

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Technická fakulta

Katedra elektrotechniky a automatizace

**Identifikace jedince založena na DNA**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Veronika Hartová, Ph.D.

Autor práce: Marek Škeřík

PRAHA 2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Marek Škeřík

Informační a řídicí technika v agropotravinářském komplexu

Název práce

**Identifikace jedince založena na DNA**

Název anglicky

**Identification of individuals based on DNA**

---

### Cíle práce

Téma bakalářské práce se věnuje biometrické identifikaci osob, která je založena na DNA. Popisuje DNA, genetický profil jedince, odběr a analýzu DNA, identifikaci obětí trestného činu. Poukazuje na výhody a nevýhody tohoto způsobu identifikace.

### Metodika

Metodika řešené problematiky bakalářské práce je založena na studiu a analýzách odborných informačních zdrojů. Vlastní řešení je realizováno formou analýz této metody a zároveň výsledného vyhodnocení této metody z hlediska uživatelské a finanční náročnosti. Na základě rozboru teoretických poznatků a výsledků hodnocení budou formulovány závěry bakalářské práce.

## Doporučený rozsah práce

30-40 sr.

## Klíčová slova

DNA, analýza, identifikace, zločin

---

## Doporučené zdroje informací

HEŘMAN, J., et al.: Elektrotechnické a telekomunikační instalace. Praha: Verlag Dashöfer, 2008. ISSN 1803-0475.

JAIN, A.; BOLLE, R.; PANKANTI, S. „Biometrics. Personal Identification in Networked Society.“ Norwell, Massachusetts, USA, Kluwer Academic Publisher, 1999, ISBN 0-7923-8345-1.

RAK, R.; MATYÁŠ, V.; ŘÍHA, Z. a kolektiv. „Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích.“ Praha, Nakladatelství Grada, 2012

---

## Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – TF

## Vedoucí práce

Ing. Veronika Hartová, Ph.D.

## Garantující pracoviště

Katedra elektrotechniky a automatizace

Elektronicky schváleno dne 12. 1. 2016

**prof. Ing. Jaromír Volf, DrSc.**

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 2. 3. 2016

**prof. Ing. Vladimír Jurča, CSc.**

Děkan

V Praze dne 30. 03. 2017

## **Čestné prohlášení**

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Identifikace jedince založena na DNA vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Jsem si vědom, že moje bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí. Jsem si vědom že, na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.“

V Praze dne 30.3.2017

.....

Marek Škeřík

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí práce Ing. Veronice Hartové, Ph.D. za odbornou pomoc a vedení, cenné rady, připomínky a její čas při kontrole bakalářské práce.

**Abstrakt:** Bakalářská práce se zabývá problematikou práce s DNA a jejím využití v kriminalistice při identifikaci osob. Na začátku práce je popsána samotná DNA, její důležité části a vlastnosti. Dále se věnuje obecné identifikaci osob pomocí DNA a pojmům s ní spojenou. Během toho je popsána databáze DNA a systém CODIS. Následující část se věnuje práci s DNA, kde jsou popsány jednotlivé procesy a metody. Izolace, separace a sekvenace jsou hlavní operace s DNA, při nichž je biologický materiál podroben několika biochemickým reakcím ve speciálních přístrojích. Jádrem práce je přiblížit postup jednotlivých metod identifikace pomocí DNA a otisku prstu a tím poukázat na jejich rozdíly. U obou metod je vysvětlen proces identifikace, sběr vzorků, analýza a vyhodnocení. Na závěr jsou metody porovnány.

**Klíčová slova:** DNA, analýza, identifikace, profil DNA, vzorek DNA

## **Identification of individuals based on DNA**

**Summary:** This bachelor thesis deal with issues of working with DNA and it's use in criminal investigation to identify a person. In the beginning of this thesis a DNA molecule itself is described, as its main parts and characteristics. Next is a person identification with DNA in general and explanation of related terms. Meanwhile DNA database and CODIS system is described. Following part is about working with DNA and description of processes and methods. Isolation, separation and sequencing are main methods of working with DNA. In these procedures is biological material exposed to several biochemical reactions in special machines. Core of this project is to introduce processes of each metods of person identification with DNA and fingerprint analysis and therefore point out their differences. There is explanation of identification process, samples colecting, analysis and evaluation in both methods. In conclusion each method is compared.

**Key words:** DNA, analysis, identification, DNA profile, DNA sample

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Cíl práce.....	3
3	Metodika práce .....	4
4	Teoretická východiska .....	5
4.1	Biometrie.....	5
4.2	Historie DNA.....	5
4.3	DNA .....	6
4.3.1	Chromozómy v buňce DNA .....	7
4.3.2	Překlad kódu DNA .....	8
4.4	Přenos genetické informace.....	8
4.4.1	Dědičnost.....	9
4.5	Identifikace osob prostřednictvím analýzy DNA.....	9
4.5.1	Identita jedince.....	10
4.5.2	Genetický profil .....	10
4.5.3	Statické parametry genetického profilování .....	11
4.6	Využití DNA v kriminalistice .....	12
4.6.1	System CODIS .....	14
4.6.2	Národní databáze DNA v České republice.....	15
4.7	Analýza DNA .....	16
4.7.1	Zdroje DNA .....	16
4.7.2	Postup analýzy v kriminalistice.....	17
4.8	Izolace DNA .....	19
4.8.1	Izolace DNA pomocí chelexu .....	19
4.8.2	Izolace DNA pomocí fenol-chloroformu.....	20
4.8.3	Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek .....	21
4.9	Separace DNA.....	22
4.9.1	Elektroforetická separace.....	22
4.9.2	Centrifugace .....	24
4.10	PCR .....	26
4.11	Sekvence DNA .....	29
4.11.1	Sangerova metoda .....	29
4.11.2	Sekvenování nové generace.....	30



4.12	Daktyloskopie .....	35
4.12.1	Postup získávání stop .....	37
4.13	Daktyloskopická expertiza .....	37
4.13.1	Moderní využití otisků prstů .....	38
5	Praktická část práce .....	39
5.1	Analýza DNA v praxi .....	39
5.1.1	DNA v kriminalistice .....	39
5.1.2	Komerční testování DNA .....	39
5.2	Otisk prstu v praxi .....	42
5.2.1	Daktyloskopická sada .....	42
5.2.2	Daktyloskopická karta .....	43
5.3	Závěrečné zhodnocení .....	44
6	Zhodnocení výsledků .....	45
7	Závěr .....	48
8	Seznam použitých zdrojů .....	49
9	Seznam obrázků .....	53
10	Seznam tabulek .....	54

# 1 Úvod

Pokud se hovoří o identifikaci, lze ji vyjádřit jako hledání, zjišťování a následné zpracovávání informací a dat o daném objektu. Je možno hovořit o identifikaci osob, živočichů, rostlin, předmětů, ale i o identifikaci činnosti, požadavků či projevů. Názorným příkladem může být lékařská diagnóza, kdy lékaři zkoumají a analyzují projevy nemoci a následovně je porovnávají s dlouhodobě ověřenými projevy dané nemoci u ostatních pacientů. V tomto smyslu může být identifikace chápána jako klasická diagnostika. Pak se identifikace dělí na konkrétní (osoba, rostlina, předmět, atd.) a abstraktní (jevy, projevy, procesy, potřeby, činnosti, chování, atd.). [1; 2; 3]

Samotná identifikace je brána jako proces porovnávání objektů podle jejich stejných nebo rozdílných vlastností, forem, složení, funkcí, významu či výskytu v čase, přičemž je bráno za cíl rozhodnout o shodě mezi objekty. Hlavní je tedy proces rozhodování, který by měl být realizován v konečném čase, tedy měl by mít posloupné kroky, které vedou k závěru s určitou přesností. [1; 2; 3]

Dané věci, které lze považovat za shodné, nemusí být shodné ze všech úhlů pohledů. Pokud platí, že  $A=A$ , tak i na první pohled stejné znaky nemusí být shodné, protože se jeden nachází na levé straně a druhý na pravé. Právě hlediska pragmatických aspektů poukazují na to, že shoda se netýká pouze porovnávaných objektů a jejich vlastností, ale i dalších okolností, které mohou vymezit cíle u daného rozhodování. Z tohoto důvodu nemusí identifikace rozhodovat jen o vztahu identit objektů, ale i o přiřaditelnosti v daném smyslu jednoho z nich. [1; 2; 3]

Identifikace osoby je jeden ze speciálních případů identifikace, kdy osobu lze identifikovat jako objekt nebo subjekt identifikace. Díky tomu je možné hovořit o pojmech vnější a vnitřní identifikace. Identifikace vnější je chápána jako fyzická identita člověka a vnitřní jako psychologická a sociální identita. Pro identifikační účely jsou využívány anatomické a fyziologické charakteristiky, které má každý člověk unikátní. Biometrické charakteristiky jsou využívány na základě vědeckých poznatků k identifikaci osob podle oční duhovky, oční sítnice, tváře, stavby vnějšího ucha, otisku prstů, dlaní a chodidel, geometrii prstů a ruky, topologii žil zápěstí, lidského tělesného pachu, rozměrů a váhy lidského těla a skladby DNA. [1; 2; 3]

Na konci 20. století se v Evropě a také v České republice začala ve velkém množství využívat analýza DNA a s tím spojené uchovávání vzorků a profilů DNA. Identifikace osoby podle DNA umožňuje s vysokou přesností potvrdit nebo vyloučit shodu mezi testovaným biologickým materiálem. Výhoda analýzy DNA je, že jí lze provádět ze všech typů lidské tkáně. Každý člověk má unikátní DNA a ta zůstává v čase neměnná. Analýza DNA má široké spektrum využití, hlavně v kriminalistice a zdravotnictví, kde si našla velký počet aplikací. V kriminalistice je využívána při hledání ztracených osob, při identifikaci pachatelů, obětí trestního činu, přírodních katastrof a jiných nehodách. [1; 2; 3]

## 2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bude popsat biometrickou identifikaci osob, která je založena na analýze DNA. Bude popisovat samotnou DNA, genetický profil jedince, odběr a analýzu DNA, využívané metody při izolaci, separaci a sekvenaci DNA. Dále bude poukazovat na výhody a nevýhody tohoto způsobu identifikace.

Dílčí cíle bakalářské práce jsou:

- Uvést do problematiky DNA
- Vytvořit přehled využívaných metod a principů
- Na základě uvedených poznatků porovnat DNA a otisk prstu

### 3 Metodika práce

Potřebné informace ke zpracování teoretické části práce budou čerpány z odborné literatury, akademických prací, internetových článků a zdrojů zabývajících se tematikou identifikace a DNA. Na úvod bude přiblížena problematika DNA, z čeho se skládá, kde se nachází a co nám přináší její využití. V další část se bude práce věnovat identifikaci a kriminalistice. Genetický profil je vybraná část vzorku DNA vhodná k testování, je nutné, aby byla uložena v databázi DNA, která zajistí budoucí možnost porovnávat nalezené vzorky. Bude přiblíženo využití DNA v kriminalistice, kde bude popsán postup identifikace od místa činu až po vyhodnocení shody profilu DNA a zdroje DNA. Následující část bude řešit analýzu DNA, kde budou popsány hlavní kroky a využívané metody. Je nejprve potřeba izolovat čistou DNA, následovně oddělit potřebné části a na závěr identifikovat pořadí bází v řetězci, kvůli uložení a interpretaci dat řetězců. Každý krok má více metod řešení, budou popsány některé z nich a zmíněny jejich výhody a nevýhody využití. Na konci praktické části bude nastíněna i problematika daktyloskopie.

Praktická část práce se bude věnovat využití identifikace pomocí DNA a otisku prstu. Budou zmíněny komerční firmy, které se zabývají prací s DNA a jejich nabízené služby. U otisku prstu bude přiblížena daktyloskopická sada a karta. Hlavní částí bude porovnání obou metod a vyvození závěru.

## 4 Teoretická východiska

Teoretická část se na začátek zabývá samotnou DNA, dále se věnuje jejímu využití v kriminalistice a následovně jednotlivým krokům analýzy DNA. Na konci teoretické části je zmíněna podstata daktyloskopie a princip odebírání otisků prstů.

### 4.1 Biometrie

Představuje metody založené na rozpoznávání měřitelných biologických charakteristik, díky kterým pak s určitou přesností je rozpoznán daný organismus. Metody vychází z faktu, že některé biologické charakteristiky jsou pro každého člověka jedinečné. Identita člověka se pak zjišťuje z jeho charakteristických rysů, jako je například: otisk prstu, oční duhovka, oční sítnice, postava, hlas či DNA. [1; 4]

### 4.2 Historie DNA

- Roku 1869 byla poprvé popsána nukleová kyselina, kdy švýcarský lékař Friedrich Miescher zkoumal složení hnisu z nemocničních obvazů.
- Na počátku 20. století Phoebus Levene objevil, že DNA se skládá z cukrů, fosfátů a bází.
- První důkaz, že DNA přenáší genetickou informaci, byl v roce 1944 Averyho-MacLeodův-McCartyho experiment, který se zabýval sérií pokusů transformace pneumokoků.
- V roce 1953 byl představen dvoušroubovicový model v časopise Nature - James D. Watson a Francis Crick.
- V roce 1957 předložil Francis Crick sérii pravidel, které se označují jako centrální dogma molekulární biologie a popisují vztahy mezi DNA, RNA a proteiny.
- Roku 1958 Meselsonův-Stahlův experiment umožnil poznat způsob replikace DNA v buňkách.
- Genetický kód rozluštili na počátku 60. let Har Gobind Khorana, Robert W. Holley a Marshall Warren Nirenberg. [2]

## 4.3 DNA

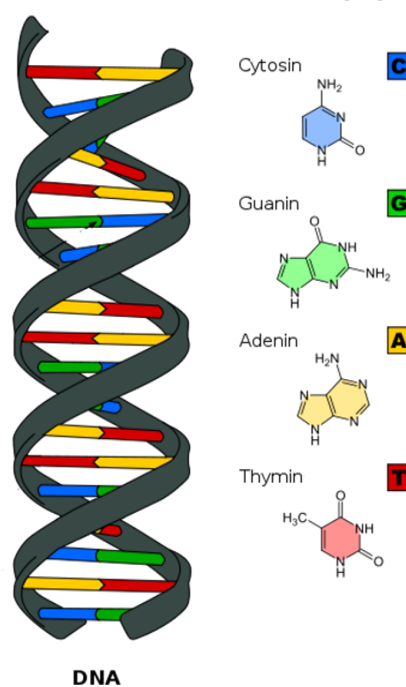
Deoxyribonukleová kyselina je běžně označovaná jako DNA (z anglického Deoxyribonucleic acid). DNA je nositelem genetické informace všech organismů, ta zajišťuje strukturu, která zajistí vývoj a vlastnosti celého organismu. [1; 2]

Ve většině organismů mohou být nalezeny dva typy informačních biopolymerů – nukleové kyseliny a proteiny. Nukleonové kyseliny nesou informaci podle lineárního kódu, naopak proteiny slouží jako funkčně-stavební polymery, které vznikají na základě informace v nukleových kyselinách. Proteom je soubor proteinů v buňce, který se liší u každého jedince typem tkáně i časem. Obsah genetické informace v nukleonové kyselině se nazývá genom. Genom je v čase stabilní. [1; 2]

U rostlin a živočichů, které jsou označovány, jako eukaryotické organizmy je DNA uložena zejména uvnitř buněčného jádra, zatímco u jednodušších organismů nazývaných prokaryotické (např. bakterie) se DNA nachází volně v cytoplazmě. [1; 2]

DNA se skládá z řetězce nukleotidů. Nukleotidy jsou složeny ze tří částí - cukru deoxyribózy, fosfátové skupiny a jedné ze čtyř nukleových bází. Právě báze jsou schopny nést informaci, může jí být adenin (A), guanin (G), cytosin (C) nebo thymin (T). Adenin, guanin patří mezi puriny, zbylé mezi tzv. pyrimidiny. Viz obr. 1 [1; 2]

Obr. 1 Šroubovice DNA s bázemi [46]



Dvoušroubovici DNA tvoří dvě navzájem spletená vlákna, kde se střídají čtyři prvky nukleotidů, každé mířící opačným směrem (tzv. antiparalelní). Chemické vazby mezi molekulami zajišťují jednosměrnost kódu, lze ho číst jen z jedné strany. Mezi protilehlými bázemi obou vláken se vytvářejí vodíkové můstky, a to tři mezi guaninem a cytosinem nebo dva mezi adeninem a thyminem. Existují i jiné způsoby uspořádání řetězců, vymykající se tradiční představě dvoušroubovice. [1; 2]

### **4.3.1 Chromozómy v buňce DNA**

DNA se nachází v buněčném jádře, je to membránový útvar uvnitř buňky. Zde je DNA uspořádána do 23 párů dvojevláken, nazývaných chromozómy. Jednotlivé chromozómy umožňují lepší manipulaci, než jedno dlouhé vlákno. Dále jednotlivé chromozómy mají možnost kombinovat genetické informace při tvorbě pohlavních buněk. Počet 23 není konečný, jsou známy organismy s výrazně menším i větším počtem chromozómů. [1; 2]

Celková délka DNA jedné řady chromozómů v tělní buňce je asi 3,3 miliardy párů bází. V tělní buňce se vždy nacházejí dvě řady chromozómů. První je mateřského a druhá otcovského původu, tento stav se označuje jako diploidie. Každý chromozóm se tedy vyskytuje v buňce dvakrát (v páru). Uspořádání páru je obvykle shodné. Nesou stejné geny a nekódující oblasti ve stejném pořadí, avšak forma genu či nekódujícího místa může být rozdílná, pak se nazývá alela. Když jsou obě alely shodné, je hovořeno o homozygotitě, v opačném případě o heterozygotitě. [1; 2]

Výjimku tvoří pohlavní párové chromozómy, označované X a Y. Ty mají homologní pouze určitou část, ve zbytku se výrazně liší. Chromozóm X nese v nehomologní oblasti mnohem více genů, než Y. Chromozómy se liší podle pohlaví jedince, ženy mají sestavu XX a muži XY. [1; 2]

I když se většina DNA nachází v jádře, je menšinová část mimo jádro velmi důležitá, tzv. mitochondriální DNA. Malá molekula o délce 16500 párů bází. Mitochondrie jsou buněčné organely, které považujeme za energetické centrum buňky. Zde probíhá řada složitých metabolických procesů. Některé potřebné bílkoviny jsou přímo zakódovány v DNA těchto organel. [1; 2]



### 4.3.2 Překlad kódu DNA

O překladu kódu je hovořeno jen u částí DNA, která nese informaci, tedy o genech. Podstatně větší část DNA informaci o stavbě organismu nenese, tudíž zde překlad kódu není uplatňován. [1]

Je třeba převést informaci z DNA do struktury bílkoviny, tedy na jiný typ biopolymeru. V první řadě se podle komplementárního vlákna DNA zkopíruje požadovaný úsek zahrnující strukturu (návod) na celou bílkovinu, tento proces se nazývá transkripce. Vzniklé vlákno je svou strukturou podobné DNA, je tvořeno ribonukleovou kyselinou (RNA). Další procesy vzniklou RNA upravují do definitivní podoby. Jsou vystříhány nefunkční úseky, připojeny různé značky a ochranné prvky. [1]

Upravenou RNA čeká závěrečná fáze procesu zvaná translace neboli syntézy bílkoviny. Základní kódující jednotkou je triplet, ten označuje pořadí tří nukleotidů. Každému tripletu odpovídá určitá aminokyselina. Kód RNA je snímán po triplech a na jejich základě jsou do vznikajícího bílkového řetězce začleňovány aminokyseliny. Teoretické množství tripletů je 64 (neboli  $4^3$ ). Ale v přírodě se běžně vyskytuje pouze 21 aminokyselin. Je to způsobeno tím, že některé tripletky kódují stejnou aminokyselinu, tyto tripletky jsou nazývány synonymní. Vzhledem k existenci synonymních tripletů je pak celý genetický kód označován jako degenerovaný. Svůj protějšek v aminokyselinách má celkem 61 tripletů. Ze zbylých tří je jeden triplet iniciační, slouží jako značka, od které se má číst. A dva tripletky terminační označené názvy amber a ochle, ty slouží pro ukončení čtení. Těmito kroky je sestaven celý bílkovinný řetězec, který se dále samovolně (podle možností chemických a prostorových vlastností jednotlivých aminokyselin) uspořádá do určitého tvaru. [1]

### 4.4 Přenos genetické informace

Přenos informace může probíhat dvěma způsoby. Horizontálně, což je přenos z jedince na jedince. Je typický pro prvojaderné organismy, například bakterie, které si mohou část své DNA vyměnit. U rostlin, člověka nebo jiných živočichů nebyla přímá změna DNA nikdy zaznamenána. U nich je za horizontální přenos považované začlenění virové DNA do jejich jaderné DNA. Nebo dále vertikální přenos, který představuje přenos z generace na generaci. Základní schopnost je předávat své vlastnosti potomků, tedy dědičnost. [1]

#### 4.4.1 Dědičnost

V jaderné DNA, při běžném buněčném dělení se zkopíruje 23 párů chromozómů. Vzniklé dceřiny buňky obsahují dvě identické sady chromozómů, jako měla mateřská buňka. Jinak je tomu u pohlavních buněk, u kterých by nebylo možné, aby vznikly čtyři sádkami chromozómů při spojení. Během tvorby pohlavních buněk musí dojít ke zredukování počtu sádek chromozómů ze dvou na jednu, pak při splynutí dvou pohlavních buněk bude docíleno správného počtu sádek. Tento proces se nazývá meióza, jde tedy o redukční dělení, ke kterému dochází ve specializovaných tkáních vaječníků či varlat. Párové chromozómy se k sobě přiblíží a navzájem si náhodně vymění některé úseky, pak se mateřská buňka rozdělí. Vzniklé dceřiné buňky obsahují pouze jednu sadu chromozómů. Až po splynutí spermie a vajíčka bude nová buňka diploidní, tedy bude nést dvě sady chromozómů. [1]

Pohlavní chromozómy X a Y si nevyměňují úseky, jen se rozdělí do dceřiných buněk. Ženská vajíčka nesou jeden chromozóm X, naproti mužské spermie jsou rozděleny na polovinu, když jedna polovina nese chromozóm X a druhá Y. Při spojení dvou X chromozómů vznikne žena a při spojení chromozómů X a Y muž. [1]

#### DNA mitochondriální

Dělení mitochondriální DNA je odlišné, jelikož je výhradně maternální, neboli pouze ženské buňky. Při spojení spermie a vajíčka jsou všechny mitochondrie mužského původu odstraněny. Potomek pak nese shodnou DNA jak jeho matka. [1]

### 4.5 Identifikace osob prostřednictvím analýzy DNA

Pořadí nukleotidů v DNA je až z 95% délky řetězce shodné pro všechny jedince. Zbýlých 5% je variabilních a mění se v různých místech, ty jsou dále sledovány a nakonec, lze identifikovat jedince podle jeho charakteristického uspořádání. Lékařská genetika se zabývá především kódujícími oblastmi, kde může identifikovat různé choroby, syndromy či predispozice k onemocnění. Naopak identifikační genetika se zaměřuje téměř výhradně na oblasti nekódující, ty které nejsou přepisovány do struktury bílkovin. Zabývání se nekódujícími oblastmi má dva velké důvody. První je, že variabilita oblastí je vyšší. Mutace zde nemají žádný vliv na vlastnosti jedince a nejsou tudíž nijak selektovány. Druhý důvod je z etických důvodů, kdy není vhodné pro identifikační účely analyzovat oblasti DNA, které mohou souviset s výsledky onemocnění, intelektuální úrovní jedince, či třeba předpokládanou délkou života. [1; 3]

Výzkum v oblasti genetických identifikačních metod se zaměřuje i na analýzu vybraných kódujících sekvencí, které popisují jednotlivé rysy jedince, jako např. barva vlasů, očí, pleti, výška postavy a další. Případné uvedení do běžné praxe, by v kriminalistice způsobilo jistou revoluci, poněvadž i z malého množství biologického materiálu by bylo možné vcelku přesně identifikovat pachatele a snížit chybovost případných omylů. Podle neoficiálních informací jsou podobné metody už vyvíjeny a testovány velkými světovými genetickými laboratořemi. [1; 3]

#### **4.5.1 Identita jedince**

Ve společnosti není přesně definováno, v jakém časovém úseku se musí nacházet živý organismus, abychom o něm mohli mluvit jako o jedinci, v době jeho vzniku. Běžně je považován za individuum fyzický jedince, přičemž se klade důraz na jeho psychickou integritu a individualitu. Stěžným příkladem můžou být siamská dvojčata s jedním tělem, ale se dvěma oddělenými a funkčními hlavami, v tuto chvíli jsou považovány za dva jedince. [1; 5]

Z psychologického hlediska identitou se rozumí prožívání toho, čím jedinec je, ať už jako individuum nebo jako člen lidského společenství, pak se identita dále rozvíjí v konkrétním kulturním a socio-historickém kontextu. [1; 5]

#### **4.5.2 Genetický profil**

Genetický profil udává charakteristické rysy z DNA daného jedince, je to vzorek z vybraných variabilních míst genomu jedince. Pro výběr vhodných míst na chromozómu ke genetickému testování, se musíme řídit několika základními kritérii. První je široká alelická variabilita v populaci, neboli přítomnost velkého množství variant vhodných míst, také označovaných jako lokusy. Locus označuje místo na chromozómu, na kterém se nalézá příslušný gen nebo polymorfismus. Pak konkrétní varianta genu na příslušném lokusu se nazývá alela. Dále je statisticky nutné, aby se jednotlivé alely nacházely ve stejném zastoupení. Je potřeba zjistit jejich četnost pomocí populační studie, k ní je zapotřebí 100 až 200 náhodně vybraných jedinců bez příbuzenského vztahu. Druhým důležitým kritériem je stabilita daného lokusu, v podstatě odolnost proti mutačním změnám při vzniku pohlavních buněk nebo při tvorbě různých tkání. [1]

K porovnávání testů mezi laboratořemi je důležité, aby testy vycházeli ze stejných parametrů, tedy shodný výběr zkoumaných lokusů. Proto se rozhodla britská organizace FSS v devadesátých letech minulého století o výrobu tzv. identifikačních forenzních kitů. Jsou to sady chemikálií, které umožňují analyzovat standardně vybrané lokusy. V dnešní době je více firem na trhu, které se zabývají distribucí kitů. Samotné kity jsou akreditovány mezinárodními forenzními institucemi. [1]

### 4.5.3 Statické parametry genetického profilování

Genetický profil nemusí mít vždy stejnou identifikační hodnotu. Je ovlivněna počtem lokusů zahrnutých do testování a vnitřní variabilitou jednotlivých lokusů. Pak platí, když budeme mít velké množství lokusů a budou více variabilní, tak bude větší pravděpodobnost, že profil bude jedinečnější a jiná osoba nebude mít stejné uspořádání v daných lokusech. Tento termín se také nazývá pravděpodobnost náhodné shody. [1]

U jednotlivých lokusu můžeme stanovit frekvenci genotypu, což je četnost vybrané sestavy alel. Vzorce pro výpočet frekvence genotypu vycházejí ze základní kombinatoriky, poněvadž získávání daných alel od otce a matky je zcela náhodné. Bylo zjištěno, že jednotlivé populace se navzájem liší ve frekvenci alel. Výrazné rozdíly jsou nalezeny mezi lidskými rasami, tedy obyvateli jednotlivých kontinentů, dále i mezi jednotlivými národy. Určité rozdíly se nachází i mezi menšími vzdálenostmi, než jsou samotné státy. [1]

Podle sestavy více lokusů se určuje frekvence genetického profilu, ta lze stanovit jako součin frekvencí genotypů v jednotlivých lokusech. Ale musí být splněna podmínka, že jsou jednotlivé lokusy z genetického hlediska nezávislé, neboli musí být daleko od sebe. V číslech frekvence dosahuje zanedbatelně malých hodnot, i kdyby se započítal počet všech žijících obyvatel země, tak pravděpodobnost dvou osob se stejným genetickým profilem bez příbuzného vztahu je i tak malá. [1]

Výjimkou je speciální případ, který může nastat u jednovaječných dvojčat. Z biologického hlediska se mluví o dvou fyzických vyjádřeních jednoho genetického jedince. Je malá pravděpodobnost, že některé zkoumané části buněk, budou zasaženy mutací, proto u většiny případů jednovaječných dvojčat je zjištěn stejný genetický profil. Pro nalezení rozdílu by bylo zapotřebí analyzovat další lokusy, což je v tomto případě velmi časově náročná procedura, navíc není zajištěno, že bude v únosném časovém horizontu nalezen rozdíl. [1]

V kriminalistice se lze setkat s neúplným genetickým profilem. Mluví se o něm při analýze malého množství biologického materiálu nebo biologicky degradovaného materiálu, který je nalezen v biologických stopách na místě činu. Při neúplném genetickém profilu je samozřejmě mnohem menší pravděpodobnost nalezení shody se srovnávacím profilem DNA. Pokud je dosaženo s neúspěšně analyzovanými lokusy pod identifikační hranicí, není daná analýza profilu branná jako relevantní důkaz, jen může napomáhat v procesu. [1]

Dále je možné setkání se smíšeným genetickým profilem. Ten vznikne, jestliže vzorek biologického materiálu je složen ze dvou či více osob. Ve smíšeném genetickém profilu nastává zvláštní situace, kdy se nachází dvě a více alel u několika lokusů. Takovýto genetický profil se velmi těžko popisuje vědeckými metodami. [1]

## 4.6 Využití DNA v kriminalistice

V roce 1984 byla objevena metoda identifikace osob pomocí profilu DNA britským vědcem Alecem Jeffreysem. Poprvé v praxi byla využita v Británii v roce 1987, kdy byl usvědčen několikanásobný vrah za pomoci DNA. [6; 7]

Pro identifikaci konkrétní osoby za pomoci DNA je nutné, aby byl přítomen srovnávací vzorek. Bez něj je možno přesně určit genetické charakteristiky jedince, ale nelze dále provést samostatnou identifikaci konkrétního jedince. Při dodržení všech laboratorních pravidel a vlastnění dostatečného množství srovnávacího materiálu je identifikace podle DNA prakticky neomylná (uváděná spolehlivost 99,99%). Díky tomu, že nelze nalézt takřka identickou DNA, proto tato metoda zaujala policii, která viděla v nové metodě potenciál na odhalení dlouho hledaných pachatelů. Poněvadž každý jedinec, který se fyzicky dotkne nějakého předmětu, zanechává za sebou genetické stopy, jako jsou části kůže, kapky krve nebo třeba pot. Pak k identifikaci člověka stačí DNA odpovídající 50 pg (neboli  $50 \cdot 10^{-12}$  g). Jedna buňka lidského těla obsahuje cca 6 pg DNA. K samotné identifikaci se však nevyužívá celé DNA, ale jen tzv. DNA profil. [6; 7]

Získaný vzorek DNA se dále zpracovává a výsledkem je právě DNA profil, který je dále porovnáván s údaji v databázi nebo je do databáze nově uložen. Biologický vzorek je po extrahování DNA zničen, kvůli případnému úniku informací, který by mohl představovat závažný problém. Tedy policie ani jiná instituce nemá v databázi uložen původní vzorek DNA, ale pouze jeho část. [6; 7]

Pro potřeby identifikace se využívá jen úseků v DNA, ve kterých lze nalézt shodné sekvence nukleotidů. V současné době se používá metoda STR polymorfismů, kdy jsou v lidské DNA místa, která neslouží ke kódování genů. Místa tvoří čteně se opakující skupiny 2 až 10 nukleotidů. Metoda STR polymorfismů využívá variability opakujících se úseků nukleotidů, které se označují lokusy. Tandemové repetice tvořené opakováním 4 nebo 5 nukleotidy zaručují bezchybnost údajů a dobrou odolnost vůči nepříznivým vnějším vlivům. Při analýze se určuje délka vybrané tandemové repetice. Testuje se více lokusů zároveň a jejich soubor se označuje jako DNA profil. K praktické identifikaci většinou stačí 9-12 lokusů, ale v policejní praxi je potřeba dosáhnout vysoké pravděpodobnosti, proto je v české republice stanovených 16 lokusů. [6; 7]

Je možné narazit na situaci, kdy metoda identifikace podle DNA není neomylná. V případě kdy se manipuluje se stopami DNA. Při zajištění a odběru stop je nutno potvrdit, že pachatel nemanipuloval s místem činu. Pak se jedná o falešné stopy, které mají odvést pozornost vyšetřovatelů. Případně může hrozit, že pachatel se pokusil o zničení stop. I když policie dorazí na místo činu, není zaručeno, že biologické stopy zůstanou v bezpečí a dojde ke správnému zajištění pro účel analýzy. Hrozí znehodnocení nebo přehlédnutí stop, také může nastat riziko druhotného přenosu. V případě, že je osoba zatčena při nález její biologické stopy na místě činu, existují v zásadě tři možná vysvětlení, pokud nedošlo k manipulaci se stopami pachatelem. Za prvé, podezřelá osoba nemluví pravdu, dále DNA podezřelého se na místo dostala druhotně nebo málo pravděpodobná možnost, ale pořád existující, tedy že osoba pohybující se na místě činu v rámci vyšetřování podstrčila falešnou stopu. [6; 7]

Manipulace může být i mimo místo činu a to přímo s profilem DNA. Speciálně vyrobené žvýkačky dovolují dočasnou změnu DNA. Pokud je žvýkačka aplikována, dočasně při ústním stěru lze zaznamenat odlišnou DNA. K dosažení trvalé změny DNA by byla zapotřebí transplantace kostní dřeně. [6; 7]

Vzorek, který je úspěšně dopraven do laboratoře, se může i tady potýkat s riziky. Například se jedná o nevyhovující označení vzorku nebo nedostatečná dokumentace, která je vedena s manipulací vzorku. Při zpracovávání vzorku DNA nastává hrozba kontaminací nebo jeho chybného zpracování, které vede k nesprávným vyhodnocením a následovně k znemožnění identifikace pachatele. [6; 7]

Z výčtu hrozeb je zřejmé, že při práci s biologickým materiálem za účelem získání profilu DNA je nutnost dodržovat řadu opatření, které zahrnují i více násobné kontroly. Pak se dá tvrdit, že identifikace podle DNA je spolehlivá metoda s velkou pravděpodobností úspěšnosti. [6; 7]

#### **4.6.1 Systém CODIS**

Roku 1998 vznikla národní databáze DNA, kterou spravoval systém CODIS, software pro správu a porovnávání genetických profilů DNA. CODIS umožňuje uchovávat genetický profil, vytvářet potřebné kategorie profilů, porovnávat profily a zjišťovat shodu nebo podobnost jednotlivých profilů. SW je zajištěn několikastupňovým systémem kontroly (přístupové kódy, záznamy operací prováděné v databázi, kým, kdo odebíral vzorek, kdy a komu), což zamezuje neoprávněné manipulaci s profily. [1; 6]

Jednotlivé záznamy jsou tvořeny konkrétními alely v daných lokusech, ke kterým se přidává ID (identifikátor). ID představuje jedinečný kód, pod nímž je v databázi zapsán, dále se k němu ještě přidávají pomocné údaje. Ty jsou tvořeny kódem laboratoří a pracovníků, kteří pracovali se vzorkem, identifikace osoby, která vkládala vzorek do databáze, typ tkáně, pohlaví a rasy osoby, jíž vzorek patří. Dále administrativní údaje jako jsou časy a data. Klasické údaje o člověku, jako jméno, příjmení, datum narození a rodné číslo jsou vedeny až v oddělené databázi, kde se k nim přiřadí jednotlivé ID. [1; 6]

Aby se lépe orientovalo ve velkém množství záznamů, přiřazují se vzorky do různých kategorií, které vypovídají základní informaci. Profily označovány písmeny FU (forensic unknown), se řadí do kategorie stopy získané na místech neobhájených trestných činů. Profily od obviněných osob se označují OF (offender) a profily osob, které při práci v laboratořích mohli kontaminovat vzorek, se označují EK (elimination known), případně další označení. Vzorky lze vkládat do databáze dvěma způsoby. Manuální zápis nebo elektronický převod z automatického analyzačního softwaru. U manuálního zápisu může dojít k chybě při špatném opisování dat. Chybu se značí odstranit dva stupně ochrany. První, kde software automaticky hlídá zápis lokusu a jestli zapsané alely odpovídají správným hodnotám. Druhý stupeň ochrany stanovuje, že zápis genetického profilu musí provést nezávisle na sobě dvě osoby. Pak software vyhodnocuje zápisy a v případě shody se vzorek zapíše do databáze. U elektronického převodu není potřeba dvojí kontrola, neboť správné převedení si pohlídá sám software. [1; 6]

Hlavní důvod vzniku databáze bylo shromáždění velkého množství profilů a jejich následné porovnávání v reálném čase. Systém CODIS nabízí dva typy vyhledávání. První typ (searching) slouží k rychlému potvrzení, jestli daný profil je obsažen v databázi nebo ne. Druhý typ (autosearching) je prováděn opakovaně a jedná se o nalezení shody nebo podobnosti jednotlivých profilů obsažených v databázi. Autosearching je časově náročný v úměrnosti na velikost databáze. U menších databází jako má česká republika (řádově kolem 5000 profilů v roce 2003), se časy při vyhledávání pohybují v minutách. CODIS ukládá všechny zjištěné shody. [1; 6]

Systém umožňuje řadu filtrů při hledání. Základní nastavení hledá shodné profily s možností změny tolerance tzv. stringence neboli přísnost. Pokud je zvolena vysoká přísnost, jsou vyhledávány jen naprosto shodné profily. U střední nebo malé přísnosti se zvětšuje okruh případné shody. Dále filtrování podle očekávané nebo neočekávané shody, se dělí na hot a cold. Hot typ je shoda, která nastane podporou dalších důkazů. Příkladem může být stopa, která se najde na místě činu, po delší době se může objevit svědek, který označí případného pachatele. Podezřelému je odebrán srovnávací vzorek, který se porovná se vzorkem z místa činu a vyhledávaný profil se shoduje. Naproti tomu u typu cold se shoda neočekává. Vysvětleno na příkladu, kdy pachatel je zadržen za krádež a je mu odebrána DNA. V databázi je nalezena shoda s profilem, který byl nalezen u jiného trestního činu, kdy tento pachatel z něho nebyl podezírán. Z toho vyplývá, že nalezení neočekávaných shod je velkým přínosem využívání databázových systémů. [1; 6]

Další funkcí systému je statistická analýza. Z uložených profilů je stanovena frekvence alel, kterou je charakterizována populace v daném státě, na tomto základě se dále vypočítávají statistické parametry genetických profilů. [1; 6]

#### **4.6.2 Národní databáze DNA v České republice**

Identifikace pomocí DNA byla v České republice poprvé využita v roce 1992. Metoda se dále rozrůstala a policie české republiky prosazovala vytvoření databáze DNA. Provoz databáze DNA byl zahájen roku 2002 policií české republiky. Profily jsou spravovány systémem CODIS. V databázi jsou obsaženy profily DNA, které byly získány na místě trestného činu, ale dosud nebyly objasněny. Dále osob, které byly odsouzeny ze spáchání trestného činu nebo osoby, proti kterým bylo vedeno trestní stíhání. Uloženy jsou i profily obviněných osob z trestného činu a osoby nalezené při pátrání, které nemají právní způsobilost k úkonům v plném rozsahu. V těchto případech policie smí využívat genetického



profilu pouze, když nelze získat jiné údaje potřebné k identifikaci. Databáze obsahuje i genetické profily mrtvol, nalezených kostí a zbytků lidských těl s neznámou totožností. V roce 2016 národní databáze DNA obsahovala kolem 200 000 profilů. [6; 8]

Na všech služebnách české policie dochází k odběru biologického materiálu, ale ke čtení a analýze profilu DNA slouží Kriminální ústav v Praze, případně jeho regionální pracoviště. Odebírání vzorků se nejvíce provádí formou stěru slin z ústní dutiny. V § 42e odst. 1 zákona o Policii ČR lze volně vyložit. Pokud policista při plnění úkolu nemůže získat osobní údaje k následující identifikaci, jiným způsobem, je oprávněn u obviněných osob nebo osob ve výkonu trestu snímat daktyloskopické otisky, zjišťovat tělesné znaky, provádět měření těla, pořizovat obrazové, zvukové a obdobné záznamy nebo odebírat biologické vzorky umožňující získání informací o genetickém vybavení. Doplněn ještě o zákon §42e odst. 3, ten lze volně vyložit tak, že Policie ČR získala právo využívat násilí v oprávněných případech, aby mohla provést odběr biologického materiálu. [6; 8]

## **4.7 Analýza DNA**

Identifikace prostřednictvím analýzy DNA je poněkud odlišná od ostatních biometrických metod, neboť nepracuje s měřitelnými znaky člověka, ale objektem jejího zájmu je výhradně sám nosič genetické informace, tedy molekula DNA. Vybrané znaky ve struktuře DNA je ovšem možné převést na vyhodnotitelné genetické profily, které jsou jedinečné u každého člověka a lze je v rámci identifikačního procesu automaticky zpracovávat. Analýza probíhá v několika krocích, kdy je DNA izolována, separována a finálně sekvenována. [1]

### **4.7.1 Zdroje DNA**

Zdrojem pro identifikační analýzu může být jakákoliv lidská buňka nebo její část, která obsahuje DNA. Je možno identifikovat i poškozenou DNA, ale musí být zachovány ty úseky DNA, které se využijí k analýze. Když pomineme červené krvinky, pak se DNA nachází ve všech buňkách lidského těla. Jako vzorek může posloužit tkáň jakéhokoliv typu (krev, svalová tkáň, kost, zub, sperma atd.). V menším množství se DNA vyskytuje u ochlupení nebo nehtů. Ve velmi malém množství je obsažena i u tělesných sekretů a exkrementů. Jedná se většinou o slizniční buňky, které se uvolní do sekretu. Navzdory malému procentuálnímu zastoupení DNA, lze i tento materiál využít k identifikaci. [1; 9]

Za standartní vzorek DNA je brán otěr vnitřní strany tvářové sliznice pomocí vatového tampónku nebo jemného kartáčku. Tato metoda se využívá kvůli svým výhodám. Prvořadý je snadný odběr, který může provést i sama testovaná osoba, odběr dále není bolestivý a nenarušuje intimní místa testovaného. Další výhodou je jednoduché skladování vzorku (pokojová teplota, tma a sucho), kdy po vyschnutí je DNA stabilní po několik desítek let. Dříve se získával vzorek DNA z odběru krve, ale přináší sebou jistá rizika, proto je dnes už méně využívaný. Mezi riziky může být hrozba infekce, nutnost získávání vzorku lékařským personálem, degradace DNA zapříčiněná nesprávným skladováním. [1; 9]

V kriminalistice se setkává s využitím vzorků, které mají menší obsah DNA, přesto analýza může být úspěšně přesná na 90%. Příkladem můžou být nedopalky z cigaret nebo předměty, které byly v kontaktu s pokožkou či sliznicí pachatele. [1; 9]

Výzkumy objevily, že lidé můžou mít stabilní nebo nestabilní DNA, přičemž s nestabilní DNA je proces degradace mnohonásobně rychlejší po zániku buňky, než u stabilní DNA. Dále lze dělit lidi na „dobré“ a „špatné“ dárce buněk. Rozdíl mezi nimi je prostý, u dobrých dárců se uvolňuje povrchový biologický materiál ve větším množství, než u špatných dárců. Bohužel tyto vlastnosti se nedají ničím ovlivnit, protože jsou vrozené a dědičné. [1; 9]

#### **4.7.2 Postup analýzy v kriminalistice**

Ke sběru na místě činu jsou využívány tzv. „DNA sampling kits“. Jsou to sady určené přímo k uložení biologického materiálu s obsahem DNA, jiné odběrové sady nemusejí vyloučit riziko kontaminace vzorku. V současné době v České republice není povinnost při odběru používat ochranné prostředky, proto se díky nedůslednosti zvyšuje procento případné kontaminace vzorku. Samotné sady by měli hlavně obsahovat seznam obsažených nástrojů a instrukce k jejich použití. Dále prodyšné sáčky nebo nádoby se snadnou indikací narušení, sterilní samo zvlhčující tampony, zkumavku se sterilní vodou, jednorázové rukavice a formulář k zaznamenání informací o vzorku. Toto by mělo být základní vybavení, které lze rozšířit. K tomu je doporučováno, aby vyšetřovatel měl nasazenou masku a ochranné rukavice. Při sběru je důležité vzorek uložit do sterilního obalu a ten dále uložit do sterilizované krabice s indikátorem narušení vnitřního prostředí. Je zásadní uchránit vzorek před kontaminací, čehož je docíleno řízením se instrukcemi a použitím originálních odběrových sad. Použité sady by se měli posléze zlikvidovat. [9; 10]

Při přepravě by měli být vzorky uchovávány v pokojové teplotě a nevystavovány na přímé sluneční paprsky. Jako analýza DNA se nejčastěji využívá metoda RFLP, neboli analýza délkových polymorfizmů restrikčních fragmentů. Na začátek jsou fragmenty DNA rozděleny pomocí enzymu, dále jsou podrobeny elektroforéze, kdy se separují molekuly různé velikosti. Princip je popsán v kapitole Separace DNA. Southernemova metoda zajistí pozice fragmentů, kde je gel ponořen do roztoku, který separuje jednotlivá vlákna. Vlákna se dále přenesou na plastovou membránu, kde se dají rozlišit nukleonové báze, které jsou rozloženy po celé délce vláken. Sondy v podobě krátkého fragmentu DNA a radioaktivního atomu se vloží do bází. Dále se báze spojují se svými vhodnými protějšky, které jsou uloženy v sondě. Plastová membrána je přiložena k rentgenovému filmu a vlivem radioaktivního atomu vzniká na filmu obraz. Jako výsledek získáme autoradiograf, na kterém lze vidět krátké tmavé pásy náležící jednotlivým fragmentům. [9; 10]

Další metodou je analýza VNTR, metoda založená na úsecích s proměnlivým počtem tandemových opakování. Tato metoda umožňuje analyzovat výskyt identických úseků bází, v rámci celé délky vlákna. Na jednotlivých lokusech se liší počet opakujících se úseků. Oproti metodě RFLP je VNTR mnohem složitější a časově náročnější, na druhou stranu je výrazně přesnější. [9; 10]

DNA může analyzovat i metoda PCR, její výhodou je, že nevyžaduje velké množství vzorku. Naopak nedostatek je, že lze kopíruje jakékoliv vlákno, takže i kontaminanty. Nevyužívá se ani při znásilnění, protože by hrozilo zkopírování smíchané DNA. [9; 10]

Z PCR vychází metoda STR, analýza krátkých tandemových opakování. Příkladem může být úsek ATATATAT, kdy se opakují dvě báze A a T. Počty opakování se u jednotlivých jedinců liší. Někdo má více opakování a někdo méně, dále se liší i lokusem. Testuje se 13 až 16 lokusů, u kterých je malá pravděpodobnost, že dvě osoby mají všechna umístění stejná. [9; 10]

Metody mají své výhody i nevýhody, ale všechny je nutné analyzovat z čistých a nekontaminovaných vzorků. Jednotlivé výsledky jsou vizuálně odlišné podle použité metody analýzy DNA. Je získán digitální výstup v podobě grafu, který popisuje přesné umístění alel v chromozomu. Pokud je uložen profil DNA v databázi, má formu tabulky, případně schématu, kde pomocí kódu jsou označeny jednotlivé alely a jejich umístění. Laboratoře mají povinnost zaznamenávat provedení každé analýzy DNA. Zaznamenává se všechn přijatý materiál s vlastní číslem a jeho pohyb od místa činu do zpracování výsledků. Dále je potřebný

popis důkazu a metody, kterou je důkaz zpracováván pro získání DNA profilu. Na závěr je třeba uvést výsledky analýzy, buď byla analýza úspěšná a profil bylo možno sestavit, nebo se nepodařilo profil vytvořit a zapisují se důvody neúspěchu. [9; 10]

Pokud je profil úspěšně vytvořen, je dále porovnán s profilem podezřelého nebo je převeden na alfanumerický kód, který je porovnávám v databázi DNA. Nakonec je shoda potvrzena nebo vyloučena. [9; 10]

Analýze DNA se v České republice věnuje Kriminologický ústav Praha a jeho krajské ústavy. Dochází i k možnosti, že Kriminologický ústav využívá pomoci soukromých firem. [9; 10]

## **4.8 Izolace DNA**

K tomu, abychom mohli provést vlastní analýzu DNA, je třeba z biotického materiálu uvolnit a oddělit samotnou DNA, přičemž je nutné dále vzorek přečistit a případně zahustit. Prvním krokem bývá izolace či extrakce DNA. Buněčný materiál je třeba rozpustit. U živočišných buněk pomocí detergentů, které následovně rozpouští membrány. Složitější je to u buněk s buněčnou stěnou, tam je zapotřebí použití lysozymu, to je enzym se silnými antibakteriálními účinky. Následné přečišťování extraktu je zapotřebí kvůli bílkovinám, které výrazně kontaminují vzorek. Přečišťování je známo i pod názvem purifikace. Postupy pro přečišťování u nukleových kyselin jsou v mnoha ohledech stejné nebo se překrývají s postupy izolace DNA. Tím jsou odstraněny nebo modifikovány složky, které by vadily následným analýzám. Nakonec dochází k vlastní extrakci pomocí různých metod. [1; 2]

Metod izolace DNA je mnoho, většinou se liší například náročností procesu, spolehlivostí, časovou náročností, peněžní náročností nebo množstvím izolované DNA. [1; 2]

### **4.8.1 Izolace DNA pomocí chelexu**

Tato metoda se používá ve forenzní genetice pro oddělení DNA z miniaturních vzorků (vlasy, stopy tělních tekutin). Metoda je velmi rychlá a poměrně levná, dále poskytuje dostatečné množství čisté DNA pro vyhodnocování PCR reakcí (polymerázová řetězová reakce). Ale není vhodná pro další aplikace, u kterých množství čistí DNA už nestačí. [11]

Postup při izolaci:

- Homogenizace vzorku neboli dostatečné promíchání.
- Zničení buněčných složek, pomocí alkalického prostředí a vysoké teploty.
- Oddělení extraktu DNA od zbytků buněčných složek a pryskyřice chelexu. [11]

#### **4.8.2 Izolace DNA pomocí fenol-chloroformu**

Samotná izolace je poměrně pracná a zdlouhavá, na druhou stranu touto metodou je dosaženo velké množství velmi čisté DNA. [12; 13]

Rozpuštěním tkání a buněk, působením proteázy (enzym štěpící proteiny) vznikne lyzační roztok. K roztoku se postupně přidává fenol nebo směs fenolu a chloroformu, které v něm vyváží proteiny. Pokud je přidána vzniklá směs do vodného roztoku, pak dojde k separaci roztoku do dvou fází. Horní fázi tvoří roztok obsahující DNA, spodní fázi pak tvoří organická fáze fenolu či chloroformu. Mezi horní a spodní fází se hromadí proteiny. [12; 13]

Výhoda metody je, že DNA se díky své polaritě snadno rozpouští v polárním vodném roztoku. Fenol je oproti vodě méně polární, proto se v něm DNA rozpouští mnohem hůře. U proteinů je polarita dána jednotlivými aminokyselinami, proto jsou některé části více či méně polární. Jedna část by se lépe rozpouštěla ve vodě a druhá ve fenolu, proto proteiny setrvávají na rozhraní mezi horní a spodní fází. Pokud se opakuje přidávání a odebrání fenol-chloroformu, tím se dále bude přečišťovat horní fáze a dojde k postupnému pročišťování roztoku DNA od proteinů. [12; 13]

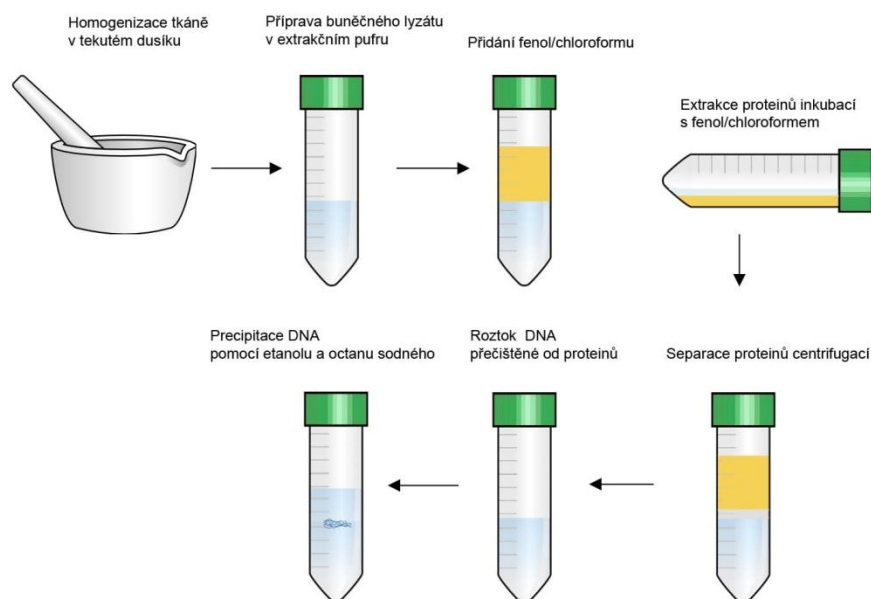
Postup při izolaci:

- Rozpuštění tkání (pletiv)
- Rozpuštění celistvosti buněk a natrávení proteinů pomocí lyzačního roztoku.
- Opakování pročišťování roztoku od proteinů pomocí fenol-chloroformu v kombinaci s centrifugací.
- Precipitace (srážení) DNA pomocí přídatku etanolu, octanu sodného a extrakce DNA z roztoku.
- Příprava výsledného roztoku DNA rozpuštěním DNA ve vodě či pufru.
- Kontrola integrity DNA elektroforetickou separací.
- Stanovení koncentrace DNA v získaném roztoku.

Viz obr.2 [12; 13]

Obr. 2 Postup při izolaci DNA pomocí fenol-chloroformu [12]

EXTRAKCE PROTEINŮ Z ROZTOKU DNA



### 4.8.3 Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek

Izolace pomocí kolonkových kitů je velmi rozšířená, hlavně kvůli snadné dostupnosti. Je to rychle a účinná metoda na získání DNA o dostatečné čistotě pro většinu aplikací, viz obr.3. [14]

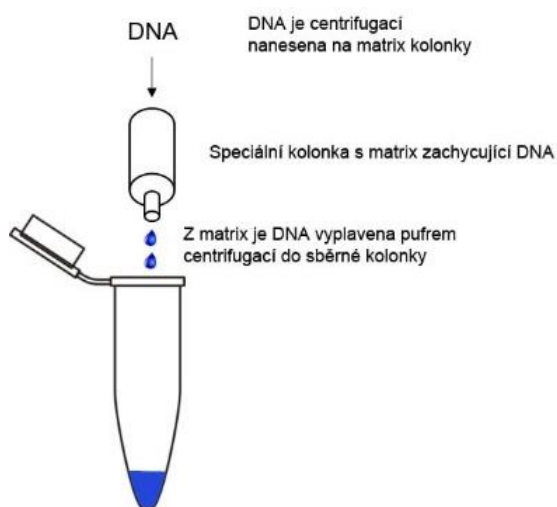
Postup při izolaci:

- Lyzační roztok se nanese do speciální kolonky.
- V kolonce je přítomna matrix, na kterou se přidaná DNA naváže a centrifugací kolonky se roztok odplaví ven.
- Po promytí se DNA z matrix vyváže centrifugací s vodou či elučním pufrem. DNA se pak odplaví do připravené zkumavky.

U kitů je třeba brát v potaz jmenovité parametry:

- pro jaký druh vstupního materiálu je kit utčen
- jaké je množství materiálu, které lze testovat
- výtěžek čisté DNA (RNA) v  $\mu\text{g}$
- délka procesu
- čistota výtěžku, která udává kontaminaci proteiny (výrobci udávají rozmezí mezi 1,6-1,9) [14]

Obr. 3 Kolonkový kit [14]



## 4.9 Separace DNA

Po izolaci DNA většinou navazuje separace neboli oddělení požadovaných molekul. Když je chtěno oddělení plazmidů od genové DNA, je využita metoda centrifugace při vhodně nastavených parametrech, obvykle za pomoci denaturace a následné renaturace. Pro efektivnější rozdělení podle velikosti a topologie DNA se využívá elektroforéza v různých obměnách s využitím gelu. Z gelu je dále možno DNA převést na nitrocelulóзовou membránu pomocí Southernova přenosu. Dále metoda centrifugace v hustotním gradientu, jsou zde oddělovány zejména části, které se liší zastoupením jednotlivých bází. [2]

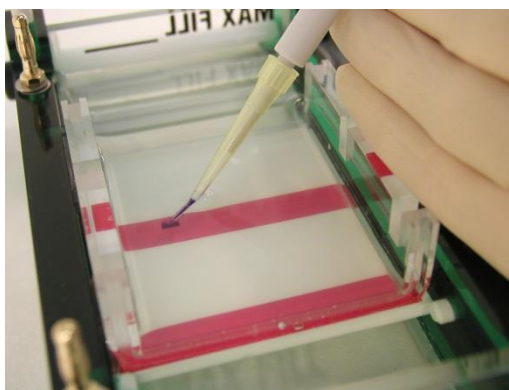
### 4.9.1 Elektroforetická separace

Metoda využívá velikosti jednotlivých fragmentů nukleových kyselin k jejich rozdělení. Elektroforéza pracuje s rozdílnou pohyblivostí jednotlivých fragmentů, která je určena právě jejich velikostí. Nukleonová kyselina má záporný náboj, díky záporně nabitým fosfátům, pak se tedy záporně zabitě částice v elektrickém poli pohybují směrem k anodě (kladný pól). Platí, že delší fragmenty se pohybují pomaleji, než kratší. Pohyb se provádí na vhodném nosiči, většinou to bývá agarosový nebo polyakrylamidovaný gel. Rozdíl mezi gely se odvíjí od

velikosti fragmentů, které jsou rozdělovány. Pro velmi krátké fragmenty se využívá polyakrylamidová elektroforéza. Gel vytváří složitou síť, která obsahuje polymerní molekuly s póry, díky nim mají různé molekuly jinou rychlost. Koncentrace gelu ovlivňuje pohyblivost molekul. Čím je gel více koncentrovaný, tím je separace pomalejší, ale lépe se rozdělují kratší fragmenty. U nižší koncentrace se pak lépe rozdělují delší fragmenty. Z toho vyplývá, že koncentrace ovlivňuje velikost pórů. [13; 15; 16]

Vzorky se nanosou do jamek v gelu, které jsou vytvořeny pomocí hřebínku. Když probíhá samotná elektroforéza, sleduje se pohyb v gelu pomocí barviva, to je v nanášecím purfu, který se smíchá se vzorkem před nanesení na gel. Pro odhad velikosti sledovaných fragmentů se do jedné jamky v gelu nanáší tzv. velikostní marker, ten udává standartní velikost. Nakonec procesu je třeba separované fragmenty DNA zviditelnit, to zajistí přidané barvivo a UV záření z UV transiluminátoru. Viz obr.4 [13; 15; 16]

*Obr. 4 Nanášení vzorku při horizontální elektroforéze [47]*



Velikost elektrického napětí při elektroforetické separaci se udává jako 5-8 V/cm u agarosového gelu a 1-8 V/cm u polyakrylamidovaného gelu. Dále platí, že s rostoucím elektrickým napětím se fragmenty pohybují rychleji. Když je překročeno vhodné napětí, pak čím je napětí vyšší, tím klesá efektivita separace. Dále při vysokém napětí dochází vlivem tepla k deformaci gelu, což vede k nerovnoměrné separaci. Naopak při velmi nízkém napětí je rychlost separace malá a fragmenty mají tendenci se samovolně rozptylovat do okolí. [13; 15; 16]



## 4.9.2 Centrifugace

Je postup, který využívá odstředivé síly pro dělení látek různé hustoty, zrychluje proces sedimentace částic, která rozděluje částice pouze podle hustoty vlivem gravitačního zrychlení, k tomu centrifugace přidává ještě odstředivé zrychlení. V laboratořích se centrifugace používá k dělení směsí kapalin, odstranění sraženin, izolaci nebo odstranění buněk a k frakcionaci makromolekul podle hustoty. [2; 17; 18; 19]

Odstředivá síla je setrvačná síla, která vzniká při pohybu po kružnici. Vzniká jako reakce na sílu dostředivou, kdy se těleso pokouší setrvávat v přímočarém pohybu.

Vzorec:  $F = m \times \omega^2 \times r$

- kde  $m$  je hmotnost částic vzorku v [kg],  $\omega$  je úhlová rychlost v [ $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ],  $r$  je poloměr od středu hřídele rotoru v [m]. [20]

Relativní centrifugační síla je vyjádřena poměrem mezi centrifugačním a tíhovým zrychlením. Tedy kolikrát je centrifugační zrychlení vyšší, než tíhové zrychlení, udává se v násobcích  $g$  (je bezrozměrné).

$R_{cf} = \frac{r \times \omega^2}{g}$ , pak lze odvodit, že  $R_{cf}$  závisí na poloměru rotoru centrifugy a počtu otáček:

$$R_{cf} = 1,117 \times n^2 \times r \times 10^{-5}$$

- kde  $n$  je počet otáček rotoru v [ $\text{min}^{-1}$ ],  $r$  je poloměr rotoru v [cm]. [17; 21]

Centrifuga je přístroj, který pomocí odstředivé síly zvyšuje přetížení v kyvetě (ukládací prostor pro vzorek např. zkumavka). Podle frekvence otáčení, konstrukce a účelu se centrifugy dělí na nízko, středně a vysokootáčkové. Frekvence otáčení se u prvních dvou typů pohybuje 5 000-25 000 ot/min, u vysokootáčkových se dosahuje hodnot 100 000 ot/min a více, tento typ se také označuje jako Ultracentrifuga. Jsou speciálně vyrobeny pro separaci velmi malých částic, jejich rotor se pohybuje ve vakuu, čímž je omezeno tření o vzduch a nárůst teploty. Součásti ultracentrifug musejí odolávat velkým silám, a proto jsou velmi náročné na výrobu a použitou technologii. [2; 17; 18; 19]

Podle konstrukce rotoru se dělí na výkyvné a úhlové rotory (viz obr. 5). Výkyvné rotory se hodí pro menší otáčky. Kyvety jsou volně uloženy v čepech ve vertikální poloze, s rostoucí rychlostí otáček se zvětšuje úhel, při maximální rychlosti se kyvety dostanou do horizontální polohy, což umožňuje lepší separaci, díky velké odstředivé síle, ale vzniká i velké tření.

Úhlové rotory mají pevně daný úhel (15-45°), jsou masivnější konstrukce, dosahují většího počtu otáček a kratší doby dělení vzorků. [2; 17; 18; 19]

Obr. 5 Centrifuga Spectrafuge 6C s úhlovým rotorem [48]



Je potřeba, aby byl rotor při centrifugaci vyvážený. Odstředivé síly, které jsou vytvářeny jednotlivými vzorky na hřídel rotoru, je třeba vzájemně vyrušit. Proto se vzorky do rotoru vkládají tak, aby naproti sobě byly dvě stejně těžké kyvety se vzorky. Čím se dosahuje větší rychlosti otáček, tím více je dbáno na přesné vyvážení rotoru. U nízkootáčkových centrifug stačí, když použité kyvety jsou stejného typu. [2; 17; 18; 19]

Když je prováděna ultracentrifugace, tak jednotlivé kyvety jsou váženy, objem vzorku se pak dále upravuje, aby protilehlé kyvety měly totožnou hmotnost.

Při vysokých otáčkách může dojít ke zvýšení teploty vzorku, díky tření o vzduch. Většina biologických vzorků se zpracovává při nižších teplotách. Proto se rozdělují centrifugy také podle regulace teploty na nechlazené, chlazené nebo s možností mražení. Dále podle kapacity na stolní s objemem v ml a na samostatně stojící, které pojmu až několik litrů. [2; 17; 18; 19]

### **Diferenciální centrifugace**

Centrifugace se provádí v homogenním médiu s nižší hustotou, než mají sedimentující částice. Během centrifugace podle své velikosti sedimentují částice různou rychlostí, nejtěžší částice pak sedimentují na dno kyvety a lehčí částice zůstanou v médiu (roztok). Diferenciální centrifugace se využívá k odstranění buněk, k oddělení sraženin a při odstranění různých částic z homogenátu. [17; 21]

## **Izopyknická centrifugace v hustotním gradientu**

V tomto postupu se dosahuje rozdělení částic pomocí hustotního gradientu naneseného ve vrstvách v kyvetě. Centrifugace probíhá na principu rozdílné hustoty částic, nezávisle na jejich ostatních vlastnostech. Využívá se prostředí o menší hustotě, tedy hustotní gradient. Hustota gradientu přibývá od horního okraje kyvety ke dnu. Na začátku centrifugace jsou částice kumulovány k hornímu okraji, vlivem centrifugace se dostávají do oblasti, v níž se její hustota shoduje s hustotou částic, místo se nazývá izopyknickým bodem. Dosažení rovnovážné polohy rozložení částic vyžaduje více času, než u diferenciální centrifugace, v řádu 30h a více. [17; 21]

Ke vzniku hustotního gradientu se používají roztoky sacharózy, polymerů a solné roztoky. Využívají se dva typy hustotních gradientů, diskontinuální a kontinuální (krokový). Diskontinuální je tvořen několika různě hustými vrstvami. Rozdělované částice různých hustot se soustředí k hranici mezi dvěma vrstvami. U kontinuálního gradientu je změna hustoty postupná v celé kyvetě. Gradient pak může být připraven lineárně, konvexně nebo konkávně. Metoda hustotního gradientu se dále využívá k dělení makromolekulárních částic, např. bílkovin a nukleových kyselin. [17; 21]

## **4.10 PCR**

Polymerázová řetězová reakce (neboli PCR - Polymerase Chain Reaction) je metodou kopírování (množení) vybraného úseku DNA. Princip PCR je v opakované denaturaci DNA a následné renaturaci osamělých řetězců se specifickými oligonukleotidy, ty lze nalézt v reakční směsi. Oligonukleotidy slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA, jsou to fragmenty DNA (o 20-25 nukleotidech), které se díky svému složení připojují právě ke koncům vybraného úseku. K zahájení reakce jsou potřeba dva primery, které se připojují k doplňujícím úsekům protilehlých řetězců DNA. Primery také vymezují úsek DNA, který bude amplifikován (rozšířen). [13; 22; 23]

Reakční směs se skládá z:

- templátové DNA – izolát z bioptických vzorků, stěrů, buněk tkáňových struktur nebo tělních tekutin
- synteticky připravených primerů
- směsi nukleotidů dNTP – (deoxyribonukleosidtrifosfáty)
- termostabilní DNA polymerázy – získaná z termofilní bakterie

Reakční směs se nanese do zkumavky, ta se pak vloží do termocykleru (thermocycler), kde probíhají teplotní cykly. Jednotlivé cykly mají 3 fáze, při kterých se střídají teploty. Cykly se několikrát opakují, obvykle 20 až 30 krát. Viz obr. 6 [13; 22; 23]

Obr. 6 Termocykler [49]

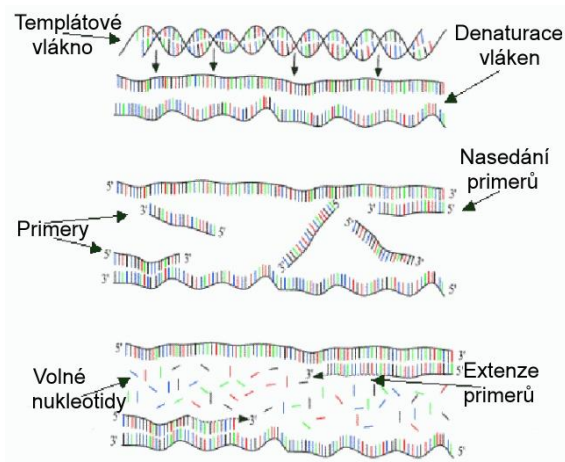


První fáze je Denaturace. Molekula DNA se po dobu 20-30s zahřívá na teplotu mezi 94 až 98 °C. Když se molekula ohřeje na požadovanou teplotu, dochází v ní k rozpuštění vodíkových můstků a k uvolnění dvoušroubovice. Vznikají tedy dvě samostatná vlákna molekuly DNA. [13; 22; 23]

Druhá fáze Anelace (připojení primerů) probíhá při snížení teploty na 60 až 50 °C, to umožňuje připojení primerů na specifická místa vláken DNA. Teplota, při které připojování probíhá je velmi důležitá pro finální výsledek, musí být vhodně nastavena pro daný pár primerů. Pokud je teplota příliš nízká mohou se primery připojovat k jiným, než zvoleným úsekům a vznikne nespecifický produkt. Naopak když je teplota až moc vysoká, primery se hůře připojují. Fáze trvá v rozmezí 30-90s. [13; 22; 23]

Třetí fáze je Elongace (Extenze). Teplota při této fázi závisí na použité DNA polymeráze, pohybuje se mezi 60-80 °C a trvá 45-90s. Primery, které dosedly na vlákna DNA v předchozím kroku, složí teď k prodloužení vláken pomocí polymerázy DNA, která kopíruje vlákna DNA. Nově syntetizované řetězce se využívají jako templáty v dalších cyklech. Viz obr. 7 [13; 22; 23]

Obr. 7 PCR postup jednotlivých fází [50]



Tyto fáze se po sobě několikrát opakují. Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA zdvojnásobí. V dalších cyklech může jako templát sloužit již vytvořené řetězce, při opakování bude množství vytvořených řetězců exponenciálně vzrůstat. Tedy výhodou PCR je, že metoda potřebuje malé množství DNA a procesem opakování jednotlivých cyklů vznikne až  $10^9$  kopií (po 30 opakováních). Po jednotlivých opakováních se vyčerpávají určité složky v reakcích. Při určitém počtu opakování se dosáhne maximální koncentrace roztoku, dále se kopie nemnoží. [13; 22; 23]

Kromě opakujících se cyklů jsou ještě dvě fáze, které se neopakují. Počáteční denaturace slouží k dostatečnému prohřátí roztoku po dobu 2-5 min, po ní následují opakující se cykly. Když skončí opakování, přichází na řadu závěrečná extence. Ta pomáhá dosyntetizovat jednotlivé řetězce, které nedosáhly plné syntetizace ve třetí fázi, při teplotě 72 °C po dobu 5 min. [13; 22; 23]

Výsledný roztok se nazývá amplifikát, který lze analyzovat pomocí velikosti produktu gelovou elektroforézou, štěpením restričních enzymů, hybridizací se značenou sondou nebo stanovení sekvence DNA. [13; 22; 23]

PCR se využívá k základním výzkumům, aplikovaným genetickým výzkumům, v klinických disciplínách, archeologii, kriminalistice (identifikace), v soudním lékařství, v potravinářském průmyslu a dalších vědních oborech (zoologie, botanika, mikrobiologie, parazitologie). [13; 22; 23]

## 4.11 Sekvenace DNA

Sekvenování DNA je název pro biochemické metody, které určují sekvence nukleotidů v molekule DNA, neboli zjišťování pořadí nukleových bází (A, C, G, T). Sekvenační metody lze rozdělit na klasické a na metody nové generace. Mezi klasické patří Maxam-Gilbertova metoda a hlavně Sangerova metoda, která se v menších úpravách používá i dnes. Metody nové generace se začali vyvíjet v posledních dvaceti letech. Jedná se o řadu technologií, které předcházejí v několika ohledech klasické metody, zejména v rychlosti stanovení výsledků a cenové náročnosti, která je menší, bez ohledu na počet analyzovaných vzorků najednou. Patří k nim například Pyrosekvenování, 454 sekvenování, Illumina (Solexa), ABI SOLiD, Helicos HeliScope a další. [2; 24; 25]

### 4.11.1 Sangerova metoda

Metoda využívá modifikovanou PCR k syntéze kopií DNA, kde je použit pouze jeden primer. Ten se váže na jeden řetězec (vlákno) DNA a kopie molekul DNA nepřibývají exponenciálně. Kromě dNTP (deoxynukleosidtrifosfátů) jsou v metodě použity i ddNTP (dideoxynukleosidtrifosfáty), které nemají hydroxylovou skupinu, na ní by mohl navázat další nukleotid v novém řetězci. Z toho lze usoudit, že ddNTP zastávají funkce terminátorů syntézy. Samotná syntéza DNA se provádí ve čtyřech zkumavkách, přičemž každá obsahuje jiný ddNTP (A, T, G nebo C). Výsledkem sekvenování DNA je směs různě dlouhých úseků, které začínají primerem a jsou zakončeny jedním ddNTP. K přečtení pořadí nukleotidů je třeba gelové elektroforézy, která rozdělí fragmenty DNA podle velikosti. [13; 26]

Automatické sekvenování je modifikací Sangerovi metody, kdy se využívá fluorescenčně značených ddNTP (každá nese jinou barvu), to umožňuje provádět syntézu v jedné zkumavce. Ke stanovení pořadí nukleotidů se používá sekvenátor. Detekce je prováděna prostřednictvím kapilární elektroforézy, pomocí laserového detektoru připojeného k počítači. Elektroforéza probíhá uvnitř tenké kapiláry s gelem. Přes kapiláru prochází různě dlouhé řetězce podle jejich velikosti. Laser detekuje fluorescenci jednotlivých ddNTP připojených k řetězcům, a tím je stanoveno pořadí nukleotidů, je získán výsledný sekvenogram. [13; 26]

Sekvenování DNA má řadu využití v kriminalistice a forenzní vědě při testování paternity či stanovení viny u podezření z trestného činu. Dále má aplikaci v medicíně, zemědělství a dalších oblastech. [13; 26]

### 4.11.2 Sekvenování nové generace

Technologie sekvenování DNA dosáhla během posledních let značného posunu vpřed díky novým sekvenátorům, s označením druhé generace. První generace sekvenátorů analyzovala báze DNA po sobě v řadě, zatímco druhá generace umožňuje masivní paralelní sekvenaci až tisíců molekul DNA současně. Pro porovnání, dříve určování sekvence prvního lidského genomu trvalo zhruba 10 let. Dnešní nové technologie umožňují určit sekvenci genomu nebo vybraných částí za mnohem kratší čas, řády dnů a týdnů. V současné době dominují trhu tři platformy: Roche 454 Genome Sequencer, Illumina Genome Analyzer a Life Technologies SOLiD System. Byly vyvinuty na konci 90. let 20. století, na trh se dostaly okolo roku 2005. Každá technologie má své přednosti nebo nevýhody a můžou se hodit jen k určitým aplikacím. I když technologie druhé generace (také označovány jako NGS – next generation sequencing) používají rozdílnou chemii, všechny se drží podobného postupu. Za prvé přípravy templátu DNA, dále sekvenování a detekce inkorporovaných (včleněných) nukleotidů a nakonec analýza dat. Unikátní kombinace přístrojů, které řečí jednotlivé kroky sekvenačního procesu, určuje rozdíly mezi technologiemi a typem produkovaných dat, případně množství dat. Při porovnávání stejné sekvence, se liší výstupní data podle platformy. Všichni výrobci udávají přesnost a kvalitu čtení sekvencí, ale nikde není stanoveno, že kvalita čtení v porovnání mezi platformami je ekvivalentní. NGS technologie lze rozdělit do dvou kategorií. První představují technologie založené na PCR amplifikaci templátu a druhé tvoří technologie tzv. single-molecule sequencing, neboli nedochází k amplifikačnímu kroku před vlastní sekvenací. [27; 28]

#### 454 (Roche)

Technologie využívá metodu pyrosekvenování, která jde zjednodušeně popsat jako souhrn enzymatických reakcí, při kterých se jednotlivé báze začleňují do nově vzniklých řetězců DNA, přičemž dochází k emisi viditelného světla. Podle počtu začleněných nukleotidů se uvolňuje určité množství světla. Proces začíná fragmentací DNA na úseky, DNA se rozděluje na dvouřetězcové fragmenty, ke kterým se připojují koncové adaptory (A a B), sloužící k purifikaci a k vlastní sekvenaci v dalších krocích. Pomocí vlastností adaptéru B se fragmenty znehybní na speciálních kuličkách, každá nese jeden fragment. Dvouřetězcové fragmenty se obtočí kolem magnetických kuliček a jsou denaturovány, pak se řetězce uvolní. Vzniklé jednovláknové fragmenty jsou připraveny na hybridizaci, pomocí kuliček, které na svém povrchu mají sekvenci DNA využívanou jako primer. Jednotlivé kuličky jsou ponořeny

do olejové emulze (PCR) s vodou, vznikne kolem nich obal, kde probíhá klonální amplifikace fragmentu. Po skončení reakce jsou kuličky vyzvednuty z emulze a každá nese v průměru 10 milionů totožných kopií z původní DNA. Následuje tzv. obohacení, kdy se vyberou kuličky jen s amplifikovanou DNA a ostatní se vyloučí. Na obohacené kuličky se přichytí sekvenční primer a dále se kuličky uloží do jamek pikotitrační destičky, jamky jsou vždy jen pro jednu kuličku. Destička je rozdělena do čtyř vrstev, které se za pomoci centrifugace postupně zaplní dalšími druhy kuliček, důležitých pro pyrosekvenční reakci. Pro reakci jsou klíčové jednotlivé kuličky s enzymy sulfurylázy, luciferázy, apyrázy a DNA polymerázy. Na destičku se postupně aplikuje roztok s nukleotidy. Pokud se nukleotid začlení do vznikajícího řetězce, dochází k sérii enzymatických reakcí, ty vyvolají luminiscenci. Neboli vzniká produkce ATP pomocí ATP sulfurylázy a přítomnosti fosfosulfátu. ATP umožní konverzi luciferinu na oxyluciferin. Při této reakci vzniká viditelné světlo, které je zachyceno CCD čipem (detektorem). Pomocí apyrázy jsou odstraněny nespoteřované nukleotidy a ATP. Tento proces se cyklicky opakuje s dalšími nukleotidy a jednotlivé sekvence jsou zaznamenávány do pyrogramu. [27; 29]

Výchozí data jsou zpracovávána 454 pyrosekvenčním softwarem a analyzována potřebnými filtry kvality, které odstraní sekvenci s nízkou kvalitou. Pro analýzu dat slouží bioinformatické nástroje. Příkladem může být sekvenátor GS FLY Titanium chemistry, ten poskytuje až milión čtení sekvencí, dlouhých až 1000 bází. Dělají se menší stolní sekvenátory s nižší kapacitou. [27; 29]

I tato metoda má své výhody i nevýhody, její největší problémy jsou v detekci homopolymerních úseku (např. AAA a GGG). U procesu inkorporace závidí počet začleněných nukleotidů pouze na množství vyzářeného světla. Dochází tedy k větším chybovosti v určení počtu, problém se částečně řeší za pomoci programů, které dokážou rozlišovat a filtrovat chybové sekvence. Další nevýhodou je vysoká cena používaných chemikálií. Naopak při srovnání technologie 454 s ostatními poskytuje dlouhá čtení a je velice rychlá, stačí pouhých 10h pro kompletaci celého sekvenčního procesu. [27; 29]

### **Solexa (Illumina)**

Metoda se objevila na trhu v roce 2006 jako produkt formy Solexa, posléze ji odkoupila firma Illumina. Technologie pracuje s templátovanou DNA, která hybridizuje na opticky zřetelný pevný povrch (tzv. flow cell) a využívá chemicky modifikovaných nukleotidů. [27; 30]



V prvním kroku se DNA fragmentuje na úseky o velikosti 200 bp (bází). Konce fragmentů jsou zarovnány, fosforylovány a na 3' konci adenylovány, pak jsou k nim upevněny adaptéry. Po denaturaci se vloží jednotlivé fragmenty do reakční komůrky, kde jsou hybridizovány. Povrch komůrek je hustě pokryt oligonukleotidy, které se doplňují s použitými adaptéry. Konce fragmentů jsou imobilizovány na povrchu reakční komůrky, kde posléze probíhá amplifikace. Dále se přidává směs reagensů, které jsou nezbytné pro PCR, adaptory na povrchu slouží jako primery pro syntézu dvlouřetězcové DNA. Vzniklé molekuly DNA se denaturují na jednořetězcové molekuly. Původní fragmenty jsou vymyty pryč a v komůrce zůstává jen nově syntetizované vlákno, to je kovalentně vázáno na povrch komůrky. Volný konec vlákna hybridizuje k primerům. Vlákno se ohne a dochází k přemostění. V dalším PCR cyklu se vytvoří dvouvláknový most, za pomoci polymerázy, která prodlouží primer. Celý proces je cyklicky opakován a nakonec jsou denaturovány dvouvláknové mosty, nepotřebné řetězce odštěpeny a vymyty. Zůstávají pouze klastry tvořené cca 1 000 totožnými kopiemi DNA fragmentů. K adaptorovým sekvencím jsou hybridizovány sekvenační primery a ke klastrům v reakční komůrce je nalita směs polymerázy se čtyřmi rozdílně fluorescenčně značenými nukleotidy, které mají chemicky neutralizovanou OH skupinu. Tím je zaručeno, že v jednom cyklu je začleněn pouze jeden nukleotid. Jakmile se nukleotid začlení do řetězce DNA, hned je zaznamenána jeho pozice a typ, díky fluorescenční značce, kterou detekuje CCD kamera. Skupina na 3' konci nukleotidu s fluorescenční barvou je odstraněna a cyklus se opakuje. [27; 30]

Speciální algoritmus přiděluje jednotlivým bázím určitou hodnotu, podle ní se vyřadí sekvence s nízkou kvalitou. Algoritmus je generován pro každou sekvenci klastru. První model sekvenátoru společnosti Illumina dokázal přečíst sekvenci o délce 35 bází a generoval 1 Gb dat za jeden sekvenační proces, který trval 2 až 3 dny. V současnosti jsou dostupné přístroje s různou výkoností a vyrábí se i sekvenátory pro malé laboratoře, k sekvenování malých genomů. Přístroje firmy Illumina jsou omezeny relativně krátkou délkou čtení sekvencí v závislosti na typu přístroje. Omezení je dáno zvýšenou nebo sníženou schopností nukleotidu se začlenit a selháním při přidávání nebo odebrání ukončovací skupiny, což způsobuje nedostatečné ukončení vlákna. Proto nejčastější chybou při dlouhém čtení bývá záměna nukleotidu. Další nevýhodou je nerovnoměrné pokrytí v oblastech s vysokou koncentrací AT a GC sekvencí. Metoda podle Illuminy v porovnání se Sangerovou metodou je schopna produkovat více dat za méně času i peněz, za cenu větší chybovosti, která vede k nesprávné pozitivitě při identifikaci sekvenačních vzorků. Ovšem díky velmi vysoké

výkonosti, kapacitě a cenové hospodárnosti provozu jsou sekvenátory Illumina hodně využívány k většině celogenomových i resekvenačních aplikacím. [27; 30]

## **SOLiD**

Platforma SOLiD (sequencing by oligonucleotide ligation and detection) byla vytvořena společností Applied Biosystems (dnešní Life Technologies). Na rozdíl od předchozích dvou platforem je SOLiD založena na sekvenování ligací. DNA vzorek se připravuje pomocí emPCR a k jednotlivým fragmentům DNA se připojí adaptory, které se doplňují s nepohyblivými adaptory na povrchu magnetických kuliček. Po amplifikaci se kuličky přidají na sklíčko se speciální úpravou povrchu, to se dále vloží do kazety umožňující potřebný průtok. Proces využívá 8 nukleotidů dlouhé sondy. Sekvence prvních dvou bází je u sond známa, samotné sondy jsou označeny jednou ze čtyř fluorescenčních barev. Jednotlivé barvy představují 4 z 16 možných dinukleotidových sekvencí. Metoda zaručí přečtení každého nukleotidu dvakrát. V porovnání s ostatními platformami NGS má SOLiD nejmenší chybovost. Nejčastější typ chyby je záměna nukleotidu. Dnes jsou na trhu dvě varianty SOLiD sekvenátorů: 5500 a 5500xl System. [27]

Je obtížné si vybrat jednu z nabízených platforem na trhu jako optimální. Ze třech více uvedených NGS technologií Illumina generuje nejvíce dat za nejnižší cenu, Roche 454 umožňuje největší délku čtení a SOLiD je nejvíce přesný. [27]

## **Iont Torrent (Life technologies)**

V roce 2010 byl představen přístroj zvaný jako Ion Personal Genome Machine (PGM) firmou Life Technologies. Přístroj je založen na nové technologii, která umožňuje přímo převádět chemický signál do digitální podoby. Využívá se detekce vodíkových protonů uvolněných při syntéze, kdy vzniká řetězec katalyzovaného DNA polymerázou, namísto optické detekce jednotlivých nukleotidů. Na polovodičovém čipu probíhá proces. Povrch čipu je pokryt mikrojamkami, pod kterými se nachází vrstva citlivá na ionty. Při začlenění nukleotidu se uvolní vodík, tím dojde ke změně pH, změnu zaznamená detektor. K přípravě vzorku se také využívá emPCR. Kuličky, které obsahují templát, jsou umístěny na čip tak, aby jedna molekula DNA byla v každé jamce. Dále je čip zaplavován jednotlivými druhy nukleotidů, tím začne probíhat syntéza DNA. Pokud nukleotid není správně začleněn, detektor zaznamená nulový signál. Pokud se začlení dva nukleotidy, signál se zdvojnásobí. Jeden sekvenční běh méně než 2h, protože se nepoužívá detekce fluorescence. Metoda je

jednoduchá, rychlá a levná. Podle hustoty jamek na čipu, lze produkovat určité množství dat. V roce 2012 byla vyvinuta nová generace polovodičového sekvenátoru s velkou kapacitou čipu. [27]

### **Technologie single-molecule sekvenování**

Tato technologie přináší výraznou změnu ve vývoji nových sekvenačních metod, někdy je označována jako třetí generace sekventování. Nepoužívá amplifikační přípravu před samotnou sekvenací, což zkracuje dobu procesu, snižuje náklady, snižuje chybovost, která mohla nastat při amplifikaci, umožňuje vyšší flexibilitu v délce čtení a přesnější kvantifikaci DNA molekul, díky zaznamenávání signálu v reálném čase. [27; 31]

První tuto technologii využívala platforma Helicos Genetic Analysis System. Je zapotřebí jednovláknová DNA, která je neuspořádaně uložena na plochou destičku. Destičku v každém sekvenačním cyklu zaplavuje DNA polymeráza a jeden ze čtyř fluorescenčně značených nukleotidů, vyzařovaný signál je detekován CCD kamerou. Následuje omytí destičky, tím se odstraní fluorescenční značky a krok prodlužování řetězce se znovu opakuje. Technologie se v současné době nijak neupravuje ani nevyvíjí. [27; 31]

Další nová technologie SMRT (single-molecule real-time) byla vyvinuta společností Pacific Bioscience. Zde je využita nanotechnologie na destičkách, které mají až 10 000 jamek o průměru 10 nm. Při sekvenačním procesu se vlákno syntetizuje za pomoci DNA polymerázy, která je ukotvena vždy ke dvěma jamkám. Fosfátová skupina nukleotidu je označena fluorescenční značkou, tedy při jeho začleňování se uvolní záblesk světla. Pro proces začleňování a uvolňování fluorescence je potřeba určitá doba, čehož se využito při určení typu báze. Ke zrychlení sekvenování také přispívá, že není zapotřebí opakovaného promývání při začleňování jednotlivých typů nukleotidů. Metoda se využívá zejména v projektech na malých prokaryotických i eukaryotických genomech, díky možnosti sekvenovat dlouhé úseky (průměrná délka 4000 bází). [27; 31]

Příkladem dalšího využití nanotechnologie v NGS je nanopore sequencing. Technologie využívá biologických vlastností nanopóru. Nanopóry se nacházejí v membránách u proteinových kanálků, kde dovalují výměnu iontů. Protéká před ně konstantní proud. Jednovláknová molekula DNA prochází nanopórem a jednotlivé nukleotidy jsou detekovány. Pro každý typ nukleotidu je předem daná modulace proudu. Technologie nanopóru nabízí mnoho výhod oproti stávajícím platformám. Je možné neustále opakovat sekvenování stejné

molekuly, přičemž jednotlivá čtení mají délku až desítky kilobází. Ostatní technologie bez využití nanopóru jsou většinou komplikované. Vyžadují izolaci DNA, značení i její namnožení, separování fragmentů, které je pak třeba několikrát sekvenovat. Ale i použití nanopóru má své problémy, které jsou třeba vyřešit, než bude princip aplikován v sekvenátoru. DNA je přemísťována skrz nanopór velkou rychlostí, kdy vzniká problém s rozpoznáním signálu nukleotidu od okolních signálů. V roce 2013 byly publikovány práce, které se zabývaly tímto problémem. Bylo zjištěno, že působením světla o určité vlnové délce, je možno zpomalit průtok DNA skrz nanopór. Technologie prošla různými úpravami, které docílily lepšího rozlišení i stability nanopóru. Firma Oxford Nanopore ohlásila příchod prvního sekvenátoru GridION Systém, který má za cíl přečtení celého lidského genomu v 15 minutách. Dále oznámili miniaturizovanou verzi sekvenátoru, který se vejde do kapsy. MinION má být kapesní, přenosné zařízení, které disponuje až 512 nanopórovými kanálky, analýzou vzorku v reálném čase do 10 minut a adaptabilní k přímému sekvenování DNA nebo RNA. Nyní už jsou oba přístroje komerčně dostupné a lze je objednat na stránkách firmy. Základní sada MinION stojí 1 000 \$. [27; 31]

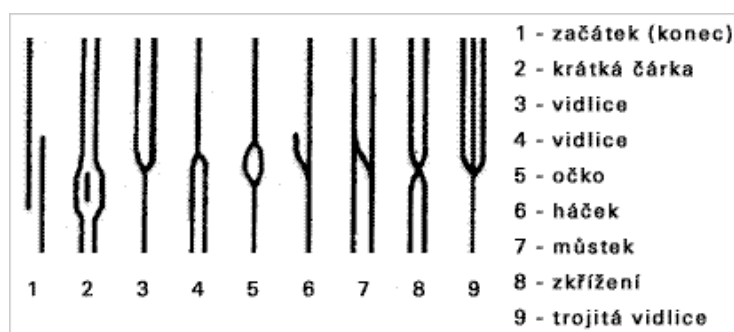
## 4.12 Daktyloskopie

Daktyloskopie je jedna z nejstarších metod v kriminalistice, která se zabývá identifikací osob. Základ vychází z fyziologických vlastností kůže člověka. Na dlaňové straně ruky a plochách chodidel se vytvářejí papilární linie, sloužící k hmatovým a uchopovacím vlastnostem končetin. Jedná se o vyvýšené části pokožky, vysoké 0,1-0,4 mm a široké 0,2-0,7 mm. Jednotlivé části vytvářejí společně daktyloskopické obrazce, které slouží k identifikaci. [1; 32]

Papilární obrazce mají své zákonitosti. Na světě nejsou dva jedinci se shodnými obrázky papilárních linií. Obrazce setrvávají v čase takřka neměnné. Lilie jsou neodstranitelné, pokud s nimi není odstraněna i zárodečná vrstva kůže. [1; 32]

Jednotlivé linie se navzájem kříží, mění směr, rozvětvují se a spojí, přerušují atd., viz obr. 9. Markant je změna v průběhu papilární linie, která se dá odlišit od ostatních. Podle tvaru, umístění a vzdálenosti markantů se vyhledávají shody otisků, viz obr. 8. [1; 32]

Obr. 8 Drudy markantů [32]













V kriminalistice je to levná a poměrně spolehlivá metoda identifikace osob. Využívá se nejen k identifikaci pachatelů, ale i na identifikaci neznámých těl. Člověk zanechává daktyloskopické stopy díky potu, který trvale pokrývá dlaně. Při uchopení nebo dotyku s materiálem, pot vytvoří zrcadlový obraz papilárních linií. Vzniklá stopa lze zviditelnit za pomoci fyzikální nebo chemické metody. Fyzikální metoda využívá lepkavého charakteru potu, kdy na stopě zůstanou jemné práškové hmoty, které stopu zviditelní. Chemická metoda je založena na reakci mezi potem a chemikálií, po které vznikne barevná látka. Z obou metod je fyzikální lépe využitelnější a také se více používá. [1; 32]

Rozlišují se stopy podle způsobu zanechání:

- objemová stopa – otisk způsobí deformaci předmětu (vosk, plastelína, ...)
- odvrstvená stopa – na pokožku je přenesena látka z povrchu předmětu (barvivo, krev, stopy v prachu)
- navrstvená stopa – na předmět se nanese látka, která se dříve zachytila na kůži (barva, prach, krev)
- latentní stopa – neviditelná stopa tvořena potem nebo jinou chemickou látkou

[1; 32]

Obr. 9 Daktyloskopické vzorky [51]

1		oblouk	6		zahnutá smyčka vlevo i vpravo
2		otevřená smyčka vlevo	7		dvoudeltový kruhový vzor
3		otevřená smyčka vpravo	8		dvoudeltový oválný vzor
4		uzavřená smyčka vlevo	9		dvoudeltový dvousmyčkový vzor
5		uzavřená smyčka vpravo	10		nepravidelný vícedeltový vzor

#### 4.12.1 Postup získávání stop

Při zajištění stop na místě činu je prvně třeba je zviditelnit. Viditelné stopy stačí vyfotografovat a dále zajisti originální stopu. U neviditelných (latentních) stop se nejčastěji využívá daktyloskopické prášky a ninhydrin. Dále kyanoakrylátové páry nebo DFO nebo technologie využívající luminiscenci a zvyšování kontrastu stopy. Zajištění stop probíhá většinou jejich fotografováním za využití úzkopásmových filtrů a potřebného zdroje světla. Stopy, které byly zviditelněné za pomoci prášku, se snímají na daktyloskopické fólii. Následuje fixace stop, kdy se jednotlivé stopy a fólie označují a zasílají k provedení daktyloskopické expertizy. [33]

Pokud je brán otisk přímo od osoby, je nutné, aby si před tím pečlivě umyl a osušil ruce, díky tomu je získaný otisk lépe čitelný a bez případných nečistit. Pro získání samotného otisku se využívá daktyloskopická čerň (barvivo), která se nanese na pokožku. Pak se prst přiloží na daktyloskopickou kartu a obtiskem prstu se vytvoří požadovaný vzorek. V dnešní době se už více využívá digitální sejmutí otisku pomocí livescanerů, u kterých se dále vytiskne karta s otisky prstů a otisknou se na ní i celé dlaně, které slouží na porovnání dlouhých čar. [34]

#### 4.13 Daktyloskopická expertiza

Provádí se porovnáním dvou vzorků otisků, kdy jedny jsou podezřelé osoby a druhé zajištěné otisky z místa činu. Zjišťuje se shodnost jednotlivých znaků, markant a shodnost jejich orientace. Dříve porovnání prováděli samotní lidé, ale dnes lidem pomáhá technika, tedy speciální programy, které vyhledávají v databázi podobné vzorky. Nakonec je stejně

potřeba, aby finální shodu vzorků určil člověk. Využit může další software, který zobrazí vzorky vedle sebe digitálně na monitoru nebo lze využít i klasický daktyloskopický komparátor. Přístroj, který je opatřen dvěma zobrazovacími kanály na principu epiprojekce, tedy zvětšuje obraz od předlohy cca 6 krát. Pokud bude stanovena shoda mezi vzorky, nesmí tím pádem existovat žádná nevysvětlitelná odlišnost v porovnávání. [35]

#### **4.13.1 Moderní využití otisků prstů**

Otisk prstu je dnes využívám jako moderní a progresivní metoda sběru personálních dat a ochrany proti neoprávněnému vstupu. Snímáním a porovnáváním otisku jednoho či více prstů určité osoby, je zaručena její nezaměnitelnost a nezpochybnitelnost, protože každá osoba má unikátní otisk prstu. Metoda se rozšířila, díky tomu, že nabízí vysokou účinnost a jednoduchost. [36; 37]

Po přiložení prstu ke čtečce, se vytvoří datová šablona s načteným otiskem. Šablona zaručuje bezpečné uložení otisku pro potřeby systému. Načtený otisk nelze zpětně zobrazit, tím nehrozí případné zneužití. Zařízení do jisté míry tedy zajišťuje bezpečnost osobních údajů. Při identifikaci se porovnávají klíčové znaky načtené šablony se šablonami v databázi a vyhodnocuje se shoda. Pokud je shoda potvrzena, tak je osoba jednoznačně rozpoznána. Když je vyžadován vyšší stupeň zabezpečení, lze k identifikaci přidat potvrzovací PIN. [36; 37]

U biometrických systémů odpadá používání identifikačních karet nebo čipů. Další výhodou otisku prstů je, že je stále dostupný a nehrozí jeho zapomenutí nebo záměna. Doba načtení a vyhodnocení po přiložení prstu, se pohybuje kolem 1s i méně, přičemž není nutný stálý kontakt prstu se snímačem. Pro samotnou identifikaci může být využit libovolný prst, popřípadě u jedné osoby uložit více prstů sloužících k identifikaci. Načtené šablony jednotlivých prstů jsou uloženy do databáze a přiřazeny konkrétním osobám. Veškerá správa šablon se ukládá přímo do docházkového nebo přístupového systému, kde je otisk zpracováván podobně jako karta. [36; 37]

Kromě firem, které tuto technologii využívají k identifikaci a umožnění přístupu svým zaměstnancům, se tato technologie začala využívat u mobilů a notebooků. Jako první dovolila zabezpečit přístup do telefonu pomocí otisku prstu firma Apple, po ní následovaly i ostatní firmy. Ze začátku se vývojáři obávali o praktickou využitelnost zabezpečení, protože se otisky vyskytují všude a lze je zneužít. Ale postupem času bylo prokázáno, že otisk prstu nabízí mnohem silnější zabezpečení, než třeba většina využívaných, jednoduchých hesel nebo případné pohyby prstů. [36; 37]

## 5 Praktická část práce

Praktická část se věnuje identifikaci jedince, která je prováděna metodou podle DNA nebo otisků prstů. U metod jsou uvedeny způsoby identifikace. Výsledkem je porovnání jednotlivých metod mezi sebou a vyvést závěr porovnání. Uváděné informace byly konzultovány s plukovníkem J. P., pracovníkem v oboru a vedoucím práce, uvedené osoby si nepřejí být zmiňovány jmény.

### 5.1 Analýza DNA v praxi

Po získání vzorků DNA, ať už z místa činu nebo odběrem, je pro identifikaci nutné provést analýzu DNA, která se provádí v laboratorních podmínkách pomocí různých metod, viz praktická východiska práce. Hlavní výhodou identifikace prostřednictvím analýzy DNA je, že při dodržení všech laboratorních pravidel a vlastnění dostatečného množství srovnávacího materiálu je identifikace prakticky neomylná (uváděná spolehlivost 99,99%). [1]

#### 5.1.1 DNA v kriminalistice

Zásadním hlediskem při odebrání a práci s DNA v kriminalistice jsou zákony, kdy policie nemá právo samovolně odebírat vzorek DNA. Podle zákona č. 273/2008 o Policii ČR, se definuje právo Policie ČR na získávání osobních údajů pro účely budoucí identifikace od osoby obviněné ze spáchání úmyslného trestného činu nebo osoby, které bylo sděleno podezření pro spáchání takového trestného činu, dále osoby ve výkonu trestu a osoby nalezené, po které bylo vyhlášeno pátrání. [10]

#### 5.1.2 Komerční testování DNA

Existují firmy, které se zabývají analýzou DNA pro širokou veřejnost, kdy nejčastěji nabíjí například analýzu v zájmu zjištění otcovství. Níže budou představeny dva zástupci firem, kteří se zabývají analýzou v České republice.

**Firma DDC Czech** se zabývá testováním DNA. Má k dispozici laboratoř s akreditací ISO17025, tudíž musí splňovat určité požadavky jako například kvalifikovaný a zkušený personál. Prochází každoročním ověřováním provedených DNA testů, technologií a interních procesů. Na trhu působí od roku 1995 a specializují se na biologické testy příbuznosti a forenzní analýzu. Firma používá například přístroje GeneAmp® PCR System 9700 a ABI Prism® genetické analyzátoři. [38]



Testy otcovství jsou prováděny ze vzorku slin. Odběr vzorku se provádí ambulantně v Praze, v odběrových místech po celé ČR nebo lze i osobně doma. Pokud je zvolena forma domácího odběru, je po uhrazení analýzy klientovy zaslána univerzální sada, která obsahuje sterilní aplikátory a vše potřebné k odběru a odeslání zpět k analýze. Laboratoř provádí analýzu duplicitně, tedy vzorek je testován dvakrát a pak je ještě potvrzen nezávislým testem. Testy jsou postaveny na detekci a porovnání 16, 20 nebo 25 STR lokusů DNA profilu testovaných osob. Jedná se o plnohodnotné testy s průkazností 99% a vyšší, lze je provádět anonymně, informativně nebo s ověřením identity testovaných osob. Výsledky jsou známy do 3-5 pracovních dnů. [38]

Ceny jednotlivých testů otcovství se liší v počtu testovaných genetických znaků a testovaných osob. Standartní test stojí v základu 2 400 Kč pro otce a jedno dítě, testuje se 16 genetických znaků a případná odběrová sada není v ceně. Cena se zvyšuje při větším počtu testovaných osob (dětí) 1 500 Kč za další osobu a případném testování z nestandardních vzorků za 2 000 – 4 000 Kč, podle vzorku. Lepší test, kdy je testováno 20 genetických znaků vyjde v základu na 3 950 Kč, nyní už je odběrová sada v ceně a cena se zvyšuje totožně jako u předchozího produktu. Nejpřesnější test, kdy je testováno 25 genetických znaků, je nabízen za 5 000 Kč + 1 000 Kč za každou další osobu. [38]

Dalším prováděným testem je neinvazivní test otcovství v těhotenství. K testu je zapotřebí vzorek krve matky a slin případného otce. Odběr se provádí pouze ambulantně. Prenatální testy otcovství jsou založené na detekci a porovnání 2688 markerů DNA plodu a testované osoby. Využívají se molekulárně genetické metody, NGS technologie a proprietární počítačový algoritmus pro statistické výpočty. Od 8. týdne těhotenství je nebuněčná DNA plodu obsažena ve vzorku matčiny krve v dostatečném množství pro analýzu. Dříve není možno test provádět. Testování neohrožuje matku ani nenarozený plod. Samotný odběr trvá kolem 30 minut, před odběrem není potřeba omezovat jídlo ani pití, pak následující analýza zabere 10-12 pracovních dní (při příplacení 6-8). [38]

Ceny prenatálních testů se liší podle stáří těhotenství. Test po 8. týdnu těhotenství stojí 35 900 Kč za matku a otce, potenciální další otec je za příplatek 15 000 Kč a rychlejší vyhotovení testů za 15 000 Kč. Další variantou je test po 12. týdnu těhotenství ve standardu 29 900 Kč + příplatky. [38]

Jsou nabízeny i testy nepřímého příbuzenství od 3 500 Kč a akreditované testy, kde lze ověřit identitu pro státní instituce a soudy, cena se pohybuje od 6 500 Kč, přičemž veškeré

parametry testů je nutné konzultovat s firmou. Hlavně u těchto testů jsou vyžívány nestandardní vzorky jako například nehty, vlasy, sperma a jiné tělní tekutiny. [38]

Veškeré komunikace lze s firmou řešit pomocí telefonu nebo mailem a výsledky testů jsou zasílány elektronicky nebo v tištěných dokumentech. [38]

### **Příklad postupu analýza DNA při testování otcovství:**

K testu je prvotně potřeba vzorek. V laboratoři se ze vzorku izoluje čistá DNA. Dále se v teplotním cyklu vytvoří miliony kopií DNA, pomocí polymerázové řetězové reakce. Získané množství DNA je příliš malé, proto se vytváří kopie, které se využijí k sestavení DNA profilu. PCR kopíruje pouze vybrané úseky, které jsou označeny pomocí primerů. Úseky se od sebe liší délkou, po zjištění délek úseků je získán DNA profil. K změření délek se využívá kapilární elektroforéza, kde se řadí jednotlivé úseky podle velikosti, při průchodu tenkou kapilárou s gelem. Porovnáním profilu otce a dítěte lze získat pravděpodobnost schody v opačném případě lze shodu vyloučit. [39; 40]

**Společnost Genomac** vznikla roku 2001 a zaměřuje se na genetické testování otcovství, identifikace, příbuznosti a analýzy DNA. Nabízí stejné základní testování jako předchozí firma se srovnatelnou cenovou relací. Dále navíc nabízí PGT testy a genealogický test. Preventivně genetický test (PGT) se zaměřuje na dědičné dispozice k výskytu chorob nebo na mutace, díky kterým by mohlo vzniknout onemocnění, jako jsou trombóza, ateroskleróza, cukrovka, karcinom jater a další. Jednotlivé testy a případná léčba se řeší individuálně, se zákazníkem. [39; 40]

Genetické genealogické testy pomáhají historikům při hledání ztracených rodinných stromů a místech jejich původu. Testy jsou nabízeny i veřejnosti, které nabízí vyhledání předků a místa, ze kterých pocházejí nebo příbuznost vašich genů s historickými osobnostmi. Používá se analýza Y-chromozomu a mitochondriální DNA. U mitochondriální DNA se jednotlivé geny přenášejí z matky na potomky, ale jen dcery dále přenášejí mitochondriální DNA. Y-chromozom jde nalézt jen u mužů a dědí se z otce na syna. Těmito způsoby vznikají nekonečná vlákna jednotlivých generací uložených v DNA. Po zaplacení objednávky firma zašle odebírací sadu, jako vzorek slouží klasický ústní výtěr. Poté, co laboratoř dostane vzorky, dále provádí analýzu DNA. Výsledky testování a závěrečné vyhodnocení je zákazníkovi posláno do 4-6 týdnů od přijetí vzorku. Základní test stojí 2 950 Kč, je nabízena ještě rozšířená verze, která testuje více genetických znaků a stojí 4 950 Kč. [39; 40]

## 5.2 Otisk prstu v praxi

Otisk prstu je neustále využíván, protože splňuje základní podmínky kladené na identifikační metody. Je použitelný nezávisle na věku, pohlaví a umožňuje pohodlné, rychlé a jednoznačné srovnání osob. [41]

Kriminalisté sbírají otisky buď na místě činu, nebo přímo podezřelým osobám. Kdy podle §114 trestního řádu je osoba v rámci vyšetřování povinna poskytnout otisk prstu. V případě odmítnutí hrozí pokuta ve výši až 50 000 Kč podle §66 trestního řádu. [41]

V české republice se věnuje daktyloskopii kriminalistický ústav Praha, který je rozdělen na oddělení daktyloskopická identifikace osob a identifikace daktyloskopických stop. [35; 42]

### 5.2.1 Daktyloskopická sada

Sada obsahuje pomůcky využívané při získávání otisků většinou na místě činu. Jednotlivé sady nemusí obsahovat všechny níže uvedené položky. Cena sad se pohybuje od 1 000 Kč více a lze nakoupit části sady samostatně. [43]

**Daktyloskopické prášky** – slouží k zviditelnění stop, rozdělují se na základní (přilnavé k vlhkým a mastným usazeninám, v různých barvách kvůli kontrastu s pozadím), fluorescenční (využití na mnohobarevných površích), magnetické (varianty duální – dvě barvy, fluorescenční), duální (využití na různých typech povrchů), těžké (vhodný v místech, kde je potřeba malé množství prášku), Purpose (s využitím UV světla září zeleně, bez něho se chová normálně), Magnucilai (složen z malých částic, vhodný pro – sklo, plasty, dřevo, keramiku, kov, papírové povrchy, kožešinu a kůži), na lepidlové plochy (aplikace s EZFLO), ve spreji (nepotřebují štětec, vhodné pro otisky bot).

**Štětce** – slouží k nanášení prášku, rozdělují se na základní ploché, velbloudí (z velbloudího vlasu – vezmi jemný a bez zakřivení), Zephyr (se skleněným vláknem), Marabu (z přírodního peří), uhlíkové (uhlíkové vlákna – hladká s nízkou přilnavostí), FACII (štětec s práškem).

**Pásky** – slouží k zajištění stopky zviditelněné práškem, rozdělují se na základní, polyetylenové (pro zakřivené nebo nepravidelné povrchy), želatinové (velmi přizpůsobivá k různým povrchům).

**Fólie** – alternativa pásky, využívají se s pozadím, rozdělují se na převraccí (jedna strana spojená s pozadím), želatinové (zajišťuje prášek, brva černá, bílá a speciální).

**Vícebarevné pozadí** – slouží jako podklad pro fólie a pásky, základní barvy černá a bílá, ale vyrábí se i v ostatních barvách.

Případně fotoaparát a zdroje světla, lupa, pravítko, poznámkový materiál. [43]

## 5.2.2 Daktyloskopická karta

Karta se využívá k zachycení otisků prstů osob prostřednictvím daktyloskopické černi. Je zhotovená z tvrdého papíru a obsahuje potřebné osobní údaje jako nacionále, popis osoby, fotografii a podpis osoby. Jednotlivé obtisky prstů se zaznamenávají do připravených kolonek, viz obr. 10. Zachycují se válené obtisky všech deseti prstů a základní obtisky 8 prstů bez palců. [35; 42]

Obr. 10 Daktyloskopická karta [34]

DAKTYLOSKOPICKÁ KARTA		Příjmení: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx		Datum narození: / /		R. č.:	
Jméno: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx		Speciální příjmení:		Místo narození:			
Národnost:*) xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx		Jméno otce:		Jméno matky (rozhodně příjmení):		Barva očí:	
Pohlaví: muž <input checked="" type="checkbox"/> žena <input type="checkbox"/>		Výška v cm:		Barva vlasů:		Barva pokožky:	
Trvalý pobyt:		P1	P2	P3	P4	P5	
Číslo, datum a místo vydání dokladu totožnosti (CP, pas, aj.):							
Daktyloskopován dne:		L1	L2	L3	L4	L5	
Kde:							
Pro *):							
Ev. číslo foto:							
Podpis daktyloskopujícího:							
Podpis daktyloskopovaného:							
Poznámky:		Levá ruka (kontrolní otisky čtyř prstů)		Kontrolní otisky palců		Pravá ruka (kontrolní otisky čtyř prstů)	
				Levý      Pravý			

\*) Dvačtyřlístek mezikontrolní otisky  
\*) Viz návodový list k straně tenkovrstvé  
\*) Uvádějí se skutečného, pokud se posadí gypstr národnost, a označí uvidět stáří pletě.

MV č. 500

Před samotným snímáním je nutné pečlivě opláchnout ruce identifikovaného. Poté se celá ruka potře daktyloskopickou černí, nanesení se provádí daktyloskopickým válečkem. Následně kriminalista uchopí osobu za ruku a provádí obtisk na kartu. [35; 42]

## 5.3 Závěrečné zhodnocení

Pro porovnání byly vybrány identifikační metody podle otisku prstu a DNA, které fungují na odlišném principu. Kvůli tomu nelze porovnávat jejich části, protože nemusí mít vhodný ekvivalent v druhé metodě. Proto jsou metody porovnány z celkového hlediska. V následující tabulce 1 jsou shrnuty parametry, které byly pro posudek vybrány.

*Tabulka 1 parametry k hodnocení*

Parametry	DNA	Otisk prstu
cena na 1 test	5000	50
pravděpod. identifikace	99,99%	90%
uživ. Přijatelnost	obtížná	snadná
náročnost procesu	velká	malá
potřebná povolení k odběru	ano	ne
doba vyhodnocení	dny	minuty
vyhodnocení osobních rysů	ano	ne

## 6 Zhodnocení výsledků

Na začátek je nutné zmínit, že metody nevznikly ve stejnou dobu, ale jejich využívání se protnul časem. Otisk prstu se v naší zemi začal využívat na začátku 20. století. DNA přišla na řadu až v 90. letech 20. Století. Z toho vyplývá, že první metoda měla dostatek času na rozvoj a zdokonalení při využívání nových technologií a principů.

Vzorky obou metod mají stejnou primární vlastnost, díky které se vůbec metody využívají. A to, že každá osoba má unikátní vzorek vůči ostatním. V prvním případě je to otisk prstu, u kterého je hlavní, aby vzorek nebyl poškozen a šel tak dobře reprodukovat. U běžného obtisku prstu je třeba zajistit umytou a čistou pokožku pro správný otisk. Naopak DNA lze získat z kterékoliv tkáně, ale je potřeba zajistit, aby daný vzorek nebyl kontaminován a to zvláště na místě činu. Při přímém odebrání vzorku testovanému nebo u domácího odběru je riziko kontaminace sníženo dobou odebrání a následného zapečetění.

Po zajištění vzorku následuje v podstatě už samotné porovnávání získaných otisků prstů a otisků v databázi. Vzorky DNA musí být naproti tomu náročně zpracovány, než je získán potřebný řetězec dat, který se může porovnávat s databází. Díky tomu je zřejmé, že identifikace pomocí otisků prstů je mnohem rychlejší proces. Analýza DNA se sice zrychluje s novými technologiemi, ale pořád nedosahuje ani řádově stejné doby.

Identifikace pomocí DNA je výrazně složitější a náročnější proces, ale dokáže potvrdit shodu s daleko větší pravděpodobností a navíc dokáže získat další cenné informace ze struktury DNA, jako je například barva vlasů, přibližný věk, přibližnou výšku postavy a pohlaví. Z uvedených věcí je samozřejmé, že identifikace pomocí DNA je mnohem náročnější na finance. Z důvodů, že vždy je potřeba nová odebrací sada, odborný personál, moderní přístroje a celkové vybavení laboratoře. I když jsou metody rozdílné, občas trpí stejnými nedostatky při vyšetřování. Mnohdy se stane, že na místě činu nejsou nalezeny žádné použitelné stopy pro identifikaci nebo jsou přítomny nastrčené vzorky nevinných osob.

V dnešní době v kriminalistické praxi identifikace pomocí DNA už pomalu vytlačuje otisk prstu, který byl revoluční metodou ve 20. století. DNA je tedy metodou pro 21. Století. Hlavní hledisko je vývoj technologií, bez kterých by ani analýza DNA nemohla existovat. Přístroje jsou čím dál více efektivnější a analýza DNA dostupnější, což se projevuje i na ceně testování.

V tabulce 2 jsou zhodnocena jednotlivá kritéria a určeny váhy pro konečné zhodnocení. Váhy jsou uvedeny ve vlastním sloupci tabulky. Nalevo je vždy porovnání kritéria u jednotlivých systémů. Vpravo je potom vypočítán rozdíl jednotlivých kritérií a vah. Ve výsledném hodnocení jsou jednotlivé hodnoty sečteny.

Tabulka 2 Multikriteriální analýza parametrů

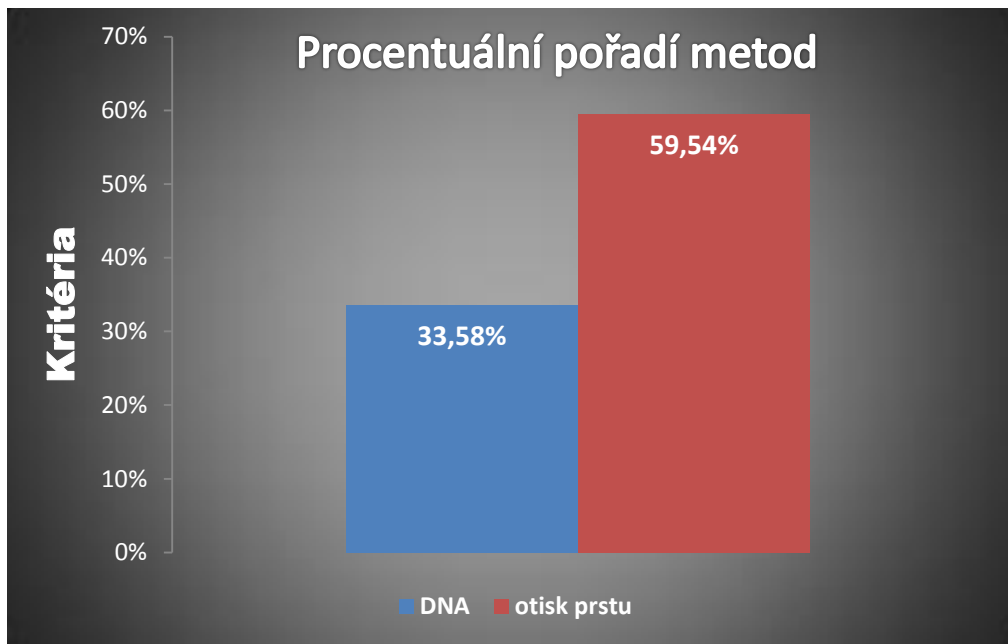
Parametry	DNA		Otisk prstu		váhy
cena na 1 test	2	2:3=0,66	0,5	0,5:3=0,16	3
pravděpod. identifikace	1	1:1=1	1,5	1,5:1=1,5	1
uživ. Přijatelnost	2	2:6=0,33	1	1:6=0,16	6
náročnost procesu	2	2:4=0,5	1	1:4=0,25	4
potřebná povolení k odběru	2	2:7=0,28	1	1:7=0,14	7
doba vyhodnocení	2	2:2=1	0,5	0,5:2=0,25	2
vyhodnocení osobních rysů	0,5	0,5:5=0,1	2	2:5=0,4	5
Výsledné hodnoty	3,88		2,87		
Pořadí	2		1		

Z tabulky 2, která je vypracována výše, je viditelné, že lépe z hodnocených metod vyšel otisk prstu.

K porovnání byla využita multikriteriální analýza a vyhodnocení základních kritérií je shrnuto v tabulce 2. Nejprve bylo nutné jednotlivá kritéria zhodnotit a určit, které bylo prioritní. Jelikož bakalářská práce má hlavní téma DNA, nejvýznamnějším rysem byla pravděpodobnost identifikace. Ta je zařazena na první pozici a označena číslem 1. Dalším podstatným kritériem byla doba vyhodnocení a cena. Z vypočtených hodnot a jejich následovného součtu vyšlo, že otisk prstu je výhodnější metoda. Velký vliv na výsledek měla cena, která je ve velkém poměru mezi metodami.

Pro lepší přehlednost výsledků se přepočítaly výsledné hodnoty z tabulky 2 na procenta, která následovně byla vynesena do grafu, viz obr. 11. K přepočtu bylo nutno zjistit maximální a minimální počet bodu, které šlo získat. Max. a min. hodnoty vymezily útek 100%, ze kterého už bylo jednoduché vypočítat daná procenta získaných bodů obou metod.

Obr. 11 Graf procentuálního pořadí metod





## 7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo přiblížení metody identifikace osob pomocí DNA a její využití v praxi. Účelem bylo popsat DNA a její analýzu, pro lepší představu probíhajících procesů ve specializovaných laboratořích. Byly popsány jednotlivé principy metod izolování, separace a sekvenace DNA, které jsou společně s přístroji používané v laboratořích. Zvláště u sekvenace DNA byl kladen důraz na přiblížení nových metod, tzv. metody nové generace, které jsou díky novým technologiím mnohem účinnější.

V praktické části je zhodnoceno používání metod identifikace pomocí DNA a otisku prstu, kde je poukázáno jejich výhody i zápory. Metoda podle DNA byla přiblížena skrz kriminalistickou praxi popsanou v teoretické části, kdy byl popsán sběr vzorků a jejich uložení, druhy analýz DNA a vyhodnocení dat, na nichž závidí výsledek testování. Dále byly stručně popsány komerční firmy zabývající se analýzou DNA. Byly uvedeny nabízené služby, např. testy otcovství a jejich ceny. U metody otisku prstu bylo potřeba uvést nejprve základní princip daktyloskopie, který se řešil v teoretické části a následovně využití metody v praxi. Dále byla přiblížena daktyloskopická sada potřebná k zajištění vzorku a její obsah. Všechny tyto získané poznatky o metodách umožnily jejich porovnání a poukázání na jejich využívání. Z porovnání obou metod byly zjištěny jejich rozdíly, které byly zpracovány i do tabulek a počítány multikriteriální metodou. Otisk prstu se ukázal jako jednodušší, rychlejší a cenově přijatelnější metoda, která ovšem má určité nedostatky, proto není pochyb, že je metoda stále využívána pro rychlou identifikaci. Naopak DNA, kvůli odlišnému zacházení a nutnosti analýzy vzorku, je složitější a náročnější metodou na čas a zpracování. Cena testování je oproti otisku prstu mnohonásobně větší, ale klesá s novými a dostupnějšími technologiemi. Avšak nelze potřít její výhody v univerzálnosti využití a větší pravděpodobnosti potvrzení shody. Nakonec porovnávací metoda ukázala, že výhodnější metodou je stále otisk prstu. Do budoucna lze očekávat, že metoda pomocí DNA se bude dále rozšiřovat s klesající cenou.

S vývojem technologií, vznikají i nové využití DNA, která má velké uplatnění hlavně ve zdravotnictví, co se genetiky týče. Nově je DNA testována v onkologii a zkoumána vědci Washingtonské univerzity ve spolupráci se společností Microsoft jako medium k ukládání informací. DNA se nevyrovná přenosovým rychlostem elektronických technologií, ale při rychlém, globálním nárůstu dat, se hledá médium s malými rozměry, které bude sloužit jako archiv informací.

## 8 Seznam použitých zdrojů

1. Rak, Roman, Matyáš, Václav a Říha, Zdeněk. *Biometrie a identita člověka ve forezních a komerčních aplikacích*. Praha : Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2365-5.
2. DNA. *cs.wikipedia.org*. [Online] 16. Březen 2017. [Citace: 15. 2 2017.] [https://cs.wikipedia.org/wiki/DNA#Historie\\_v.C3.BDzkumu](https://cs.wikipedia.org/wiki/DNA#Historie_v.C3.BDzkumu).
3. Solok, Tomáš. Identifikace osob pomocí analýzy DNA. *pravnicaradce.ihned.cz*. [Online] 15. Květen 2003. [Citace: 18. 2 2017.] <http://pravnicaradce.ihned.cz/c1-11549730-identifikace-osob-pomoci-analyzy-dna>.
4. abbas. Biometriky. *www.biometricke-ctecky.cz*. [Online] ABBAS, a.s., 23. Listopad 2016. [Citace: 10. 2 2017.] <http://www.biometricke-ctecky.cz/aktuality/>.
5. Identita. *wikisofia.cz*. [Online] 3. 10 2014. [Citace: 19. 2 2017.] [https://wikisofia.cz/wiki/Identita\\_\(psychologie\)](https://wikisofia.cz/wiki/Identita_(psychologie)).
6. Forda, Jan. databáze DNA. *www.uoou.cz*. [Online] Úřad pro ochranu osobních údajů, 2 2007. [Citace: 21. 2 2017.] <https://www.uoou.cz/databaze-dna/ds-2479/archiv=0&p1=1933>.
7. —. Otevřete ústa, prosím... *www.uoou.cz*. [Online] Úřad pro ochranu osobních údajů, 2 2007. [Citace: 21. 2 2017.] [https://www.uoou.cz/vismo/zobraz\\_dok.asp?id\\_ktg=2477&p1=2477](https://www.uoou.cz/vismo/zobraz_dok.asp?id_ktg=2477&p1=2477).
8. Vantuch, Pavel. Nové možnosti odběru DNA. *pravnicaradce.ihned.cz*. [Online] 28. 6 2006. [Citace: 2. 3 2017.] <http://pravnicaradce.ihned.cz/c1-18785870-nove-moznosti-odberu-dna>.
9. Vobiřil, Jan a Ferfecki, Vít. *DNA v policejní praxi*. [PDF] 11 2014.
10. Studihradová, Barbora. DNA JAKO DŮKAZ. *socv2.nidv.cz*. [Online] 2011. [Citace: 11. 3 2017.] <https://socv2.nidv.cz/archiv33/getWork/hash/5e4be506-558d-11e0-a844-001e6886262a>.
11. Izolace DNA pomocí chelexu. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 24. 2 2017.] <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-chelexu/protokol-izolace-dna-pomoci-chelexu/>.
12. Izolace genomové DNA pomocí fenol-chloroformu. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 26. 2 2017.] <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-genomove-dna-pomoci-fenol-chloroformu/>.
13. Bártová, Eva. Metody molekulární biologie. *mmp.vfu.cz*. [Online] 2014. [Citace: 26. 2 2017.] [http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody\\_molekularni\\_biologie&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz).
14. Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 26. 2 2016.] <http://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyseliny/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>.

15. Elektroforetická separace nukleových kyselin. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 27. 2 2017.] <http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>.
16. Bártová, Eva. Gelová elektroforéza. *cit.vfu.cz*. [Online] 2011. [Citace: 27. 2 2017.] [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz).
17. Vávrová, Jaroslava. Centrifugace. *ciselniky.dasta.mzcr.cz*. [Online] 2006. [Citace: 27. 2 2017.] <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/JVACO.htm>.
18. Centrifugace. *www.wikiskripta.eu*. [Online] 2. 1 2017. [Citace: 27. 2 2017.] <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Centrifugace>.
19. Laboratorní centrifuga. *cs.wikipedia.org*. [Online] 6. 12 2012. [Citace: 27. 2 2017.] [https://cs.wikipedia.org/wiki/Laboratorn%C3%AD\\_centrifuga](https://cs.wikipedia.org/wiki/Laboratorn%C3%AD_centrifuga).
20. Odstředivá síla. *wiki.unas.cz*. [Online] [Citace: 27. 2 2017.] [http://wiki.unas.cz/wikipedia/o/od/odsta\\_ediva\\_\\_sa\\_la.html](http://wiki.unas.cz/wikipedia/o/od/odsta_ediva__sa_la.html).
21. Vácha, František. Centrifugační metody. *www.prf.jcu.cz*. [Online] [Citace: 27. 2 2017.] [http://www.prf.jcu.cz/~vacha/Vyuka/Metody/pdf/5\\_hod\\_Centrifugace.pdf](http://www.prf.jcu.cz/~vacha/Vyuka/Metody/pdf/5_hod_Centrifugace.pdf).
22. Bártová, Eva. PCR. *mmp.vfu.cz*. [Online] 2011. [Citace: 28. 2 2017.] [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz).
23. Polymerázová řetězová reakce. *www.wikiskripta.eu*. [Online] 1. 12 2016. [Citace: 28. 2 2017.] [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Polymer%C3%A1zov%C3%A1\\_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1\\_reakce](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_%C5%99et%C4%9Bzov%C3%A1_reakce). ISSN 1804-6517.
24. Sekvenování nové generace. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 2. 3 2017.] <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>.
25. Sekvenace DNA. *www.genseq.cz*. [Online] 2016. [Citace: 2. 3 2017.] <http://www.genseq.cz/sekvenace-dna>.
26. Bártová, Eva. Sekvenování DNA. *mmp.vfu.cz*. [Online] 2011. [Citace: 2. 3 2017.] [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-sekvenovani&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz).
27. Koubková, L., Vojtěšek, B. a Vyzula, R. Sekvenování nové generace. *www.linkos.cz*. [Online] 1. 4 2014. [Citace: 5. 3 2017.] <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4484.pdf>.
28. Sekvenování nové generace. *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 5. 3 2017.] <http://labguide.cz/sekvenovani-nove-generace/>.
29. 454 (Roche). *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 5. 3 2017.] <http://labguide.cz/454-roche/>.

30. SOLEXA (ILLUMINA). *labguide.cz*. [Online] 2014. [Citace: 6. 3 2017.] <http://labguide.cz/solexa-illumina/>.
31. Technologies, Oxford Nanopore. Nanopore. *nanoporetech.com*. [Online] 2016. [Citace: 6. 3 2017.] <https://nanoporetech.com/>.
32. Daktyloskopie. *krimi2000.blogspot.cz*. [Online] 2013. [Citace: 13. 3 2017.] <http://krimi2000.blogspot.cz/2013/03/daktyloskopie.html>.
33. Daktyloskopické stopy. *krimi-spik.sweb.cz*. [Online] 2009. [Citace: 12. 3 2017.] [http://krimi-spik.sweb.cz/02\\_exper/expertiz/02a\\_dakt/02a\\_stopy.htm](http://krimi-spik.sweb.cz/02_exper/expertiz/02a_dakt/02a_stopy.htm).
34. Daktyloskopické otisky. *krimi-spik.sweb.cz*. [Online] 2009. [Citace: 12. 3 2017.] [http://krimi-spik.sweb.cz/02\\_exper/expertiz/02a\\_dakt/02a\\_otisky.htm](http://krimi-spik.sweb.cz/02_exper/expertiz/02a_dakt/02a_otisky.htm).
35. Daktyloskopická evidence. *krimi-spik.sweb.cz*. [Online] 2009. [Citace: 12. 3 2017.] [http://krimi-spik.sweb.cz/02\\_exper/expertiz/02a\\_dakt/02a\\_evid.htm](http://krimi-spik.sweb.cz/02_exper/expertiz/02a_dakt/02a_evid.htm).
36. Abbas. Biometrie otisku prstu. *www.biometricke-cticky.cz*. [Online] 2017. [Citace: 14. 3 2017.] <http://www.biometricke-cticky.cz/biometriky/otisk-prstu/>.
37. Otisky prstů místo přístupových hesel. [Online] 4. 12 2016. [Citace: 14. 3 2017.] [https://www.google.cz/search?q=Z%C3%A1kladn%C3%AD+daktyloskopick%C3%A9+vzor+y&safe=off&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiK7r7zv97SAhWIIpoKHbC7BVkQ\\_AUIBigB&biw=1455&bih=722#imgrc=BNgIdsmIFd7R-M:](https://www.google.cz/search?q=Z%C3%A1kladn%C3%AD+daktyloskopick%C3%A9+vzor+y&safe=off&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiK7r7zv97SAhWIIpoKHbC7BVkQ_AUIBigB&biw=1455&bih=722#imgrc=BNgIdsmIFd7R-M:)
38. DDC. Revoluční testy DNA. *www.dnacenter.cz*. [Online] 2016. [Citace: 7. 3 2017.] <http://www.dnacenter.cz/>.
39. Genomac. PGT. *www.genomac.cz*. [Online] [Citace: 7. 3 2017.] <http://www.genomac.cz/cz/co-je-to-preventivni-geneticky-test-pgt.php>.
40. —. GENOGRAF. *www.rekreacnigenetika.cz*. [Online] 2015. [Citace: 7. 3 2017.] <http://www.rekreacnigenetika.cz/genograf-tajemstvi-vaseho-rodu>.
41. poskytnutí otisků prstů. *www.slidilove.cz*. [Online] 11. 4 2013. [Citace: 20. 3 2017.] <http://www.slidilove.cz/poradna/mohu-odmitnout-zadost-policie-o-poskytnuti-otisku-prstu>.
42. ČR, Policie. Kriminalistická daktyloskopie. *www.policie.cz*. [Online] 2017. [Citace: 12. 3 2017.] <http://www.policie.cz/clanek/celorepublikove-utvary-kriminalisticky-ustav-praha-zpravodajstvi-test-2.aspx?q=Y2hudW09NA%3D%3D>.
43. Elas. Daktyloskopie - zajišťování latentních stop. *www.elasbrno.cz*. [Online] 2017. [Citace: 12. 3 2017.] <http://www.elasbrno.cz/daktiloskopie-latentni-a13>.
44. jr., MUDr. Antonín Šípek. Historie genetiky. *www.genetika-biologie.cz*. [Online] 2014. [Citace: 10. 2 2017.] <http://www.genetika-biologie.cz/historie-genetiky>.

45. DAKTYLOSKOPIE. *krimi-spik.sweb.cz*. [Online] 2009. [Citace: 12. 3 2017.] [http://krimi-spik.sweb.cz/02\\_exper/expertiz/02a\\_dakt/02a\\_hlav.htm](http://krimi-spik.sweb.cz/02_exper/expertiz/02a_dakt/02a_hlav.htm).
46. Biochemie. *web2.mendelu.cz*. [Online] 20. 1 2017. [Citace: 10. 3 2017.] [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/print.php?page=1707&typ=html](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1707&typ=html).
47. Elektroforéza. *www.wikiskripta.eu*. [Online] 14. 3 2016. [Citace: 10. 3 2017.] <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za>.
48. labmark. Minicentrifugy. <http://www.labmark.cz>. [Online] 2017. [Citace: 15. 3 2017.] <http://www.labmark.cz/spectrafuge-6c>.
49. Madical. *cz.pinterest.com*. [Online] 2017. [Citace: 15. 3 2017.] <https://cz.pinterest.com/iade360/medical/>.
50. Zorníková, Gabriela. Využití polymerázové řetězové reakce . *www.chempoint.cz*. [Online] 15. 5 2012. [Citace: 15. 3 2017.] <http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probioticky-mikroorganismu>.
51. Omniveda. Lekce číslo IV / 1 : DAKTYLOSKOPIE. *www.vedanasbavi.sk*. [Online] 2017. [Citace: 15. 3 2017.] <http://www.vedanasbavi.sk/orisek-56-daktyloskopia?IDp=5>.

## 9 Seznam obrázků

<i>Obr. 1 Šroubovice DNA s bázemi</i> .....	6
<i>Obr. 2 Postup při izolaci DNA pomocí fenol-chloroformu</i> .....	21
<i>Obr. 3 Kolonkový kit</i> .....	22
<i>Obr. 4 Nanášení vzorku při horizontální elektroforéze</i> .....	23
<i>Obr. 5 Centrifuga Spectrafuge 6C s úhlovým rotorem</i> .....	25
<i>Obr. 6 Termocykler</i> .....	27
<i>Obr. 7 PCR postup jednotlivých fází</i> .....	28
<i>Obr. 8 Drudy markantů</i> .....	36
<i>Obr. 9 Daktyloskopické vzorky</i> .....	37
<i>Obr. 10 Daktyloskopická karta</i> .....	43
<i>Obr. 11 Graf procentuálního pořadí metod</i> .....	47

## **10 Seznam tabulek**

<i>Tabulka 1 parametry k hodnocení .....</i>	<i>44</i>
<i>Tabulka 2 Multikriteriální analýza parametrů .....</i>	<i>46</i>