvé substráty se oxidují za přítomnosti peroxidu vodíku a stávají se barevnými. V případě barviva KM nastane fialové zbarvení a při použití LMG zelené zbarvení (Lee, 2000). Každý z těchto testů by měl být považován za presumpční test. A to kvůli přirozeně vyskytujícím se sloučeninám, jako jsou rostlinné výtažky, káva a některé čisticí prostředky, které mohou produkovat stejnou změnu barvy nebo reakci světla a tím snižují specifitu reakce (Goodwin, 2007).

2.2.1.2 Sperma

Pozitivní identifikace spermatu může být velmi důležitým poznatkem pro podporu tvrzení o sexuálním napadení. Zde jsou používány jak definitivní, tak presumpční testy. Zaschlé skvrny spermatu, stejně jako sliny a moč, obsahují látky, které při ozáření ruční

UV lampou nebo argonovým laserem mohou fluoreskovat nebo emitovat světlo ve viditelné oblasti (Butler, 2012).

Jednoduchý test zahrnuje testování na přítomnost enzymu kyselý fosfatázy, která je přítomna ve vysokých koncentracích v semenné tekutině (Ballantyne, 2000). Kyselá fosfatáza (AP) je enzym, který je vylučován žlázou do semenné tekutiny a nachází se zde v koncentracích až 400× větších než v jiných tělních tekutinách (Sensabaugh 1979; Saferstein, 2001). Jiné tělní tekutiny, jako jsou sliny a vaginální sekret, obsahují enzym, byť v podstatně nižších koncentracích, ale i tak mohou poskytnout pozitivní výsledek (Steinman, 1995).

Další marker pro identifikaci spermatu je protein P30, který je specifický antigen prostaty (PSA) (Graves, 1985; Simich, 1999). Výhoda použití PSA ve srovnání s reakcí zahrnující kyselou fosfatázu je ta, že PSA je vyroben nezávisle na generování spermií, a proto může být použit jak pro spermicidní, tak i pro azoospermické vzorky. Definitivní test spermatu zahrnuje ošetření barviv, které obarví spermatozou a umožňuje jí, aby se zviditelnil za použití vysoce výkonného mikroskopu. Běžně používaným barvivem je hematoxylin-eosin (viz Obr. 1) (Goodwin, 2007).

Seratec (Goettingen, Německo) a Abacus Diagnostics (West Hills, CA) nabízejí PSA/P30 testovací soupravy, které jsou podobné domácím těhotenským testům, a které mohou být použity pro forenzní identifikaci skvrn spermatu (Hochmeister et al., 1999; Simich, 1999).

2.2.1.3 Sliny

Sliny jsou tekutina, tvořená v ústech, která se podílí na správném polykání a při počáteční fázi trávení. Zdravý člověk vytváří množství 1 až 1,5 litru slin denně. Člověk může přenášet sliny, spolu s epitelálními buňkami z ústní dutiny mnoha různými způsoby. Přenos může být při kontaktu; jako například na potravinářských výrobcích při jídle, nádobách na pití nebo při orálním sexuálním napadení. Presumpční testy slin využívají enzymu alfa-amylázy, která je ve slinách přítomna ve vysokých koncentracích a štěpí škrob a komplexní sacharidy. Trávení škrobu lze měřit uvolňováním barviv, které byly kovalentně vázané na nerozpustné škrobové molekuly (Ballantyne, 2000). Uvolňování barviva způsobí změnu barvy, které mohou být snadno detekovány. Amylázy jsou přítomné i v jiných tělních tekutinách, jako je pot, vaginální tekutina, mléko a sekret

pankreatu. Nicméně je amyláza přítomna ve slinách v 50 x větších koncentracích než v jiných tělních tekutinách.

2.2.2 Skladování biologického materiálu

Biologický materiál sebraný pro analýzu DNA by měl být skladován za podmínek, které zpomalí rychlost degradace DNA. Zejména za nízké teploty a nízké vlhkosti. Chladné a suché prostředí omezuje působení bakterií a plísní, které se snaží najít biologický materiál jako bohatý zdroj potravy a mohou tak rychle degradovat biologický materiál. Přesné podmínky závisí na povaze vzorku a prostředí, ve kterém jsou vzorky uloženy. Bukální stěry a stěry sebrané z místa činu, mohou být uchovávány v chladničce po krátkou dobu. Jsou buď zmrazeny přímo, nebo se suší a pak se uloží při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro dlouhodobé skladování. Krevní vzorky jsou obvykle skladovány při teplotě mezi -20 a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bukální a krevní vzorky odebrané použitím FTA[®] karty, mohou být skladovány po mnoho let při pokojové teplotě (Goodwin, 2007).

Podstatou tohoto způsobu odběru je vazba DNA na celulózový absorbent. FTA papír totiž obsahuje látky, které inaktivují nukleázy a látky, které brání růstu bakterií.



Obr. 2 FTA[®] karta může být použita k uchování krevních a bukalních buněk. Buněčný materiál lyzuje v kontaktu s kartou. DNA se váže na kartu a je stabilní po mnoho let při pokojové teplotě. (Zdroj: GOODWIN, 2007)

Některé položky důkazů, jako je oblečení, musí být uloženy v chladném a suchém prostoru. V klimaticky mírných oblastech světa byla DNA získána z materiálu uloženého několik let při pokojové teplotě (Benecke, 2005). Pokud jsou vzorky zmrazené, například oblečení, jsou uloženy v papíru neobsahující kyseliny, spíše než v plastových sáčcích, aby se minimalizovalo hromadění vlhkosti. Jakmile je DNA extrahována ze vzorku, může být DNA uložena krátkodobě při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro dlouhodobé skladování by ale měla být uchovávána při teplotě -20 až $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Goodwin, 2007).

3 METODY VYUŽÍVANÉ PŘI FORENZNÍCH ANALÝZÁCH

3.1 Základní metody, výčet

Ve forezních vědách a jejich odvětvích jsou nejvíce využívány metody, které umožňují rozlišení mezi jednotlivými druhy zvířat. Tyto metody k diskriminaci často používají markery v rámci chromozomální DNA a mitochondriální DNA (mtDNA). (Bellis, 2003)

Detekování molekulárních genetických markerů, které vymezují genomické sekvenční repetice (MS – mikrosatelity) a jednonukleotidové mutace (SNP – jednonukleotidový polymorfismus), ovlivňuje rychlý vývoj metod a technologií DNA analýz. Detekování uvedených markerů, které probíhá v laboratořích je cenově velmi nákladné. Toto je důvodem pozdějšího rozvoje detekce u hospodářských zvířat v ČR. (Vrtková, 2015).

Podobnost genomů a dědičnost mezi organismy zajišťuje, že metody použité pro analýzu a interpretaci profilů krátkých tandemových repetit nebo mitochondriálních haplotypů jsou z velké části stejné, jako ty, které se provádí v analýzách lidské DNA. Jsou zde samozřejmě důležité rozdíly v některých organismech (Goodwin, 2007).

Genetické klasifikační metody používané v živočišných forezních analýzách, ať už jde o individualizaci nebo stanovení druhů, jsou na základě PCR amplifikace za použití druhově specifických primerů (Kanthaswamy, 2015).

Mitochondriální DNA (mtDNA) je velmi vhodným materiálem pro určování živočišného druhu. Má mnoho výhod oproti jaderné DNA, např.: lze pracovat i s poškozenými vzorky; je možné ji extrahovat z chlupů bez kořínků nebo tepelně upraveného masa (Zehner, 1998). Také má stabilnější strukturu, než jaderná DNA a v buňce je jí větší množství. Určitou nevýhodu však přeci jen má. Druh je z ní možné určit bez problémů, nikoliv však jedince ze stejné maternální linie (matku a její potomky) (Šlapalová, 2010). Výjimkou je však umělé oplodnění, kdy se do oocyty vloží celá spermie (Houshmand, 1998).

Alternativní detekční systém DNA je založen na amplifikaci polymerázové řetězové reakce segmentu mitochondriálního genu cytochromu b. Cytochrom b (*CytB*) je a složka komplexu dýchacího řetězce III. Délka genu *CytB* je 1140 bp a má některé stabilní sekvence, které mohou být použity pro návrh univerzálních primerů. Následné štěpení restrikcími enzymy zapříčiňuje vznik druhově specifického obrazu/vzoru na agarózovém gelu. Každý zvířecí druh má jedinečnou kombinaci restrikcíních fragmentů, proto je velmi důležité, vybrat správnou endonukleázu pro každou skupinu vybraných druhů zvířat. Polymorfismus délky restrikcíního fragmentu (RFLP) může být analyzován například pomocí restrikcíni endonukleázy *AluI*. Tato metoda RFLP-PCR je rychlá a jednoduchá metoda pro identifikaci druhů (Minarovič, 2010).

3.2 Izolace DNA

Citlivost a důkazní síla DNA profilování má vliv na způsob, jakým jsou trestné činy zkoumány. Protože pro DNA profilování je potřebných pouze několik buněk, mají nyní vyšetřovatelé mnohem širší spektrum biologických důkazů ke shromažďování, ale také mají mnohem větší šanci na kontaminaci místa činu s jejich vlastní DNA (Goodwin, 2007).

Vysoká úroveň citlivosti, která dělá DNA profilování neocenitelným forezním nástrojem, může být také potenciální nevýhodou. Kontaminace důkazního materiálu s biologickým materiálem z jiného zdroje, jako je například policista nebo vyšetřovatel, je velmi reálná. Je velmi důležité, že je tomu věnována příslušná péče, jako je udržování celistvosti scény a nošení plně ochranných obleků a obličejové masky během vyšetřování scény (Rutty, 2003). Nesprávná manipulace s důkazy může mít vážné následky. V nejhorších případech může dojít ke křížové kontaminaci, to vede k degradaci vzorku a zabraňuje nebo vede k nejasnostem výkladu důkazů (Goodwin, 2007).

Cílem izolace DNA ze vzorku je odstranit ze směsi poměrně velké množství nejrůznějších látek, které mohou zabránit následným analýzám, a získat tak vodný roztok pouze DNA. Takové látky jako jsou například bílkoviny, polysacharidy, lipidy, enzymy atd. a nazýváme je inhibitory. Tyto látky různého původu ovlivňují jeden ze zásadních kroků analýzy – PCR.

To, že jsou ve vzorku přítomny, může mít za následek jak zhoršení kvality vzorku a výsledků analýzy, tak i její úplné selhání.

3.2.1 PCR Inhibitory a DNA degradace

Při extrakci biologického materiálu pro účely forenzní DNA typizace je důležité, aby se zabránilo degradaci DNA templátu, tak jako i odstranění co nejvíce inhibitorů PCR. Přítomnost inhibitorů nebo degradované DNA může vést k úplnému selhání PCR amplifikace nebo snížení citlivosti detekce obvykle většího PCR produktu. Dva PCR inhibitory, běžně se vyskytující ve forenzních případech jsou hemoglobin a indigo barviva z džínoviny. Melanin zjištěný ze vzorků vlasů může být zdrojem inhibice PCR při pokusu o amplifikaci mitochondriální DNA. Tyto inhibitory mohou vázat v aktivním místě Taq DNA polymerázy a zabránit tak jejich správné funkci během amplifikace při PCR. DNA degraduje prostřednictvím různých mechanismů, jak enzymatických, tak chemických procesů. Jakmile organismus zemře, jeho molekuly DNA musí čelit buněčným nukleázám následovanými bakteriálními, plísňovými a hmyzími útoky, a to v závislosti na okolních podmínkách (Butler, 2012).

3.2.2 Izolace nukleových kyselin a kvantifikace

Izolace DNA má dva hlavní cíle: za prvé, být velmi účinná, extrahovat dostatečné množství DNA ze vzorku a za druhé, izolovat DNA, která je dostatečně čistá pro následnou analýzu. Úroveň obtížnosti zde do značné míry závisí na povaze vzorku. Jakmile je DNA extrahována, je důležitá přesná kvantifikace DNA pro následnou analýzu.

Tři fáze izolace DNA mohou být klasifikovány jako (1) narušení buněčné membrány, což vede k lyzi buněk, (2) k denaturaci proteinu, a konečně (3) k separaci DNA z denaturovaného proteinu a dalších buněčných složek. Některé z extrakčních metod běžně používané ve forenzních laboratořích jsou popsány níže.

Kvantifikaci rozumíme „stanovení množství DNA ve vzorku“ (Šimková, 2012). Množství DNA ve vzorku může být vyjádřeno mnoha způsoby, nejčastější způsob je tzv. hmotnostní koncentrace (kg/m^3). Ve forenzní analýze se zpracovávají velmi malé objemy vzorků. Pro tyto vzorky jsou používány odvozené jednotky ($\text{ng}/\mu\text{l}$) a ($\text{pg}/\mu\text{l}$). Pro představu, lidská tělní buňka obsahuje zhruba 6,6 pg DNA. K dispozici je pro extrakci DNA mnoho metod. Volba, který způsob bude použit, závisí na celé řadě faktorů, včetně typu vzorku a jeho množství; rychlosti a v některých případech schopnosti automatizovat

extrakční postup (Montpetit, 2005). Dalším důležitým faktorem je zkušenost laboratorního personálu.

Metoda izolace pomocí kitu Chelex® 100

Alternativní a levný postup pro extrakci DNA, který se stal populární mezi forenzními vědci, je použití suspenze chelatační pryskyřice, která může být přidána přímo ke vzorku (např. krve nebo spermatu) (Butler, 2012). Způsob izolace pomocí Chelex® 100 byl jednou z prvních extrakčních metod, přijatými forenzní komunitou. Způsob Chelex® DNA Extrakce je například rychlejší než metoda organické extrakce (Goodwin, 2007). Kromě toho, extrakce Chelex® zahrnuje méně kroků a tím i méně možností znečištění vzorku (Butler, 2012).

Chelex® 100 je pryskyřice, která se skládá ze styren-divinylbenzenu kopolymerů, obsahující spárované iminodiacetátové ionty (Walsh, 1991). Pryskyřice má velmi vysokou afinitu pro vícemocné ionty kovů, jako je například hořčík (Mg^{2+}); vychytává vícemocné ionty kovu a účinně je odstraňuje z roztoku. Dle extrakčního postupu jsou rozrušeny buňky a je denaturován protein. Zkumavka je pak jednoduše centrifugována až do vytvoření peletu na Chelex® 100 pryskyřici a denaturovaný protein na dně zkumavky opouští vodnou fázi roztoku, obsahující DNA, která má být použita v PCR. Suspenze je alkalická, mezi pH 9,0 a 11,0, a jako výsledek je DNA, která se izoluje pomocí tohoto postupu jednovláknová. Hlavní výhody tohoto způsobu jsou: rychlost, jednoduchost a nemožnost pohybu tekutiny mezi zkumavkami, čímž se snižuje možnost náhodné kontaminace vzorků; cena je velmi nízká; a vyhýbá se použití škodlivých chemikálií. Důležité je, že je přístupná pro širokou škálu forenzních vzorků (Walsh, 1991). Extrakt DNA izolované za použití této metody je relativně surový, ale dostatečně čistý ve většině případů pro generování profilu DNA.

Izolace DNA pomocí kitu fenol-chloroform

Způsob izolace za pomoci fenol-chloroformu byl široce používán v molekulární biologii, ale má být pomalu vyřazen, a to především z důvodu toxického charakteru fenolu. Je stále ještě používán v některých forenzních laboratořích, zejména je stále široce používán pro extrakci DNA ze vzorků kostí a z půdy. Buněčná lyze se provádí stejně jako v předchozím způsobu. Fenol-chloroform se přidá k buněčnému lyzátu, smíchá se a fenol denaturuje protein. Extrakt se poté odstředí a vysrážený/přečištěný protein tvoří sraženinu

na rozhraní mezi organickou fenol-chloroform fází a vodnou fází. Tento proces se opakuje dvakrát až třikrát. DNA se potom čistí, z vodné fáze se vysráží ethanolem nebo filtrovou centrifugací. Tato metoda produkuje čistou DNA, ale má určité nevýhody: kromě toxického charakteru fenolu, vyžaduje opakovanou (mnohonásobnou) výměnu zkumavek a tím je tento proces velmi pracný (Goodwin, 2007).

Kvantifikace izolované DNA

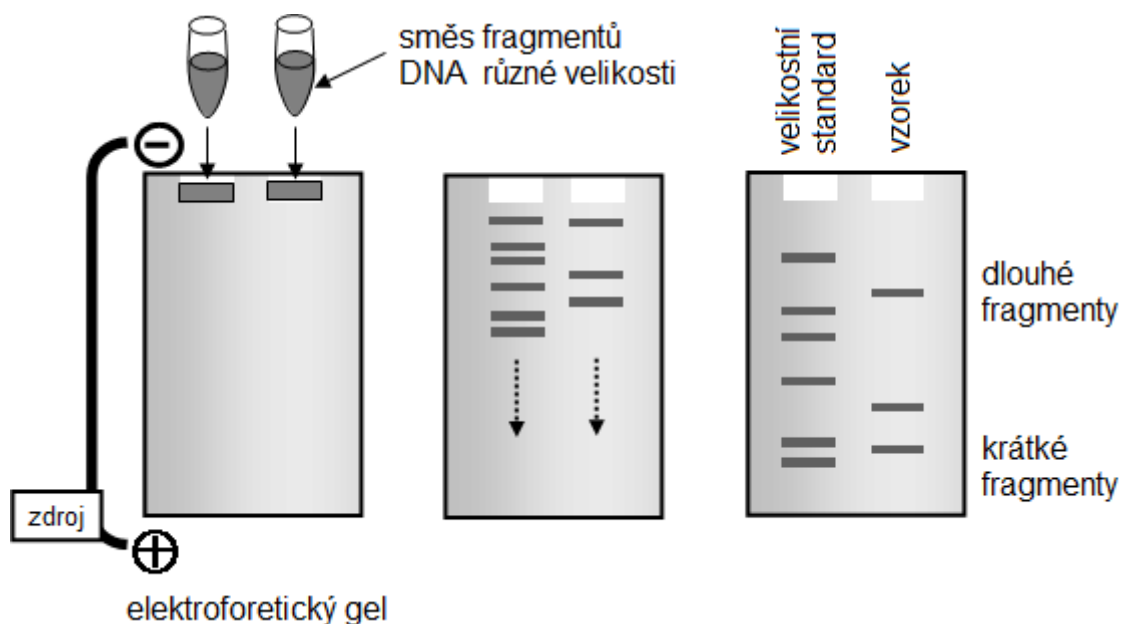
Kvantifikace DNA je dalším důležitým krokem analýzy vzorku. Pomáhá totiž stanovit optimální izolační postup. Například při použití izolačního postupu A a B můžeme mezi sebou tyto dva postupy porovnat, který z nich nám poskytuje více koncentrovanou DNA.

Koncentrace DNA ve vzorku je zásadní pro následnou PCR reakci. Příliš málo nebo příliš mnoho DNA může zapříčinit inhibici reakce (Šimková, 2012). Množství DNA, která může být extrahována ze vzorku, je velmi závislá na druhu materiálu (Goodwin, 2007).

3.2.3 Elektroforéza

Elektroforéza je jednou z velmi používaných separačních technik, která se využívá při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. „Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli.“ (Šmarda, 2005; s. 13).

Negativně nabitě fosfátové skupiny nukleových kyselin jsou hlavním nositelem náboje. V elektrickém poli se tak pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě. Nejrozšířenějším druhem elektroforézy je gelová elektroforéza. Může být rozlišena podle typu gelu na agarózovou a polyakrylamidovou (Šmarda, 2005).



Obr. 3 Princip elektroforézy DNA (Zdroj: Bártová, 2011)

Vizualizace na agarózovém gelu je relativně rychlý a snadný způsob pro stanovení kvantity a kvality extrahované DNA. Agarózový gel tvoří porézní matici a menší molekuly DNA se mohou pohybovat v gelu rychleji než větší molekuly DNA. Barvivo, které interaguje s dvoušroubovicí DNA je ethidiumbromid a může být přidán do gelu před nebo po elektroforéze. DNA se zviditelní umístěním gelu na transiluminátor, který vydává UV světlo při 260 nm. Kvantifikační standardy mohou být umístěny podél neznámých vzorků, aby bylo možné odhadnout koncentrace DNA. Kromě zobrazování přítomnosti DNA, lze také odhadnout velikost extrahovaných molekul DNA. Molekula DNA s vysokou molekulární hmotností může být pozorována jako jediný proužek, zatímco degradovaná DNA se objevuje jako skvrna. Kromě toho, že elektroforéza znázorňuje přítomnost DNA, může z ní být odhadnuta i velikost extrahované DNA molekuly. Výhoda elektroforézy v agarózovém gelu je ta, že je rychlá a poskytuje informaci o velikosti molekuly DNA. Nevýhodou je, že kvantifikace je subjektivní, založená na relativních intenzitách proužků; dále je detekována celková DNA, která může být směsí člověka a mikrobiální DNA, a to může vést ke špatnému odhadu koncentrace DNA; nemůže být použita pro kvantifikaci vzorků, extrahovaných pomocí metody Chelex[®], protože ta vytváří jednořetězcovou DNA a fluorescenční barviva, která interagují s dvouřetězcovou DNA se zde nemohou navázat (Goodwin, 2007).

Elektroforéza se používá po izolaci nukleových kyselin a to z důvodu, zda jsou dobře vyizolovány. Používá se i po PCR reakci jako kontrola PCR produktu a dále se používá pro dělení fragmentů po štípání restriktázami.

3.2.4 PCR

Jak již bylo zmíněno v kapitole o historii forenzní genetiky, zavedení polymerázové řetězové reakce se stalo velkým přínosem jak pro molekulární biologii, tak pro forenzní genetiku. Ve forenzních analýzách je tato metoda velmi přínosná, protože ne vždy je na místě činu dostatečné množství biologického materiálu a díky této metodě postačí pro analýzu minimum vzorku. PCR také umožňuje získání specifické genomové sekvence, což je využíváno při charakterizaci délkových polymorfizmů (Šmarda, 2005). Pro amplifikaci mikrosatelitů, obecně tandemových repetice, jsou potřebné druhově (někdy i rodově) specifické primery. Známé primery mohou být použity například i pro příbuzný organismus, ale není zde zaručena úspěšnost, a to z důvodů mutací v průběhu evoluce. Pro většinu druhů jsou už primery publikovány. Nabízí se ale také možnost jejich izolování skrze transformaci v plazmidech, ale to je velmi pracné a nákladné.

V současnosti existuje více způsobů, jak izolovat u jednotlivých druhů mikrosatelity. Výše uvedený způsob je tradiční. Je možné také použití sond, nesoucích magnetické mikročástice. Hybridizované úseky jsou potom zakoncentrovány pomocí magnetu. Tento systém dodává například firma Promega (Hanáček, 2017).

3.2.5 Sekvenování

V současné době je nejpoužívanější metodou sekvenování Sangerova metoda. Tato metoda využívá prodlužování primeru DNA-polymerázou. Tato metoda však nemá praktické využití pro analýzu SNP ve forenzním kontextu. Protože SNP jsou rozptýleny po celém genomu, vyžaduje většina SNP samostatnou reakci. Výjimkou je mitochondriální genom, ve kterém je počet SNP koncentrován na menší ploše (Goodwin, 2007). Pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů v sekvencích je využívána metoda minisekvenování. Zde dochází k prodloužení primeru pouze tehdy, pokud je značený nukleotid reakce komplementární k bázi v cílovém místě. Tato metoda umožňuje spolehlivé rozlišení mezi jednotlivými alelami genů. Produkty prodloužených primerů mají odlišnou pohyblivost na gelu při jejich elektroforetické analýze (Šmarda, 2005).

4 GENETICKÉ MARKERY VYUŽÍVANÉ VE FORENZNÍCH ANALÝZÁCH

DNA markery jsou stále velmi důležité v chovu zvířat a jsou úspěšně používány při identifikaci skotu, testování rodičovství a při stanovování vztahů mezi dvěma nebo více jednotlivci (Glowatzki-Mullis, 1995). Tyto markery jsou také používány pro sledování/monitoring masa v celém potravinovém řetězci, a to díky spolehlivé a přesné vysledovatelnosti/zpětné zjistitelnosti, kterou poskytují (Dalvit, 2007). Používání těchto markerů má vést k rychlejšímu genetickému pokroku (Van Eenennaam, 2007 Et al., 2007). Mikrosatelity, nebo-li krátké tandemové repetice (STR) byly hlavními genetickými markery po více než dvě desetiletí. Navzdory tomu, že jsou vysoce polymorfní a rozptýlené v celém genomu, výsledky získané pomocí lokusů STR z různých laboratoří nejsou vždy srovnatelné. Je to díky nesrovnalostem v počtu opakování alel a chybám při určování velikosti (Fernández, 2013).

Repetitivní sekvence jsou sekvence DNA s vysokým množstvím kopií. Dělí se na tandemové a rozptýlené repetice. Mezi tandemové repetice patří dinukleotidy, trinukleotidy a tetranukleotidy, které jsou pojmenovány podle počtu jednotlivých nukleotidů obsažených v jedné repetici. Mikrosatelity, jak nazýváme tandemové repetice do 6 párů bází, jsou dány různým počtem opakování. Vyskytují se po celém genomu, zvláště v nekódujících oblastech (kde nemohou ovlivnit žádný děj). Jsou vysoce specifické, tzv. *single locus*, což znamená, že analyzujeme jeden konkrétní mikrosatelit, který se nachází na určitém místě v genomu, na určitém chromozomu. Proto je nutné znát přesné primery, kterými budeme tento lokus amplifikovat. Mají větší mutační rychlost, než je v kterýchkoliv nekódujících oblastech 10^{-3} - 10^{-5} . Mutační rychlost u běžné nukleotidové záměny je cca 10^{-9} - 10^{-10} . Při replikaci mikrosatelitu může vzhledem k opakujícímu se motivu dojít ke „sklouznutí“ řetězce – dojde tak k prodloužení nebo zkrácení o jednu repetici (Hanáček, 2017).

4.1 STR markery a jejich využití

Krátké tandemové repetice neboli mikrosatelity, jsou opakující se sekvence o charakteristické délce 2-9 nukleotidů, které se vyskytují v konkrétním místě DNA a to v řádech jednotek až desítek opakování po sobě. Tyto mikrosatelity můžeme najít ve všech lidských chromozomech, kromě mitochondriální DNA a zaujímají zhruba 3 % lidského genomu.

Pro forenzní analýzy bývají nejčastěji voleny tetra- nebo pentanukleotidové STR lokusy a to z důvodu, že při použití kratších repetic může dojít k *stutteringu* (prokluz polymerázy). Použití delších lokusů je také nevhodné. Důležitým faktorem pro použití lokusu je, kromě jeho délky, také jeho variabilita a vzájemná genetická vazba. Z tohoto důvodu je vhodné vybírat lokusy z různých chromozomů (Šimková, 2012).

Existuje několik komerčních STR reagenčních kitů, které jsou v současné době k dispozici, a tyto reagenční soupravy obsahují buď všechny, nebo některé z ISAG doporučených STR primerů. Applied Biosystems vyrábí Stockmarks[®] kit pro genotypizaci skotu, který má 11 STR markerů, a Thermo Scientific (dceřiná společnost Thermo Fisher Scientific) má tři dobytkově specifické multiplexní STR reagenční kity. Tyto sady mohou být použity pro identifikaci, forenzní identifikaci masa a rutinní testování rodičovství u skotu. Applied Biosystems má také Stockmarks[®] kit pro genotypizaci psů, který má 10 STR markerů pro účely testování rodičovství a identifikace u psů (Goodwin, 2007).

Nejznámější kriminální případ s využitím STR nese název „Snowball“.

Případ Snowball

Charakterizováním STR lokusů u domácích druhů, včetně koček a psů, lze identifikovat jednotlivá zvířata s vysokou statistickou průkazností. Nejznámější je případ vraždy, kdy se kompozitní STR genotyp chlupů, spojených s místem činu, shodoval s genotypem mazlíčka podezřelého (Menotti-Raymond, 1997).

Případ se týkal 32leté ženy, která zmizela z domu v Richmondu, na kanadském ostrově prince Edwarda. Stalo se to dne 3. října 1994. Její opuštěné auto bylo objeveno během několika dní od zmizení a krev, která byla nalezená uvnitř auta byla identifikována jako krev této zmizelé ženy. O tři týdny později se objevila v lese, 8 km od jejího domova, pánská kožená bunda poznačena krví oběti. V podšívce se objevilo několik bílých chlupů pocházejících z kočky domácí. Tělo oběti bylo odhaleno v mělkém hrobě,

dne 6. května 1995. Zatčený a obžalovaný byl manžel oběti. Podezřelý žil se svými rodiči a kočkou; bílou americká krátkosrstou jménem Snowball. Laboratoř genomické diversity v Marylandu byla požádána, aby zjistila, zda genomová DNA z kočičích chloupků nalezených v této bundě odpovídá DNA profilu kočky Snowball.

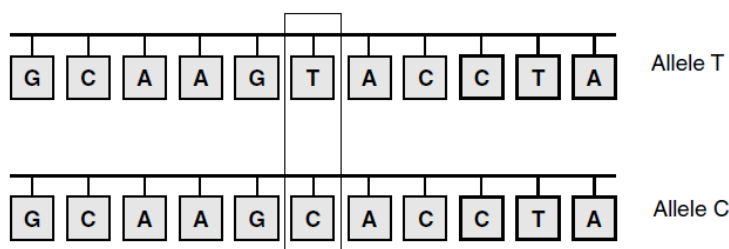
Laboratoř izolovala a charakterizovala téměř 400 dinukleotidových STR lokusů z DNA kočky domácí. Extrahovali a amplifikovali DNA z kořene jednoho z 27 chlupů z nalezené bundy a klasifikovali DNA na základně deseti kočičích dinukleotidových opakujících se STR lokusů, které byly vybrány pro optimální provedení forenzní analýzy. Provedli elektroforézu fluorescenčně značených produktů PCR v 6% denaturačních polyakrylamidových gelech za použití automatizovaného DNA sekvenátoru PE Applied Biosystems ABI 373A. Stejně tak amplifikovali DNA extrahovanou z krevního vzorku získaného z kočky Snowball (předvolána 3. ledna 1995). Kompozitní STR genotypy chlupů a krve Snowball na stejném gelu se shodovali na všech 10 lokusech. (sedm heterozygotních a tři homozygotní STR lokusy).

Pro odhad pravděpodobnosti shody genotypu chlupu a náhodného individua byl vytvořen průzkum dvou populací; bylo vybráno 19 nespřízněných koček z ostrova Prince Edwarda a devět koček z celého USA. Přestože byl malý, byl vzorek z ostrova dostatečný (spolehlivost 95%) k detekci jakékoli alely STR s frekvencí 9,5 % nebo vyšší. Obě populace vykazovaly znatelnou alelickou variabilitu a pozoruhodnou populační genetickou podobnost (navzdory geografické populační substruktuře). Například 62 % ze zjišťovaných STR alel bylo přítomných v obou populacích a stejné alely byly nejběžnější pro 9 z 10 vybraných lokusů v obou populacích. 10 STR lokusů bylo vybráno tak, aby se nacházely na různých vazebných skupinách, aby se zajistilo, že mezi různými lokusy neexistuje žádná souvislost mezi alelami. Frekvence složeného genotypu chlupů pro sedm heterozygotních lokusů, odhadovaného pomocí produktového pravidla a minimálních frekvence pro vzácné alely, činila $2,2 \times 10^{-8}$ pro ostrov a $6,9 \times 10^{-7}$ pro populační databázi USA. Závěr analýzy byl předložen a přijat u nejvyššího soudu souostroví Prince Edwarda.

Porota odsoudila obžalovaného za vraždu druhého stupně dne 19. července 1996. Případ představuje právní precedens pro zavedení automatizované genotypizace chlupů domácích zvířat do forenzních případů, které lze spojit s podezřelým v zásadních případech.

4.2 SNP – jednonukleotidové polymorfizmy

Jednonukleotidové polymorfizmy jsou nejjednodušší a nejrozšířenější ze všech dosud známých polymorfizmů (Kuciel, 2016). Jsou to pozice jednotlivých párů bází v genomové DNA, u kterých existují různé alternativy sekvencí u „běžných“ jedinců v té samé populaci, ve které má nejméně frekventovaná alela abundanci 1 % a více. Jejich struktura je velmi jednoduchá a je znázorněna na Obr. 4.



Obr. 4 SNP (Zdroj: Goodwin, 2007)

SNP se nacházejí v lidském genomu přibližně za každých 1000 bp, což způsobuje až 85 % lidské genetické variace. Jejich obrovské množství v lidském genomu může kompenzovat omezené množství informací, které nese každý jednotlivý SNP. Za předpokladu, že je lidský genom dlouhý 3,2 miliardy bp, mohou tyto polymorfizmy způsobit až 1 milion rozdílností mezi dvěma genomy (Goodwin, 2007).

Každý SNP lokus má své referenční číslo v databázi dbSNP, která je vedena NCBI (National Center for Biotechnology Information). Každý SNP lokus může mít nanejvýš 4 varianty (alely): A, C, T, G. Většina z nich se však v populaci vyskytuje pouze ve dvou variantách, což znamená, že jsou tzv. bialelické (Šimková, 2012). Jednonukleotidové polymorfizmy můžeme rozdělit do dvou tříd podle toho, kde se v sekvenci genu nacházejí. První, kódující SNP, které se nacházejí v kódující sekvenci genu, mohou ovlivnit fenotyp tak, že budou obsaženy v kodonu a způsobí změnu aminokyseliny. Druhé, více frekventované nekódující SNP, mohou také ovlivnit fenotyp, ale pouze tehdy, pokud se budou nacházet v intronech, promotorech a dalších regulačních oblastech (Kuciel, 2016).

Pro detekci mnoha jednnukleotidových polymorfizmů je možné využít širokou škálu metod. Mezi nejvíce využívané metody patří například prodlužování primeru nebo hybridizace primeru. Metoda prodlužování primeru byla vyvinuta pro rozlišování mezi různými alelami. Její základ je velmi podobný Sangerovu sekvenování. První částí postupu je amplifikace cílové oblasti pomocí PCR. Vnitřní primer pak nasedá na denaturovaný PCR produkt. Primer je poté prodlužován jen o jeden nukleotid za pomoci *Taq* polymerázy, zde je však dodáván pouze ddNTP, který je značen fluorescenčním barvivem. Prodloužený primer může být analyzován za pomoci kapilární gelové alaktroforézy. Při použití různě dlouhých primerů a rozdílných fluorescenčních značek pro každou ze čtyř bází může být detekován velký počet SNP.

Při hybridizaci je k dispozici mnoho metod, které využívají hybridizační sondy, jako jsou například molekulární majáky, genové čipy nebo Taqman assays (Goodwin, 2007).

4.3 SNP v porovnání s STR lokusy

Mikrosatelity (STR) jsou v současnosti zdaleka nejvyužívanějšími lokusy k identifikaci. Jejich velkou výhodou je jejich rozlišovací schopnost vzhledem k velkému počtu alel, které mají v porovnání s bialelickými SNP. Z důvodu bialelního charakteru jednonukleotidových polymorfizmů je problematické, či nemožné interpretovat vzorek směsi dvou nebo více jedinců. Další odlišností je zhruba čtyřikrát větší množství SNP, potřebné k dosažení ekvivalentní rozlišovací schopnosti mikrosatelitů.

Zároveň je však možné analyzovat stovky SNP lokusů a vzhledem k jejich struktuře, bude velikost amplikonu mnohem menší, většinou méně než 100 bp. To umožňuje detekci templátů DNA, které jsou vysoce degradovány a mohou tak generovat data, když se nepodařilo při standardní STR analýze vytvořit výsledek. Srovnání mezi STR a SNP markery je znázorněno v Obr. č. 5.

Dalším rozdílem je velikost amplikonu, která je u STR mnohem markantnější než u SNP, kde délka amplikonu dosahuje maximálně 100bp. Navzdory tomu je však možné u SNP predikovat určitý fenotypový znak, jako je například barva očí, vlasů nebo kůže. Detekce SNP lokusů je možná za pomoci hmotnostní spektrometrie nebo mikročipů nebo kapilární gelové elektroforézy, které je zároveň využíváno k detekci STR lokusů.

V dohledné budoucnosti bude STR nejběžněji používaným genetickým polymorfismem. Jsou vyzkoušené a ověřené ve většině soudních systémů a rovněž tvoří

základ většiny forenzních DNA databází. Stejně tak použití SNP ve forenzní genetice je pravděpodobně na vzestupu v nadcházejících letech a mohlo by dokonce v určitém okamžiku nahradit analýzu STR polymorfismů.

Aplikace SNP do specializovaných odvětví se pravděpodobně rozšíří. Patří sem například krevní seskupování na základě SNP (Inagaki, 2004) a molekulární pitva (hledá mutace, které mohou vysvětlit náhlé smrti (Goodwin, 2007).

	STR	SNP
Frequency of occurrence	Once every 15 Kb	Once every 1 Kb
Typical rate of mutation	10^{-3}	10^{-8}
Typical number of alleles	Between 5 and 20	2
Potential to multiplex	Currently a maximum of 15 STR loci examined at one time	Difficult to amplify more than 50 SNPs in one reaction
Number of loci required to have a P_M of 1 in 1 billion	10	~60
Method of detection	Capillary gel electrophoresis (CGE)	CGE, microarrays, mass spectroscopy
Automation potential	Medium	High
Artefacts	Amplification of STRs can produce artefacts such as stutter and split peaks.	No stutter artefacts associated with the amplification of the SNPs
Amount of DNA required	~0.5 to 1 ng	~100 pg
Size of amplicon	Amplicon sizes typically between 100 and 400 bp	Amplicon sizes can be less than 100 bp
Mixtures	Interpretation of mixtures of STR loci is possible	Mixtures of SNP loci can be highly problematic to interpret
Predicting geographical origin	Limited ethnic identification from STR loci	Some SNPs can be associated with particular ethnic groups
Phenotypic information	No possibility of inferring phenotype	Possible to predict some hair colours, eye colour, skin colour.

Obr. č. 5 Porovnání mezi STR a SNP (Zdroj: Goodwin, 2007)

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce měla za cíl, vyhledat, sumarizovat a popsat metody molekulární genetiky, které jsou využívány při forenzních analýzách. Celá práce je zaměřena na domestikovaná zvířata a analýzu biologických vzorků, pocházejících z těchto živočichů. Úvod práce pojednává o vývoji forenzní genetiky a objevech, které tuto analýzu dále zlepšovaly a prohlubovaly. Je zde zmíněna aplikace a vztah forenzní genetiky s různými odvětvími, které s touto problematikou úzce souvisí. Hlavním odvětvím forenzní genetiky je kriminalistika, kde se využívají molekulární metody, které slouží především k identifikaci jedince. Další část práce je věnována domestikovaným zvířatům, která jsou často ve forenzních případech analyzována. Hlavními zástupci jsou domácí mazlíčci, zejména psi a kočky, a hospodářská zvířata, především skot. Zpracování biologického materiálu z těchto zvířat má svá určitá pravidla a postupy. K odběru a uchování např. vzorku krve jsou velmi často využívány FTA[®] karty, na kterých je DNA stabilní po mnoho let.

Pro kvalitní analýzu je nejdůležitější správná izolace DNA, ke které je používáno mnoho různých komerčních kitů. Rychlou a nenáročnou izolaci je možné provést za pomoci kitu Chelex[®]. Izolovaný vzorek DNA je poté nutné kvantifikovat a vizualizovat na agarózovém gelu. Pro detekci genetických markerů je nutné znát při PCR amplifikaci druhově (někdy i rodově) specifické primery. Genetických markerů je využíváno především při identifikaci jedince nebo při určování rodičovství u hospodářských zvířat, a to díky jejich druhové specifitě. V této práci jsou zmíněny dva hlavní genetické markery forenzní analýzy – SNP a STR. Oba markery jsou běžně využívány. Zásadním poznatkem je fakt, že forenzně genetická analýza domestikovaných zvířat se prakticky neliší od analýzy člověka, jakožto jednoho z živočichů.

Práce je zpracovaná jako rešerše a podklady k jejímu zpracování byly použity převážně ze zahraničních vědeckých článků a publikací. Tato bakalářská práce poskytuje přehled molekulárně genetických metod, jejich výhod a seznamuje také s jejich možnými riziky. Jedná se o zpřehlednění informací pro snazší porozumění uvedené genetické problematice. Vzhledem ke skutečnosti, že genetické výzkumy se dostávají stále více do popředí zájmu nejen vědecké ale i laické společnosti, je možné práci postupně rozšířit a navýšit její úroveň.

6 SEZNAM ZKRATEK

SNP – single nucleotide polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus

AB0 systém – krevní systém

VNTR – variable number tandem repeat – variabilní počet tandemových opakování

STR – short tandem repeat – krátká tandemová repetice

ASPCA – American Society for the Prevention of Cruelty to Animals – Americká společnost pro prevenci týrání zvířat

LMG – LEUCO-malachitová zeleň

KM – Kastle-Meyer barviva

AP – acid phosphatase – kyselá fosfatáza

P30 – semen-specific protein – specifický protein spermatu

FTA – FTA kartička

MS – mikrosatelity

PSA – prostate-specific antigen – specifický antigen prostaty

PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce

mtDNA – mitochondriální DNA

CytB – cytochrom b

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

American Pet Products Association. APPA releases 2013-14, *National Pet Owners Survey* [online]. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.petfoodindustry.com/articles/3515-appa-releases-2013-14-national-pet-ownerssurvey>

Ballantyne, J. Serology, 2000: *In Encyclopedia of forensic sciences. Second edition.* Academic Press. ISBN 978-0-12-382165-2.

Bártová E., 2011: Gelová elektroforéza. In: *Molekulární biologie*, [online], VFU Brno, [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2011/index.php?lang=cz>

Bellis C., Ashton K.J., Freney L., Blair B. a Griffiths L.R., 2003: A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International*. 134(2-3), 99-108. DOI: 10.1016/S0379-0738(03)00128-2. ISSN 03790738.

Benecke M., 2005: Collection and handling of forensic DNA samples. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics (EDGP)*. Dekker, New York, 500-504.

Butler J. M., 2012: *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press, ISBN 978-0-12-374513-2.

Dalvit, C., De Marchi M. a Cassandro M., 2007: Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*. 77(4), 437-449. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.05.027. ISSN 03091740.

D'andrea F., Fridez, F., and Coquoz, R., 1998: Preliminary Experiments on the Transfer of Animal Hair During Simulated Criminal Behavior. *Journal of Forensic Sciences*, 43. ISSN 0022-1198.

Fernández M. E., Goszczynski D. E., Lirón J. P., Villegas-Castagnasso E. E., Carino M. H., Ripoli M. V., Rogberg-Muñoz A., Posik D. M., Peral-García P., Giovambattista G., 2013: Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. *Genetics and Molecular Biology*. 36(2), 185-191, DOI: 10.1590/S1415-47572013000200008. ISSN 1415-4757.

Glowatzki-Mullis, M-L, Gaillard C., Wigger G. a Fries R., 1995: Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics*, 26(1), 7-12. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb02612.x. ISSN 02689146.

- Goodwin W., Linacre A. a S. Hadi, 2007: *An introduction to forensic genetics*. Chichester, England: John Wiley,. ISBN 9780470010273.
- Graves H. C.B., Sensabaugh G. F. a Blake E. T., 1985: Postcoital Detection of a Male-Specific Semen Protein. *New England Journal of Medicine*, 312(6), 338-343. DOI: 10.1056/NEJM198502073120603. ISSN 0028-4793.
- Gross A. M., Harris K. A. a Kaldun G. L., 1999: The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences*, 44, 837–840.
- Halverson J.L. a Basten C., 2005: Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Croatian Medical Journal*, 46, 598–605.
- Hanáček, P. - ústní sdělení (veděcko-výzkumný pracovník, Ústav biologie rostlin, ÚBFR AF, Zemědělská 1, 61300 Brno - Budova C) dne 6. dubna 2017.
- Hochmeister M. N., Budowle B., Rudin O., Gehrig Ch., Borer U., Thali M. a Dirnhofer R., 1999: Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membrane Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid. *Journal of Forensic Sciences*, 44 (5), DOI: 10.1520/JFS12042J. ISSN 00221198.
- Houshmand M., Holme E., Hanson Ch., Wennerholm U. B. a Hamberger L., 1997: Is paternal mitochondrial DNA transferred to the offspring following intracytoplasmic sperm injection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*., 14(4), 223-227. DOI: 10.1007/BF02766114. ISSN 1058-0468.
- Inagaki S., Yamamoto Y., Doi Y., Takata T., Ishikawa T., Imabayashi K., Yoshitome K., Miyaishi S. a Ishizu H., 2004: A new 39-plex analysis method for SNPs including 15 blood group loci. *Forensic Science International*., 144(1), 45-57. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.03.005. ISSN 03790738.
- Jeffreys, A. J., Wilson V. a Thein S. L., 1985: Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*., Vyd. 316, 76–79. DOI 10.1038/316076a0.
- Kanthaswamy S., 2015: Review: domestic animal forensic genetics - biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. *Animal Genetics*., 46(5), 473-484. DOI: 10.1111/age.12335. ISSN 02689146.
- Klementa J., Machová J., Malá H., 1981: *Somatologie a antropologie*. Vydání 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN 14-406-81.

- Kočárek E., 2010: *Biologie člověka*. Praha: Scientia, Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-47-0.
- Kuciel J. a Urban T., 2016: *Principy genetiky*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-385-1.
- Lee H. a Pagliaro E., 2000: Blood identification. *In Encyclopedia of forensic sciences. Second edition*. Academic Press. ISBN 978-0-12-382165-2.
- Menotti-Raymond M., David V. and O'brien S., 1997: Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature*, 386(6627), 774.
- Minarovič T., Trakovická A. Rafayová A. a Lieskovská Z., 2010: Animal species identification by PCR–RFLP of cytochrome b. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 43(1), 296-299.
- Montpetit S.A., Fitch I.T., O'Donnell P.T., 2005: A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework. *J Forensic Sci.*, 50(3), 555-563.
- Nobelprize.org. Kary B. Mullis - *Facts*. [online] Nobelprize.org, Nobel Media AB 2014. [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html
- Rodriguez-Ramirez R., Arana A., Alfonso L., Gonzalez-Cordova A.F., Torrescano G., Guerrero Legarreta I. a Vallejo-Cordoba B., 2011: Molecular traceability of beef from synthetic Mexican bovine breeds. *Genetics and Molecular Research.*, 10, 2358–65.
- Rokyta R., Turková Z. a Marešová D., 2002: *Somatologie: učebnice*. Praha: Eurolex Bohemia. ISBN 80-86432-30-0.
- Rutty G.N., Hopwood A, Tucker V., 2003: The effectiveness of protective clothing in the reduction of potential DNA contamination of the scene of crime. *Int J Legal Med*, 117(3), 170-174.
- Saferstein R., 2001: *Criminalistics: an introduction to forensic science*. 7th ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall. ISBN 0130138274.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R. Horn G. T., Mullis K. B. a Erlich H. A., 1988: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

- Sensabaugh G., 1979: The Quantitative Acid Phosphatase Test. A Statistical Analysis of Endogenous and Postcoital Acid Phosphatase Levels in the Vagina. *Journal of Forensic Sciences*, 24, 346-365. ISSN 0022-1198.
- Schneider P.M., Seo Y. a Rittner C., 1999: Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *International Journal of Legal Medicine*, , 112, 315-6.
- Simich J. P., Morris, S. L., Klick R. L. a Rittenhouse-Diakun K., 1999: Validation of the Use of a Commercially Available Kit for the Identification of Prostate Specific Antigen (PSA) in Semen Stains. *Journal of Forensic Sciences*, 44(6). DOI: 10.1520/JFS14592J. ISSN 00221198.
- Steinman G., 1995: Rapid spot tests for identifying suspected semen specimens. *Forensic Science International*, 72(3), 191-197. DOI: 10.1016/0379-0738(95)01703-L. ISSN 03790738.
- Šimková H., 2012: *Breviář forenzní genetiky: forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích*. Brno: Tribun EU, ISBN 978-80-263-0247-6.
- Šlapalová T., 2010: *Forenzní molekulárně genetická analýza živočichů*. Praha, Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Šmarda J., 2005: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- Thieme F. P., Otten, C. M., 2005: The Unreliability Of Blood Typing Aged Bone, University of Michigan, 387–397.
- Van Eenennaam A. L., Weaber R. L., Drake D. J., Penedo M. C. T., Quaas R. L., Garrick D. J. a Pollak E. J., 2007: DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *Journal of Animal Science*, 85(12). DOI: 10.2527/jas.2007-0284. ISSN 1525-3163.
- Vasquez J.F., Perez T., Urena F., Gudin E., Albornoz J. a Dominguez A., 2004: Practical application of DNA fingerprinting to trace beef. *Journal of Food Protection*, 67, 972–979.
- Vrtková I., 2015: *Detekce, monitoring a implementace genetických markerů u koní v ČR*. České Budějovice. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

Walsh P.S, Metzger D.A, Higushi R., 1991: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10(4), 506-513.

Zehner R., Zimmermann S. a Mebs D., 1998: RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 111(6), 323-327. DOI: 10.1007/s004140050180. ISSN 0937-9827.