

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Metody forenzní genetiky v odvětví kriminalistiky

Autor: Michaela Konrádyová

Studijní program: B1501 / Biologie

Studijní obor: Ruský jazyk se zaměřením na vzdělávání / Biologie se zaměřením na vzdělávání / Bc. Učitelství – všeobecný základ

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Zadání bakalářské práce

Autor: Michaela Konrádyová

Studium: S14BI048BP

Studijní program: B1501 Biologie

Název bakalářské práce: Metody forenzní genetiky v odvětví kriminalistiky

Název bakalářské práce Methods of forensic genetics in the field of criminology
v AJ:

Cíl, metody, literatura, předpoklady

Tématem této bakalářské je průřez metod forenzní genetiky, které se aktuálně využívají v odvětví kriminalistiky. Úvodem je zmíněna stručná historie forenzní genetiky - kdo a kde byl zakladatelem forenzní genetiky, její první použití a kdy se poprvé začala přijímat jako věrohodný důkazní materiál v soudním řízení. Dále je hodnoceno její postupné rozvíjení a samozřejmě její dnešní podoba. Součástí práce je i charakteristika základních pojmů, praktické postupy zajišťování DNA stop z místa činu a vlivy, které mohou změnit kvalitu DNA. V další části budou popsány konkrétní metody a jejich principy, případně zhodnocení aplikovatelnosti té dané metody.

Štefan J., Hladík J. et al., 2012: Soudní lékařství a jeho moderní trendy. 427p., Grada Publishing, Praha., Šimková H., 2012: Breviář forenzní genetiky. Forenzní DNA analýza v otázkách a odpovědích. 212p., Tribun EU., Vaněk D., 2011: Genetika jako identifikační nástroj ve službách kriminalistiky. Živa, Praha, 2: 56-57., Vaněk D., 2010: Zrození a dospívání forenzní genetiky. Vesmír, Praha, 89: 415., Ballantyne K., Mitchell J. 2010: Forensic trace DNA: a review. Investigative Genetics. Doi: 10,1186 / 2041-2223-1-14

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Michaela Konrádyová

Poděkování

Chci poděkovat paní RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce za její čas, rady a věcné připomínky při vypracování bakalářské práce.

Anotace

KONRÁDYOVÁ, Michaela. *Metody forenzní genetiky v odvětví kriminalistiky*. Hradec Králové: Přírodovědecká fakulta Univerzity Hradec Králové, 2018. 61 s. Bakalářská práce.

Tématem této bakalářské je průřez metodami forenzní genetiky, které se aktuálně využívají v odvětví kriminalistiky. Úvodem je zmíněna stručná historie forenzní genetiky jako oboru - kdo a kde byl zakladatelem forenzní genetiky, její první použití a kdy se poprvé začala přijímat, jako věrohodný důkazní materiál v soudním řízení. Dále je hodnoceno její postupné rozvíjení a samozřejmě její dnešní podoba. Součástí práce je i stručná charakteristika základních pojmů, praktické postupy zajišťování DNA stop z místa činu a vlivy, které mohou změnit kvalitu DNA. V další části budou popsány konkrétní metody a jejich principy, případně zhodnocení aplikovatelnosti té dané metody.

Klíčová slova:

Deoxyribonukleová kyselina, biologická stopa, metody forenzní analýzy, uchovávání biologického materiálu.

Annotation

KONRÁDYOVÁ, Michaela. *Methods of forensic genetics in the field of criminology*. Hradec Králové: The Faculty of Natural science, University of Hradec Králové, 2018. 61 pp. Bachelor thesis.

The topic of this bachelor thesis is an overview of methods of forensic genetics that are currently used in the field of criminology. The introduction mentions a brief history of forensic genetics as a field of science. More specifically, who was the founder and where the forensic genetics originated, it's first use and when it first became considered credible evidence in judicial proceedings.

Later on, the thesis states the gradual development of forensic genetics and its current form. The following part of the thesis is focused on a brief characteristic of basic concepts, practical procedures of gaining DNA tracks from a crime scene and influences that could change the quality of DNA. Last part describes specific methods and their principles of use. Eventually, it describes an assessment of the applicability of the methods.

Keywords:

Deoxyribonucleic acid, biological imprint, methods of forensic analysis, storage of biological material.

Obsah

Úvod	10
1 Definice a historie genetiky a forenzní genetiky	11
1.1 Genetika.....	11
1.2 Forenzní genetiky	11
1.2.1 Dělení forenzní genetiky	12
1.3 Počátky forenzní genetiky	12
1.4 Forenzní genetiky ve Spojených Státech Amerických	14
1.5 První případ vyřešený za pomoci identifikace DNA v České republice.....	14
2 Vymezení základních pojmů.....	16
2.1 Nukleové kyseliny	16
2.2 Gen.....	17
2.3 Genetický marker (DNA marker)	17
2.4 Mutace.....	18
2.5 Polymorfismus.....	18
3 DNA v biologické stopě.....	19
3.1 Biologický materiál jako stopa	19
3.1.1 Biologická stopa, podle oddělení od lidského těla	19
3.1.2 Biologická stopa podle místa nalezení.....	19
3.1.3 Biologická stopa dle trestně právní činnosti, na základě přiřazení biologického materiálu k člověku	20
3.2 Charakteristika biologického materiálu obsahující DNA	21
3.2.1 Krev	22
3.2.2 Ejakulát	22
3.2.3 Sliny.....	22
3.2.4 Trichologický materiál.....	23

3.3	Primární a sekundární přenos DNA obsažené v biologickém materiálu ...	23
4	Zajišťování vzorků pro forenzně genetické zkoumání na místě činu	24
4.1	Degradace DNA.....	24
4.2	Množství biologické stopy.....	24
4.3	Kontaminace DNA	25
4.4	Postupy při zajišťování vzorků DNA pro analýzu	26
4.5	Specifika odběrů jednotlivých druhů biologického materiálu.....	26
4.5.1	Krev	26
4.5.2	Sliny a sperma	27
4.5.3	Trichologický materiál	27
4.6	Individualita a identifikace	28
4.7	Důkazní potenciál stopy.....	29
5	Hlavní proces analýzy DNA.....	30
5.1	Izolace DNA.....	30
5.2	Kvantifikace DNA.....	30
5.3	Separace namnožených úseků na sekvenátoru	31
6	Vybrané metody forenzní analýzy DNA v kriminalistice	32
6.1	Sekvenování DNA	32
6.1.1	Sangerovo sekvenování.....	32
6.1.2	Andernsova sekvence.....	33
6.2	VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)	33
6.3	STR (Short Tandem Repeats).....	34
6.4	SNP (Single-nucleotide polymorphism)	35
6.5	RAPD (Random-amplified polymorphic DNA).....	36
6.6	RFLP (restriction fragment length polymorphism)	36
6.6.1	Postup metody RFLP	37
6.7	PCR (Polymerase Chain Reaction)	38

6.7.1	Postup metody PCR.....	38
6.7.2	Varianty PCR využívané v kriminalistice.....	39
7	Interpretace	41
7.1	Kvalita v laboratoři	41
7.1.1	Výběr vhodné metody na analýzu	42
7.1.2	Průběžné ověřování výsledků z DNA analýzy.....	42
7.2	Inferenční logika hodnocení dat	42
7.2.1	Postup znalce při určování hodnoty důkazu	43
8	Chyby ve forenzně genetické analýze	44
8.1	Nalézání chyb ve forenzní genetice	44
8.2	Kde chyby vznikají a jak jim předcházet.....	45
9	Uchovávání zdrojů genetických informací v kriminalistice	47
9.1	Databáze v České Republice	47
9.2	Banky (archivy, depozity) biologického materiálu.....	47
	Závěr.....	49
	Seznam použité literatury.....	51
	Seznam použitých obrázků.....	60

Úvod

Forenzní genetiky je poměrně mladým oborem. Využívá se za různých okolností například k určení příbuznosti, identifikaci při hromadných automobilových nehodách či při vyšetřování trestných činů, kdy se zkoumají biologické stopy získané na místě činu a na základě jejich analýzy se identifikuje pachatel (ČSSFG, 2018).

Tématem rešeršní bakalářské práce jsou metody forenzní genetiky v odvětví kriminalistiky. Autorka si vybrala toto téma na základě vlastního zájmu po zjištění, z čeho všeho se dá zjistit DNA jedince, jaký je celkový proces práce se vzorky DNA a jakým způsobem se určuje DNA profil. Celkově forenzní genetiky a její metody využívané policií jsou důležité, jelikož kriminalistům pomáhají určit pachatele, který způsobil trestný čin.

V první části bakalářská práce definuje pojem forenzní genetiky, a čím se zabývá, popisuje historii forenzní genetiky z pohledu, kdy se poprvé analýza DNA použila ve vyšetřování a to ve Velké Británii, v Spojených státech amerických a také v České republice. Dále se v první části vysvětlují základní pojmy využívané v genetice a nakonec se tato část zabývá biologickou stopou, definuje ji, popisuje dělení do různých kategorií, uvádí, jak se biologická stopa hledá a následně přidává příklady biologického materiálu.

Ve druhé části se bakalářská práce zabývá zajišťováním vzorků biologického materiálu, která obsahuje DNA, pro forenzně genetické zkoumání na místě činu, kde se popisují pevná pravidla vyšetřování. Následně uvádí postupy při zajišťování vzorků DNA pro analýzu. V dalších kapitolách se zabývá identifikací a individualitou, hlavními procesy DNA, samotnými metodami užívaných při analýze DNA ve forenzní genetice, které využívá kriminalistika, interpretací výsledných dat, jaké mohou vzniknout chyby při forenzně genetické analýze DNA vzorků a jejich uchování.

1 Definice a historie genetiky a forenzní genetiky

1.1 Genetika

Jak uvádí Šípek (2010), „*Genetika je věda zabývající se dědičností a proměnlivostí živých soustav.*“ Z textu Sitné a Kůstové (2016) můžeme dědičnost (hereditu), definovat jako schopnost organismu, která předává geny z generace na generaci. Tím se zachovává stálost a neměnnost rodů. Důležitá je i proměnlivost (variabilita), která organizmy drobně mění, aby docházelo k určitému postupnému vývoji. Genetika má spoustu podoborů a oblastí a velmi se prolíná s dalšími přírodními vědami. Samostatnou kapitolou, ze které analyticky vychází forenzní genetika, jsou pak metody molekulární biologie a jejich speciální aplikace v kriminalistice, které slouží jako nástroj k porovnávání vzorku DNA nalezené na místě činu s DNA od podezřelé osoby či následné identifikaci dané DNA.

1.2 Forenzní genetika

Halina Šimková (2012) ve své publikaci uvádí, že termín forenzní pochází z lat. *forensis*, které je odvozeno od slova forum – náměstí. V antickém Římě se totiž běžně na náměstích konala veřejná soudní jednání. Až dodnes se používání slova forenzní zachovalo ve smyslu dokazovacím či soudním.

Obor forenzní genetiky se tedy zabývá hledáním shod či rozdílů mezi jedinci nebo fragmenty lidských těl a stopami biologického původu zajištěnými na místě trestného činu orgány činnými v trestním řízení či soudním znalcem za použití aktuálně dostupných molekulárně biologických technologií, jak uvádí Mazura (2015).

S forenzní genetikou úzce souvisí i další obory, např., molekulární genetika, biochemie nebo enzymologie (Štefan, Hladík et. al. 2012). Podobor molekulární genetiky zkoumá především geny a nukleové kyseliny. Také se zaměřuje na jejich výsledné produkty (Šípek, 2014). Předmětem biochemie je studie struktury látek, které tvoří živý organismus a jeho složení, následnými chemickými změnami látek

a porovnáváním fyziologických projevů s tím, co se děje v organismu (Kodíček, 2007). Enzymologie studuje enzymové reakce, které se dějí v organismu (Farmaceutická fakulta UK, 2018).

1.2.1 Dělení forenzní genetiky

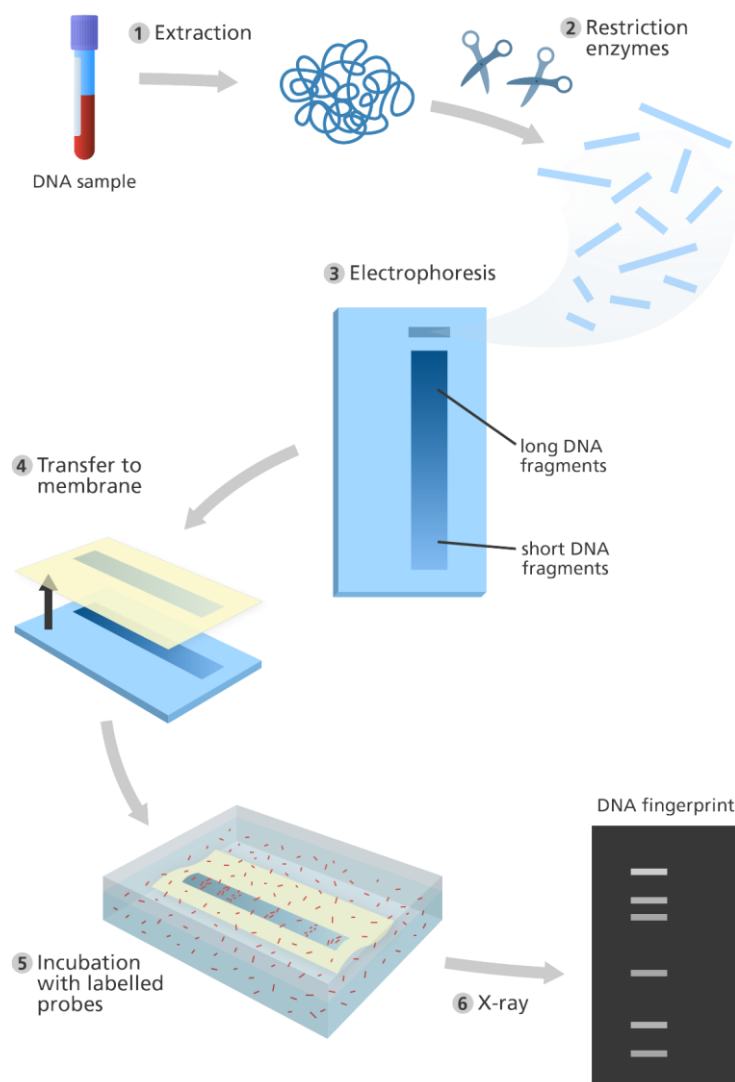
Forenzní genetiky se nevyužívá jen v kriminalistice, ale má více uplatnění. Kromě porovnávání DNA a následné identifikaci pachatele, se také využívá k identifikaci osob, aby se například určila totožnost mrtvoly. V neposlední řadě forenzní genetiky studuje příbuzenské vztahy. Na základě toho, kde se forenzní genetiky využívá, se dělí do třech oddílů:

- 1) Kriminalistická
- 2) Identifikační
- 3) Kognitivní (ČSSFG, 2018).

1.3 Počátky forenzní genetiky

Forenzní genetiky je poměrně mladým vědním oborem. Na rozdíl od jiných kriminalistických či forenzních metod, jako je trasologie, mechanoskopie či elektrochemie, známe naprosto přesně den a místo jejího zrodu. První výzkum se udal v pondělí 10. září 1984 v DNA laboratoři Dr. Aleca Jeffreyse na University of Leicester ve Velké Británii (Jeffrey, Wilson, 1985).

Dr. Alec Jeffreys dědičné onemocnění v rodinách. Soustředil se zejména na metody, které řeší otcovství a přistěhovalecké spory. Prokázal je pomocí genetické vazby mezi jednotlivci. Využil k tomu polymorfismus délky restrikčního fragmentu (RFLP), aby analyzoval deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Na základě toho zjistil, že repetitivní DNA vzorky, známé jako variabilní počet tandemových opakování (VNTR), že se nacházejí ve všech lidech, ale liší se jednotlivou délkou. Na základě toho, Dr. Alec Jeffreys zjistil, že tyto variace může být použita k určení identity osoby. Tuto techniku nazval DNA fingerprinting, tedy „genetický otisk prstu“. Pomocí této metody, dokázal, že genetický otisk prstu je specifický pro každého jednotlivce na Zemi, kromě identických dvojčat (DNA Forensics, 2018).



Obr. 1. Postup při zjišťování genetického otisku prstů (Yourgenome, 2016).

Jako prvnímú se dr. Alecovi Jeffreysovi podařilo určit identitu chlapce, který pocházel z Ghany (Jeffreys, Brookfield, Semeonoff, 1985).

První reálný případ, v němž byla užitá metoda DNA fingerprinting k identifikaci pachatele, byly vraždy a znásilnění dvou dívek v hrabství Leicestershire (Šimková 2012).

V prvním případě se jednalo o nevyřešenou vraždu Lyndy Mann. Tato patnáctiletá dívka v listopadu 1983 odešla z domu v oblasti Enderby a šla navštívit svoji přítelkyni. Domů se však téhož dne nevrátila. Druhý den ráno ji našli na opuštěném chodníku uškrcenou a znásilněnou. Tehdy se policii nedařilo vraždu

objasnit. O tři roky později byla stejným způsobem zavražděna další patnáctiletá dívka Dawn Ashworth, která byla uškrcena, zbita a znásilněna.

K vraždě se přihlásil mladý muž z Enderby a učinil plné doznání policii. Nicméně, po prvním testu DNA se zjistilo, že si vymýšlel a je nevinný. Policie tak zintenzivnila hledání a v průběhu příštích šesti měsíců požádala 5 000 místních mužů, aby poskytli vzorek vlastní DNA. Ovšem, všechny vzorky byly vyhodnocené jako negativní. Policie došla do fáze, kdy si myslela, že tento případ už nevyřeší. Avšak na policii zavolala žena, která nahlásila, že zaslechla v hospodě rozhovor pracovníka pracujícího v pekárně. Ten prozradil, že zaplatil 200 £ spoluzaměstnanci, aby mu dal svůj vzorek DNA. Jmenoval se Colin Pitchfork a byl v září 1987 zatčen v sousední vesnici Littlethorpe. Poté co policie otestovala vzorek Pitchforkovy DNA, zjistila, že odpovídala vrahově DNA (Holden, 2014). Záhy se metoda analýzy lidské DNA pro kriminalistické účely rozšířila také do USA a dalších zemí (Jedlička, 2018).

1.4 Forezní genetika ve Spojených Státech Amerických

Další zemí, kde našla domov forezní genetika, byly Spojené Státy Americké, které poprvé využili metodu DNA fingerprinting při vyšetřování. Roku 1987 byl prvním odsouzeným pachatelem, na základě identifikace DNA, pomocí metody DNA fingerprintingu, Tommy Lee Andrews. Čelil obvinění za sérii loupeží a znásilnění. Jeden z hlavních důkazů, který Andrewse prokázal vinným, bylo sperma, které se našlo na těle znásilněných žen. Díky důležitosti nové metody byla v prosinci 1988 otevřena v USA laboratoř na analýzu DNA (Leonard et. al, 2016).

1.5 První případ vyřešený za pomoci identifikace DNA v České republice

Dne 27. června 1990 byla nalezena zavražděná 19ti letá studentka Jana Krkošková na dámském WC na Pedagogické fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Již z prvního pohledu na tělo oběti bylo patrné, že se jednalo o vraždu se sexuálním motivem. Krevní stopy se nacházely na podlaze kolem zavražděné i na obkladačkách. Zvláštní druh krevních stop byl zjištěn ve formě kapek na jednom místě kachliček. Tyto

kapky budily dojem, že byly vytvořeny otřepáním zakrvavené ruky, proto byly zajištěny.

Pitvou na těle zavražděné studentky zjištěno celkem 31 bodnořezných ran v oblasti hrudníku, zad a hýždí. Mužské pohlavní buňky, ani jejich fragmenty nebyly v genitálu ani kolem něho prokázány.

Hned druhý den po vraždě byl zadržen 26letý Milan Lubas. V době zadržení měl obvázanou dlaň pravé ruky. Byla mu odebrána krev a porovnána se stopami krve, které vznikly na místě činu. Rovněž byl při domovní prohlídce zajištěn jeho oděv se stopami krve. Výsledky porovnání všech krevních stop byly však negativní. Lubas měl stejnou krevní skupinu jako jeho oběť. Obhájce po tomto zjištění okamžitě žádal o jeho propuštění z vazby a zastavení trestního stíhání.

Protože kriminalisté byli na základě indicií a rozporů v jeho výpovědích přesvědčeni o jeho vině, rozhodli se požádat pracoviště katedry genetiky a molekulární chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě o provedení identifikace krevních stop metodou DNA. Přestože se na této katedře prováděla analýza lidské DNA pouze experimentálně, její vedoucí pracovník RNDr. Doc. RNDr. V. Ferák, CSc, se rozhodl analýzu DNA z krevních stop se svými spolupracovníky provést.

Necelé čtyři měsíce od vraždy obdrželi kriminalisté znalecký posudek, z něhož vyplynulo, že krev zajištěná na dámském WC pedagogické fakulty byla Milana Lubase. Stopy krve na ponožkách a riflích Milana Lubase pocházely z těla zavražděné Jany Krkoškové. Milan Lubas byl odsouzen k 23 letům odnětí svobody. Dne 4. února 1993 spáchal ve výkonu trestu sebevraždu (Jedlička, 2010).

2 Vymezení základních pojmů

2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny patří mezi makromolekulární látky, které se nacházejí v každé buňce. V jejich molekulách je uložena genetická informace. Nukleové kyseliny ovládají přepis do bílkovin a řídí přenos dědičné (genetické) informace z generace na potomstvo. Hlavními stavebními jednotkami nukleových kyselin jsou nukleotidy, které se skládají z tří složek, z cukru (pentózy), dusíkaté báze (adenin, guanin, cytosin, thymin a uracil). Do nukleových kyselin se řadí dva typy – deoxyribonukleová kyselina (zkr. DNA) a ribonukleová kyselina (zkr. RNA). Obě dvě kyseliny se navzájem rozlišují svými funkcemi, složením i strukturou (Streblová, 2012).

Jak Štefánek (2011) popisuje: „DNA je pro nás zcela zásadní, protože u daného jedince obsahuje v každé buňce genetické informace o celém organismu a cestou pohlavních buněk umožňuje přenos této informace na potomstvo.“. Aby vznikla jednořetězcová DNA, musejí se nukleotidy seřadit vedle sebe, a tím vznikne kód. Pokud se má z jednořetězcové DNA stát dvouřetězcovou, musejí se báze spárovat s jiným typem. Každá báze se páruje jen s jednou jinou bází (Šimková, 2012). Na vytvoření modelu dvoušroubovice DNA se podíleli James D. Watson spolu s Francisem H. Crickem. První model představili v roce 1953 (Šípek, 2010).

U eukaryot se vyskytují dva typy DNA, jaderná a mitochondriální. Oba dva typy DNA jsou důležité při genetické analýze a následnému porovnávání DNA i identifikaci jedince.

Převážná většina DNA se nachází přímo v jádru buňky (jaderná DNA). Jaderná DNA dohromady s nukleoproteiny neboli histony, vytvářejí chromatin (Otová, Mihalová, 2012). Pouze při procesu buněčného dělení, ve fázi interfáze, se chromatin kondenzuje (Koolman, Röhm, 2012). Pokud se chromatinové vlákno spiralizuje, vzniká chromozom (Otová, Mihalová, 2012).

Mitochondriální DNA, zkr. mtDNA, se vyskytuje v organele zvané mitochondrie. Tato DNA není lineárního, ale kruhového tvaru. Nachází se v ní 37 genů, které mohou vytvořit až 16 569 párů bází DNA (MULBGG). Oproti jaderné DNA, mtDNA se

v buňce vyskytuje ve vysokém množství, jelikož jedna buňka obsahuje okolo 2 000 mitochondrií (Koolman, Röhm, 2012).

2.2 Gen

Podle Kroupové (2016) se definuje gen jako: „*Jednotka a nositel genetické informace pro určitý znak, dispozici, vlastnost nebo vloh.*“ Každý gen je tvořen nukleotidy, které jsou umístěny na konkrétních místech na chromozomu (lokusech) (Nguyen, 2015). Soubor všech genů jedince se nazývá genom (Rovenský et al., 2016).

2.3 Genetický marker (DNA marker)

Genetický marker se může objevovat jako gen či úsek DNA (sekvence), který se nachází na chromozomu. Může být vysvětlena jako variace, která může vznikat například při mutaci. Tato variace je následně pozorována (Pierce, 2014). Mezi příklady genetický markerů patří:

- polymorfismus délky restričního fragmentu (RFLP)
- náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)
- variabilní počet tandemových opakování (VNTR)
- polymorfismus jednoduché sekvenční délky (SSLP)
- polymorfismus délky amplifikovaného fragmentu (AFLP)
- opakování jednoduché sekvence (SSR)
- jediný nukleotidový polymorfismus (SNP)
- krátké tandemové opakování (STR)
- polymorfismus s jedním znakem (SFP)

Genetické markery se dělí do dvou skupin, První skupina zkoumá variaci na genové úrovni. Mohou se v ní změnit aminokyseliny či proteiny. Tuto skupinu označujeme jako biochemické markery. Do druhé skupiny patří molekulární makery, které studují variaci na DNA úrovni, například může u nukleotidů dojít inverzi či vkládání (Boopathi, 2013). Konkrétně o polymorfismu délky restričního fragmentu (RFLP), náhodné amplifikaci polymorfní DNA (RAPD), tandemovému opakování s

variabilním číslem (VNTR), jediný nukleotidovému polymorfismu (SNP) a krátkém tandemovém opakování (STR), se bakalářská práce zabývá v kapitole číslo 6.

2.4 Mutace

Za změnou sekvence DNA mohou mutace. Mutace se mohou objevovat v rozsáhlém množství. Od skoro neviditelné změny, například, jedné přeměny báze v nukleotidu, až po přestavbu a počet chromozomů či předělání celého karyotypu chromozomů. Je ovšem důležité říct, že množství, ve kterém se objevuje mutace, nemá dopad na následky v organismu. Přestavba chromozomů nemusí mít absolutně žádný účinek na organismus, kdežto jediná změna v nukleotidu může mít obrovský efekt na organismus (Šimková, 2012).

Podle místa vzniku rozlišujeme tři typy:

- 1) Genová mutace
- 2) Chromozomová mutace
- 3) Genomová mutace

Jedním typem mutace je také polymorfismus, který je vysvětlen níže.

2.5 Polymorfismus

Každý jedinec se může rozeznat tím, že nějaký úsek v sekvenci DNA je jiný od druhého jedince. Polymorfismus se převážně studuje v populacích, ve kterých může existovat více než 1 % jedinců, kteří mají tu samou záměnu sekvence DNA. Pokud taková skupina v populaci existuje ve větším množství, než je 1 %, předpokládá se, že selekce DNA není ničivá pro jedince, ve kterém se vyskytuje. Sekvence DNA tak z populace nemusí vyhynout přírodním výběrem. Vliv polymorfismu na jedince nemá buďto žádný účinek, fenotyp se nemění, nebo vliv polymorfismu je malý. Jestliže polymorfismus působí v malé formě, pomáhá, aby jedinci v populaci byli heterogenní, ale zároveň nemá takovou sílu, aby se začal vyskytovat v celé populaci a nemohli vzniknout jiné variace polymorfismu v populaci (Doležal, 2018).

3 DNA v biologické stopě

3.1 Biologický materiál jako stopa

„Jako biologický materiál obecně označujeme vše, co bylo či je součástí nebo produktem živého organismu. Biologický materiál tak může mít nesmírně mnoho podob.“ (Šimková, 2012). Biologický materiál, který je nalezen na místě činu, se definuje jako biologická stopa (Beran et al., 2012).

Pokud jde o kriminalistiku, je zkoumán rostlinný a živočišný, zvířecí či lidský, materiál. Jestliže se potvrdí, že biologický materiál je živočišného či rostlinného původu, vyšetřovat se již dále nebude. Zkoumají se jen v určitých případech, například k určení drogy, vyšetřování úhynu drahých zvířat nebo se zkoumá živočišný materiál, pokud zvíře napadne člověka. Nejvíce je vyšetřován biologický materiál lidského původu (Suchánek, 2000).

Biologické stopy se člení podle různých způsobů dělení, a to dle oddělení lidského těla, dle místa kde se biologická stopa nalezne, podle trestně právní činnosti, na základě přiřazení biologického materiálu k člověku.

3.1.1 Biologická stopa, podle oddělení od lidského těla

- 1) Biologický materiál, který se odštěpí od lidského organismu samovolně:
 - Mezi takové to materiály patří, například, moč, pot, stolice, sliny, spontánně vypadlé vlasy či chlupy, ejakulát či nosní nebo poševní sekrety.
- 2) Biologický materiál, který se odloučí od lidského organismu vlivem působení vnějších faktorů na člověka:
 - Do těchto materiálů patří krev či různé části tkání.
- 3) Biologický materiál, který se uchová ze zesnulého člověka
 - Do této skupiny patří kosti či jejich části (Koukal, 2005).

3.1.2 Biologická stopa podle místa nalezení

- 1) Místo trestního činu
- 2) Předměty a nástroje trestní čin jimi spáchané
- 3) Tělo a oděv pachatele
- 4) Tělo a oděv oběti
- 5) Vozidla, která se zúčastnila trestného činu

6) Další místa, kde se mohl biologický materiál zachytit (Straus et al., 2004),

3.1.3 Biologická stopa dle trestně právní činnosti, na základě přiřazení biologického materiálu k člověku

- 1) Oběť
- 2) Pachatel
- 3) Spolupachatel
- 4) Poškozená osoba (Suchánek, 2000).

Aby se mohly stopy zajistit, je nutné je nejdříve najít. Stopy, které je možné zaznamenat pouhým okem, se nazývají viditelné stopy. Najdou se např. při prohledávání místa činu či ohledávání mrtvol. Existují ale stopy, které jsou obtížně viditelné či vůbec neviditelné, ty se vyznačují jako latentní stopy. Kriminalisté jim také říkají materiální stopy. U latentních stop se musí využívat různé speciální metody, aby byly stopy nalezeny, např. infračervené či ultrafialové záření apod. (Porada, Suchánek, Straus, 2005). Biologické tělní tekutiny jako je například sperma, vaginální sekret, moč, pot, sliny, má schopnost tzv. fluorescence, ale je důležité, aby byly biologické tělní tekutiny osvětleny správným UV světlem, které má správnou vlnovou délku. UV lampy velice usnadňují kriminalistům práci (Advanced NTD Ltd, 2018).

Infračervené záření přijímá delší vlnové délky, oproti ultrafialovému záření, které přijímá kratší vlnové délky. Mezi infračerveným a ultrafialovým zářením se nacházejí frekvence viditelného světla. Posloupnost jde takto: červené, oranžové, žluté zelené, modré a fialové (Penven, 2011).



Obr. 2. Použití ultrafialového záření k nalezení biologického materiálu (HiTech Ltd., 2005).

Biologické stopy lze zajistit třemi metodami. První metodou je *in natura*, která zajišťuje předmět či jeho část, na kterém se stopa vyskytuje, např. krev na noži. Na této metodě je dobré, že DNA není nijak narušena, naopak se s předmětem musí zacházet opatrně, aby se nerozbil při transportu do laboratoře. Vždy se biologická stopa nedá zajistit a převést do laboratoře. Například otisk, který se nachází na klice dveří od domu, se musí odebrat nebo pokud je důležitá při vyšetřování stopa podrážky bot v hlíně, která může patřit pachateli, je nutné ji odlít, respektive udělat kopii stopy. Kopie stopa je tedy druhou metodou, která se využívá při zajišťování. Poslední metodou je fotografování. Každou stopu, co se najde na místě činu, je nutné vyfotografovat (Baizová, 2014).

3.2 Charakteristika biologického materiálu obsahující DNA

Pokud se zkoumá biologický materiál, hlavním úkolem je zjistit pravého původce. Od tkáňového původu biologického materiálu se určí druhový původ, neboli jakému organismu materiál náleží (lidský nebo živočišný) a tedy ke komu materiál přiřadit, viz obrázek číslo 2. Tkáňový původ má také určit, o jaký typ biologického materiálu se jedná, tedy jestli byla nalezena krev, sliny, trichologický materiál, kost, ejakulát atp. (Šimková, 2012).

3.2.1 Krev

Krevní stopy se objevují v různých typech, od krevních kaluží, kapek, cákanců až po stružky. Existují krevní stopy, které jsou druhotného původu. Jde o krevní otěry a otisky. Podle tvaru krevní stopy a místa, kde se nachází, může být naznačen původ krve (Koukal, 2005). Krev je velice důležitý biologický materiál v kriminalistice. Z krve se může zjistit jak krevní skupina, tak se využívá k analýze DNA jako důkazní materiál k identifikaci jedince (Štefan, Mach, 2005).



Obr. 3. Snímání krve na místě činu (Brennan, 2018).

3.2.2 Ejakulát

Ejakulát je bělavého zbarvení. Obsahuje spermie a pohlavní výměšky, které produkují přídatné semenné žlázy. Muž, který je zdravý, může vyprodukovat až 100×10^6 ejakulátu (Štefan, Hladík, et al., 2012). Skvrny ejakulátu se převážně zkoumají při trestné činnosti, kde je předmětem vyšetřování např. znásilnění. Skvrny se mohou objevovat na různých materiálech nebo v pochvě ženy. Pokud se ve vzorku z výtěru pochvy vyskytnou spermie, může se vzorek poslat k DNA analýze a napomoci identifikovat pachatele (Hirt, Vorel, et al., 2016).

3.2.3 Sliny

Taktéž sliny se používají k analýze DNA, ale je nutno dodat, že se v nich nenachází velký výskyt deoxyribonukleové kyseliny, naopak (Rak, Matyáš. Říha, et al., 2008). Sliny se skládají ze tří složek. Z vody, anorganických a organických látek. Voda se ve slinách objevuje v 99 %, anorganické látky jsou ve slinách v 0,3 % množství iontů (Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+) a obsahují 0,3 % organických látek (mucin, ptyalin) (Štefan, Hladík, et al., 2012).

3.2.4 Trichologický materiál

Do tohoto materiálu patří vlasy a chlupy. „*Je to cylindrický epithelový útvar zanořený do dermis*“ (Čihák, 2016). K tomu, abychom určili jedince, kterému daný vlas či chlup patří, zkoumá se jaderná DNA, která se nachází v koříncích spolu s epiteliálními pochvami. Pokud se nenalezne celý vlas na místě činu, je možné použít vlasové fragmenty, ze kterých se poté zjišťuje mitochondriální DNA (mtDNA) jednice, může také určit krevní skupinu jedince, a tak tak slouží jako důkazní materiál (Štefan, Hladík, et al., 2012).

3.3 Primární a sekundární přenos DNA obsažené v biologickém materiálu

Jestliže se biologický materiál s DNA aplikuje na jakýkoliv objekt, mluví se primárním přenosu DNA. Jako příklad se může uvést, kdy se osoba pořeže, svoji krev přeneše na papírový kapesník, kterým si zakrývá ránu. Sekundární přenos se uskutečňuje v laboratoři nebo na místě činu, při odebírání biologického materiálu. Musí se dávat pozor, aby se nevytvořila falešná DNA (Štefan, Hladík, 2012).

4 Zajišťování vzorků pro forenzně genetické zkoumání na místě činu

Pokud se má biologická stopa vyšetřovat, musí se dávat velký pozor aby:

- 1) nedošlo ke zničení biologické stopy neboli k degradaci
- 2) bylo zajištěno co největší kvantum biologických stop, což se netýká stop rozsáhlých, zde stačí fragment každé stopy
- 3) nedošlo ke smíchání biologického materiálu s jiným, čímž by byl kontaminován a dále nepoužitelný (Šimková, 2012).

4.1 Degradace DNA

K degradaci DNA může dojít působením biologických, fyzikálních či chemických jevů, během nichž se může DNA závažně poškodit až zcela rozbít. Mezi faktory, které mohou porušit DNA, patří např. UV záření, různé chemikálie, teplota, bakterie nebo vlhkost (Šimková, 2012). Pokud UV záření působí na DNA, může dojít k poškození pyrimidinových bází (Masarykova univerzita, 2007).

4.2 Množství biologické stopy

Na místě činu je nejlepší zajistit celý předmět, pokud tato varianta není možná, je dobré zajistit alespoň tu část, kde se nachází biologická stopa. Pokud se bere jen část předmětu, můžeme ji např. odlomit či vystříhnout. Jestliže se předmět či jeho kus nedá odebrat a vzít do laboratoře, musí se na místě činu biologická stopa sejmut.

Biologická stopa se může sejmut pomocí seškrabávání či odloupení z předmětu. U těchto dvou metod se musí dávat pozor, aby se stopa neztratila či nebyla odfouknuta. Vhodnější metodou je gáza namočená např. v destilované vodě. Vlhkou gázou setřeme biologický materiál z předmětu, poté se nechá v pokojové teplotě, kvůli uschnutí (Porada, Suchánek, Straus, 2005). Kromě gázy se využívají různé pomůcky k odebrání biologického materiálu, například vatové tyčinky, sterilní tampón v tubě atd.



Obr. 4. Sterilní tampón v tubě, pomocí něhož se odebírá biologická stopa (Krimi-LTsezam, 2018).

4.3 Kontaminace DNA

Kontaminace je velice závažný problém. Biologický materiál, který obsahuje DNA, může být kontaminován jinou DNA (Státní archeologický ústav, 2007).

DNA se může kontaminovat kdekoliv a kdykoliv. Předtím, než se vůbec trestný čin stane. Mezi trestným činem a prací policie při zajišťování místa, kde se čin stal, v průběhu vyšetřování na místě činu či přímo v laboratoři (Oorschot et al., 2010).

4.4 Postupy při zajišťování vzorků DNA pro analýzu

Aby se vyhnulo kontaminaci DNA je nutno dodržovat určitá pravidla:

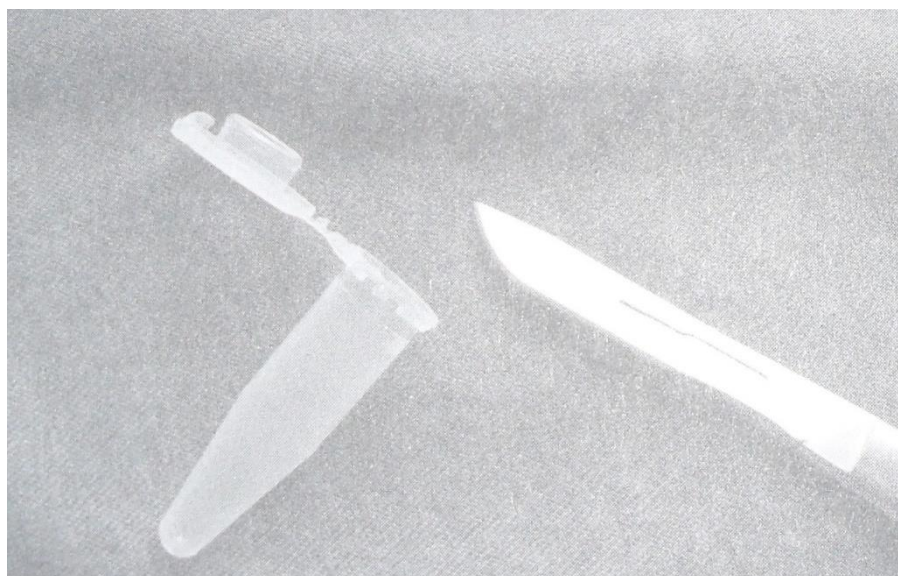
- 1) Jedinec odebírající biologický materiál či jen osoba, která je u odběru, má na sobě ochranné prostředky. Například u vyšetřovatele jsou na rukách rukavice, na botách má návleky, přes ústa upevněnou roušku.
- 2) Pokud se zabezpečují vzorky biologického materiálu, používané prostředky musí být certifikované, jestliže nejsou, může dojít k samotné kontaminaci.
- 3) Při odebírání vzorku nemůže jedinec, který provádí odběr či osoba odběru účastněna, kýchat, kašlat nesmí se u něj objevit zranění, která jsou povrchová a mohou krváčet.
- 4) Je dobré pracovat s prostředky na jedno použití, např. plastové pinzety atd.
- 5) Prostředek, který se používá pro odebírání více vzorků, je nutné po každém odebrání pečlivě očistit. Následně se čisticí prostředek důkladně sejme, jelikož kdyby se nesejmul, může dojít ke ztrátě DNA.
- 6) Pracovník si po každém odebraném vzorku musí vzít nové gumové rukavice.
- 7) Každý vzorek se vkládá do samostatných obalů. Tím se předchází kontaminaci vzorků.
- 8) Je důležité mít DNA osob účastněných při odběru.
- 9) Dává se pozor také na psací potřeby, kterými se popisují jednotlivé obaly se vzorky. Psací prostředky jsou tedy také očištěny. Pokud by se neočistily, může dojít ke kontaminaci, jelikož se na ně může přenést přes rukavice jiný odebíraný vzorek.
- 10) Pozor na vzorek neznámého původu, mohl by obsahovat nebezpečné původce nemocí (Štefan, Hladík, et al., 2012).

4.5 Specifika odběrů jednotlivých druhů biologického materiálu

4.5.1 Krev

- 1) Drobnější předmět obsahující krev se vezme celý.
- 2) Krev v tekutém stavu se odebere pomocí např. tamponů. Uschlá, při pokojové teplotě, je pak vložena do mikrozkravky.
- 3) Uschlá krev se seškrábe do obálky, zároveň se také seškrábe podkladový materiál bez krve.

- 4) Rozpuštěná uschlá krev se např. v destilované vodě nasaje do gázy a poté se musí nechat v pokojové teplotě. Dále je zajištěn i podkladový materiál bez krve.



Obr. 5. Zajištění krevní stopy pomocí seškrabávání skalpelem (Vaněk, 2011).

4.5.2 Sliny a sperma

- 1) Zaopatřit buď celý či část zasaženého objektu. Dále jsou stopy vloženy do jednotlivých obalů.
- 2) Musí se zaopatřit i srovnávací materiál, ať už ve formě zaschlé sliny z místa činu či odebrané krve pachateli.

4.5.3 Trichologický materiál

- 1) Vždy se při odběru používá ruka, a nikoliv nástroj z kovu.
- 2) Trichologický materiál se vkládá do papírové obálky.
- 3) Od podezřelé osoby se vezme kontrolní vzorek, tím způsobem, že je vytrhnut z hlavy. Celkem se bere 5 kontrolních vzorků, které jsou odebrané z pěti různých míst na hlavě.
- 4) Trichologický materiál je vždy popsán na obálce, kde je napsaná i informace, z jaké části těla pochází (Vichlenda, 2011).

4.6 Individualita a identifikace

Každý člověk má jedinečný genetický profil, podle kterého lze jedince identifikovat. „Slouží k jednoznačné identifikaci jedince, či může posloužit k určení rodičovství (mimo jiné). GP je soubor znaků, které jsou pro každého jedince nezaměnitelné a jedinečné. Jde vlastně o otisk prstu v přeneseném slovním významu“ (Čílová, 2015).

Tento profil jedince se určí z biologického materiálu, který se následně porovná s referenčním vzorkem. Buďto se ověří nebo popře identita jedince (DNA centrum Bulovka, 2010). Samotný proces identifikace biologického materiálu má sérii postupů jdoucích popořadě. Aby se dostalo spolehlivých výsledků, žádný z dílčích nesmí obsahovat chybu. Metody, podle kterých je vzorek zkoumán určuje sám analytik. Pokud na vzorek aplikuje chybnou metodu, je pravděpodobné, že dojde k falešně pozitivním či falešně negativním výsledkům. Převážně se to může stát u stop mikroskopické velikosti, jelikož se používá celý vzorek a měření tak nejde znovu opakovat (Vaněk, 2011).

Každé individuum má ale také zároveň specifický genetický a fyzikální charakter.

- Genetické individuum

Začátky existence jakékoliv osoby počínají splnutím vajíčka se spermií, kdy se oplodí vajíčko a vznikne tak zygota (Šipr, 2007). Když se zygota dělí, její nově vzniklé buňky obsahují téměř stejnou genetickou informaci jako původní, tím se vytváří genetické individuum, jinak nazývané geneta (Šimková, 2012).

- Fyzické individuum

Pojem fyzické individuum (rameta) představuje určitou osobu, která je prostorově vymezena. Každá rameta člověka je chápána jako jednotka ve společnosti (Šimková, 2012).

4.7 Důkazní potenciál stopy

Počátek dotazování se zakládá na různých hypotézách, které se následně zkoumají. Nově zjištěná fakta určují, která z verzí je pravděpodobnější a která ne. Podobný postup se využívá také při analýze DNA. Jestliže se za pomoci DNA analýzy potvrdí alespoň částečně pravdivost některé z hypotéz, druhá může až zcela zaniknout.

Důkazní potenciál stopy vzniká z:

- 1) apriorní těsnosti vazby stopy ke skutku
- 2) očekávané rozdílnosti výsledku příslušného znaleckého zkoumání za platnosti jednotlivých zvažovaných hypotéz (Šimková, 2012).

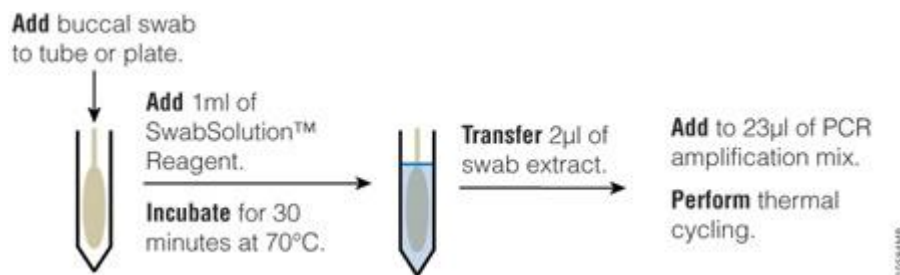
5 Hlavní proces analýzy DNA

Jak již bylo dříve zmíněné, pokud se na místě najde biologický materiál, je nutné materiál odebrat, uložit ho do speciálních obalů a následně ho dopravit do laboratoře, kde proběhne jeho analýza.

5.1 Izolace DNA

Je zapotřebí získat z biologického materiálu pouze DNA, tedy DNA nemůže obsahovat žádné jiné komponenty. Biologický materiál se tedy rozbije a zlikvidují se komponenty, které by mohly narušit zkoumanou DNA. Mohou to být například enzymy. Po odstranění všech přebytečných složek vzniká izolát, tedy vzorek DNA, který je připraven k analýze (Rak, Matyáš, Říha et al., 2008).

DNA se izoluje různými metodami, např. pomocí FTA papírků (obsahují látky, které se podílí na rozkladu buněk, denaturaci bílkovin a zároveň chrání nukleové kyseliny před nukleázami (VWR, part of avantor, 2018)), fennol-chloroformové metody či chelexové metody (Hirt, Voler et al., 2016). Je ale nutné dodat, že už se vyskytují prostředky, při jejichž použití není zapotřebí projít zdlouhavým procesem DNA izolace. Mezi tyto prostředky patří např. SwabSolution Kit (Šimková, 2012).



Obr. 6. SwabSolution Kit (DISTRIBUIDORA COMERCIAL ZOGBI, 2018).

5.2 Kvantifikace DNA

Kvantifikace se zabývá zmnožením neboli amplifikací izolované DNA (izolátu). Kvantifikace má na starosti, aby izolátu nebylo málo či naopak mnoho (Rak, Matyáš, Říha et al., 2008). Používají se různé metody namnožení, např. polymerázová řetězová reakce (PCR) (Tellier, Bukh, et al., 2003). O této metodě se píše níže v kapitole číslo 6.

5.3 Separace namnožených úseků na sekvenátoru

Amplifikované úseky DNA následně projdou analýzou pomocí kapilární elektroforézy, na jejímž základě jsou rozděleny dle velikosti (Štefan, Hladík, et. al., 2012). V každé DNA se vyskytují fosfátové skupiny, které nesou záporně elektrický náboj. Záporné náboje se pohybují různou rychlostí ke kladné anodě, ale pohyb je omezen médiem, např. gelem. Tím pak dojde k separaci na jednotlivé úseky různé délky (Šimková, 2012). Přístroj, ve kterém dochází k analýze, se nazývá sekvenátor.

Sekvenátory mají programy (např. GeneScan či GeneMapper), do kterých se po separaci namnožených úseků na sekvenátoru vkládají data, která následně analyzují. Z výsledků analýzy se určí genetický profil (Štefan, Hladík, et. al., 2012).

Následně se DNA profil vloží do databáze, kvůli porovnání s dalšími profily. DNA profil se v databázi může ztotožnit s již uloženým profilem nebo je nový a do databáze bude tedy uložen pro další porovnávání. Jestliže se DNA profil shoduje s jiným profilem, může to být v různé vazbě, např. místo činu a osoba či osoba a osoba. Tyto výsledky musejí být statisticky zaznamenány, aby se mohly oznámit jako znalecký posudek. Zkoumané vzorky jsou zajištěné a uložené pro případné další přezkoumání (Štefan, Hladík, et. al., 2012).



Obr. 7. Sekvenátor značky Beckman Coulter (Bártová, 2011).

6 Vybrané metody forenzní analýzy DNA v kriminalistice

Každá osoba na Zemi má stejných 99,9% lidské DNA, tedy jen 0,1% lidské DNA se u každého člověka liší (Lander, 2008). Metody DNA finferprintingu využívají kriminalisté pro srovnávání vzorků DNA a následné identifikaci pachatele (Anonymus, 2018). Pro forenzní analýzu DNA se využívají genetické makery jako, tandemové opakování s variabilním číslem (VNTR), krátké tandemová repetice (STR), jednonukleotidový polymorfismus (SNP), polymorfismus délky restričního fragmentu je (RFLP) a náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD). Také se využívají metody sekvenování DNA a polymerázová řetězcová reakce (PCR)

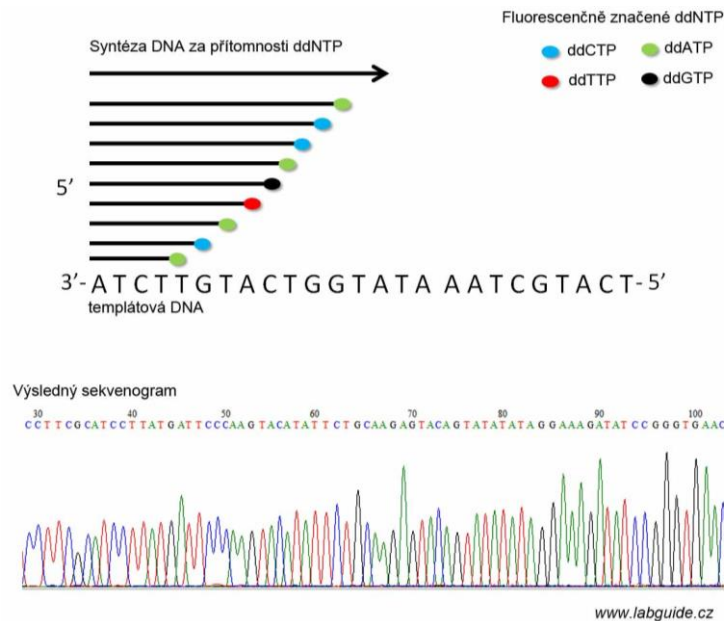
6.1 Sekvenování DNA

Pojem se také jinak dá nazvat jako sekvencování nebo zjednodušeně čtení DNA. Sekvencování DNA pracuje tak, že stanovuje v DNA pořadí nukleotidů. Do sekvencování DNA patří metoda Sangerova či metody druhé generace (next generation sequencing) (Kolísko, 2017).

6.1.1 Sangerovo sekvenování

Sangerovo sekvenování je jednoduchý a rychlý způsob, který určuje nukleotidové sekvence, které se nacházejí v jednovláknové DNA (Sanger, Coulson, 1975). Metoda používá krátké sekvence, které se dávají do reakční směsi. Reakční směs se skládá z templátové DNA, jednoho primeru, z velkého množství deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP), z mála dideoxynukleosidtrifosfátů (ddNTP) a DNA polymerázy. Na konci procesu se v směsi objevují sekvence DNA jakékoliv délky, začínající primerem a končící dideoxynukleotidem. S použitím gelové elektroforézy se úseky DNA rozčlení podle délek (Bártová, 2011).

Ze směsi jsou výsledkem sekvence odlišných délek sekvencí DNA, u kterých je na začátku navázaný dideoxynukleotid. Sekvence se dají do polyakrylamidového gelu a následně začne elektroforéza, která srovná DNA sekvence podle jejich délky (Rédei, 2008). Poté pomocí elektroforetických gelů se stanoví, jak jdou nukleové báze za sebou v sekvenci DNA, která se studuje (Robert, et al., 2006).



Obr. 8. Sangerovo sekvenování (LabGuide, 2015).

6.1.2 Andersonova sekvence

Andersonova sekvence je také označována jako Cambridgská referenční sekvence (CRS), pomocí níž se analyzuje mitochondriální DNA (mtDNA). Hlavním principem je porovnávání změn mitochondriální sekvencí se standardem Andersonovy sekvence. (Štefan, Hladík, et. al., 2012).

Mitochondriální DNA je převážně z kódujících sekvencí. Extragenová DNA se vyskytuje jen v tzv. D – kličce. Uprostřed kličky se nachází bod H, ve kterém se mitochondriální DNA kopíruje. Okolo bodu H jsou hypervariabilní úseky I, II (HVR I, HVR II), které se nekódují. U člověka se v mitochondrii nachází tři hypervariabilní úseky HVR, z toho je HVR III jen doplňková. Na základě analýzy mitochondriální DNA se nedá identifikovat jedinec, ale v kriminalistice se využívá, když se jaderná DNA velice těžce analyzuje či jadernou DNA vůbec není možné analyzovat, např. degradovaný kosterní materiál nebo vlasy bez kořínků a porovnává hypervariabilní úseky. Když se hypervariabilní úseky jedince neshodují, může se vyloučit z podezřelých osob ve vyšetřování (Šimková, 2012).

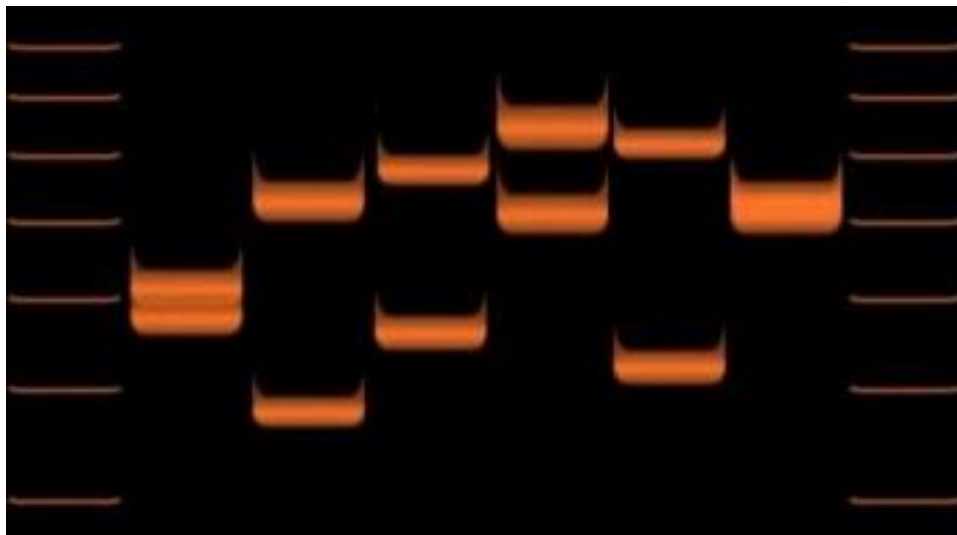
6.2 VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

Šimková (2012) popisuje variabilního počet tandemových opakování či jinak zvanou minisatelity. Pracuje na principu repetitivní sekvence. Pod pojmem

repetitivně sekvence, se chápe sekvence, která se v DNA objevuje několikrát ve stejné podobě. Pokud se stejné sekvence řadí vedle sebe, označují se, jako tandemové sekvence (satelity), jestliže jsou volně řazené, nazývají se rozptýlené sekvence. Sekvence se mohou opakovat v malém množství či po stovkách repetice vedle sebe. Alely se v metodě liší počtem opakování a tím pádem i svou délkou.

Tandemová sekvence se dělí na základě toho, kolikrát se opakuje:

- 1) Minisatelitní sekvence – 10 až 20 opakování
- 2) Mikrosatelitní sekvence – 2 až 5 opakování
- 3) Makrosatelitní sekvence – 100 až 6 500 opakování (Otová, Mihalová, 2012).



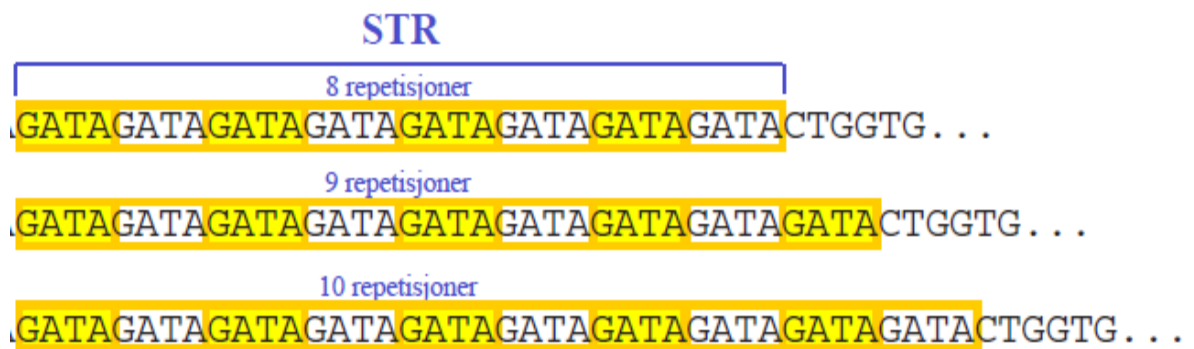
Obr. 9. Variabilního počet tandemových opakování u 6ti různých lidí (Anonymus, 2008).

6.3 STR (Short Tandem Repeats)

Krátká tandemová repetice (mikrosatelity) je také založena na principu repetice sekvence, ale zde se opakuje jen několik nukleotidů (2-9) (Beránek, 2016). Podle opakování jsou mikrosatelity klasifikovány na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- a hexanukleotidové repetice. Nejvíce vyskytující krátká tandemová repetice v lidském genomu, je dinukleotidová repetice (Szustakowski, 2001).

Oproti VNTR se sekvence v STR opakuje párkrát až po desítky repetice. Kvůli menšímu množství opakování je krátká tandemová repetice o dost kratší, ale jak

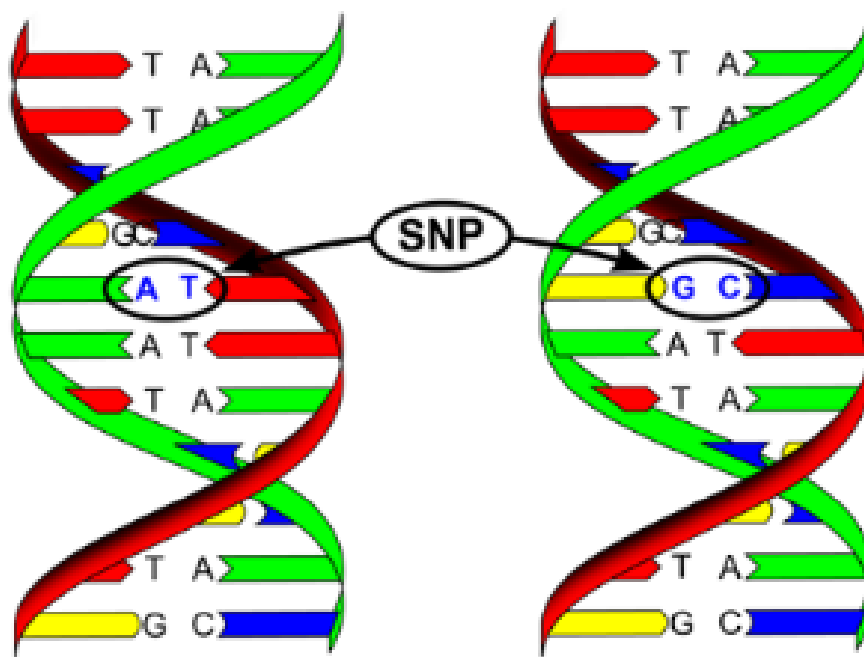
VNTR tak STR má přesně dané místo na chromozomu v DNA (Šimková, 2012). STR lokusy se objevují na všech 23 párech chromozomů. Existují jich až tisíce a celkově se v lidském genom nachází okolo 3 %. Pokud má proběhnout genetická analýza lidské DNA, musí se využít pětinukleotidově či čtyřnukleotidové lokusy STR. STR lokusy (mikrostaely) jsou velice variabilní, kvůli genetickým markerům. Pomocí STR lokusů se provádí analýza chromozomu X či analýza chromozomu Y (Šimková, 2012).



Obr. 10. Tři rozdílné vzorky krátkých tandemových repetitiv (Norway DNA Norgesprosjektet, 2013).

6.4 SNP (Single-nucleotide polymorphism)

Neboli jednonukleotidový polymorfismus spočívá v tom, že porovnává změny jednotlivých nukleotidů v sekvencích (Petr, 2017).



Obr. 11. Ukázka záměny nukleotidů (TubaScan, 2018).

6.5 RAPD (Random-amplified polymorphic DNA)

„Metoda RAPD je založena na amplifikaci genomové DNA metodou PCR (polymerázová řetězová reakce) s využitím krátkých oligonukleotidů“ (Kulovaná, 2001). V náhodné amplifikaci polymorfní DNA je postup takový, že primery (oligonukleotidy) se spojí se sekvencí DNA, ve vzdálenosti 4 000 bp. Následně tyto oblasti procházejí množením (amplifikací). Je také nutné dodat, primer se skládá z 10 nukleotidů (Fér, Flašková, 2009). Poté se primery opět oddělují od sekvence DNA na základě délky pomocí elektroforézy (Sugavanam, 2011). Následně se jednotlivé úseky obarví za pomoci ethidiumbromidemu (Treuren, 2018).

U náhodné amplifikace polymorfní DNA je výhodou, že pro analýzu stačí použít krátký úsek DNA (Sugavanam, 2011).

6.6 RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Polymorfismus délky restričního fragmentu je: „Metoda, jejíž podstatou je enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restričním) místě enzymem, který se nazývá restriční endonukleáza“ (Bártová, 2011).

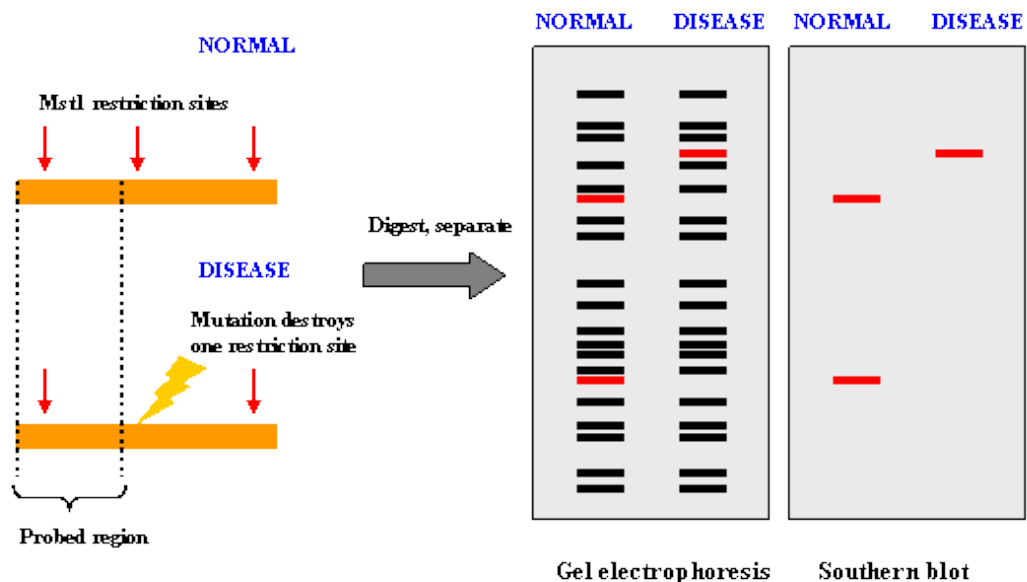
Existuje cca 1500 restrikčních endonukleáz (RE) a jakákoliv z nich je specifická tím, že rozpoznává jinak dlouhé úseky sekvencí nukleotidů a následně štěpí DNA na specifické úseky odlišné délky. Dlouhé úseky DNA se štěpí méně, než krátké úseky DNA. Ty se štěpí více, jelikož jsou častější. (Průša et al., 1998).

Poté se vzniklé úseky se za pomoci elektroforézy s gelem rozdělí do jednotlivých kategorií (Bártová, 2011). Porovnání DNA vzorků se uskutečňuje na bázi polymorfismu, kde se porovnává délka vzniklých fragmentů. Buďto jsou místa štěpení přítomná či nepřítomná (Průša et al., 1998).

Nevýhodou RFLP je použití četného množství DNA. Dále se při této metodě musí používat radiaktivní sondy, aby fungovala (Štefan, Hladík et al., 2012).

6.6.1 Postup metody RFLP

- 1) Nejdříve je nutné připravit reakční směsi. Směs obsahuje restrikční endonukleázu v určitém množství spolu s produktem PCR.
- 2) Poté se reakční směs inkubuje v teplotě 37 °C. Inkubace probíhá 1 hodinu.
- 3) Nakonec se porovnávají oddělené úseky DNA na agarózovém gelu a celkově se hodnotí výsledky metody (Bártová, 2011).



Obr. 12. Princip metody RFLP (NCBI, 2017).

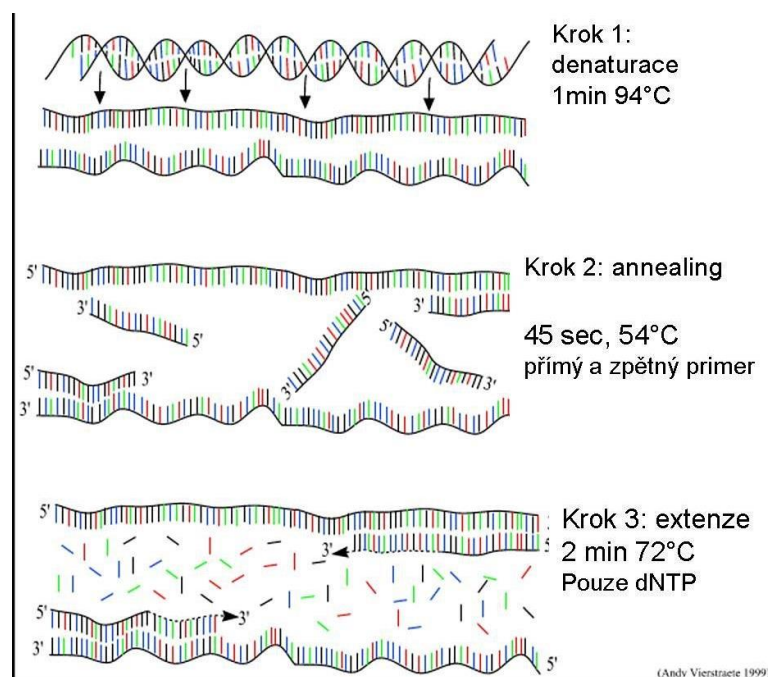
6.7 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězcová reakce se zrodila v Kalifornii v roce 1983, ve městě Emeryville, kde se nachází společnost Cetus Corporation (Bartůňková, Paulík at Al., 2011). Za jejím vznikem stojí Kary B. Mullis. Za objev PCR Kary B. Mullis získal Nobelovu cenu (Tang, Stratton, 2006). Zásadou metody PCR je zmnožení, neboli amplifikace určitého místa řetězce DNA ve zkumavce (in vitro) za vzniku velkého počtu kopií daného řetězce DNA ve třech různých teplotních intervalech (Bartůňková, Paulík at Al., 2011). Za vybrané místo, které je metodou PCR zmnožené, mohou primery (oligonukleotidy) (Štefan, Hladík et al., 2012).

Polymerázová řetězcová reakce probíhá v zařízení zvaném thermocykler, který je nařízený tak, aby byly zachované teplotní podmínky při změnách teplotních intervalů v procesech. Reakční směs PCR je složená z DNA odebrané ze vzorku, primery, nukleotidy A, G, C, T a DNA polymerázu např. Taq (Otová, Mihalová, 2012).

6.7.1 Postup metody PCR

- 1) Denaturace DNA za teploty 95 °C, kdy se dvě vlákna rozdělí, resp. vodíkové můstky uvolní svoji vazbu.
- 2) Nasedání primerů na vlákna DNA. Tato část probíhá za teploty, která klesne na 50 – 60 °C.
- 3) Aktivace enzymu Taq DNA polymeráza. Enzym se spojuje s primery, na každém jejich konci a pomáhá spojovat nukleotidy s DNA. Tím vzniknou 4 DNA vlákna. Vše se děje při 74 °C.



Obr. 13. Postup při PCR (Anonymus, 2018).

Procesy se neustále opakují, denaturace, připojení a vznik více vláken DNA. Jestliže se proces opakuje 25x, z jednoho dvouvláknového vlákna se syntetizuje přes 50 milionů nových dvouvláken, které obsahují DNA informaci (Brown, 2007).

6.7.2 Varianty PCR využívané v kriminalistice

- Multiplex PCR

Polymerázová řetězová reakce, která množí více úseků deoxyribonukleové kyseliny ve stejný čas, kde se připojuje až několik skupin primerů (Penka, Tesařová et al., 2011).

- Asymetrická PCR

Vyrábí se jenom jedno vlákno z dvouvláknové DNA, výsledkem je tedy jednovláknová DNA, která se využije při sekvencování.

- Nested PCR (odstupňovaná PCR)

Nejdříve se zmnoží úsek DNA, která na sebe naváže dva oligonukleotidy. Poté následuje reakce zvaná „nested“. Při této reakci se využívá templát získaný z předchozí reakce. U templátu se opět využívají nové oligonukleotidy (Průša, et al. 1998).

- Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

Reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) využívá izolovanou mRNA, Za použití reverzní transkriptázy, se vytváří komplementární DNA (cDNA). Komplementární DNA se následně amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Farrel, 2010).

- Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real- time PCR)

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase je založena na postupech, kterými se řídí polymerázová řetězová reakce (PCR), avšak oproti PCR umožňuje zaznamenávat amplifikaci během polymerázové řetězové reakci (PCR), tedy v reálném čase. Na základě fluorescence je založena amplifikace (Anonymus, 2018).

7 Interpretace

Po celkové genetické analýze je třeba zhodnotit data, která byla získána. Nejdříve se stanoví tak zvaná míra spolehlivosti dat, která se hodnotí podle předem stanovených faktorů. Je důležitá jak metoda, která se použila při analýze DNA, tak zkoumaný proces, který proběhl v laboratoři, kvůli tomu, jestli byly nějak ovlivněné výsledky a či se v procesu nevyskytla jakákoliv chyba. Dále zaleží na tom, aby dva zkoumané stejné vzorky dané DNA, získané z genetické analýzy, souvisely nebo souhlasily. Také získaná data musí být kvalitní. V neposlední řadě zkušený pracovník, pracující s těmito daty, jim musí rozumět a musí umět je správně interpretovat. Pohlíží se také na to, jak výsledky předem daných hypotéz ovlivňují celkovou pravděpodobnost dat z forenzně genetické analýzy (Šimková, 2012).

Stává se, že výsledná data nejsou dostatečně kvalitní, u nich je pak nutné pokusit se o nápravu a zvýšení kvality. První analýzou proces tedy nekončí a několikrát se opakuje, s tím rozdílem, že nastávají obměny, např. jiný počet vstupní DNA do polymerázové řetězcové reakce (PCR). Hlavním úkolem je snaha pokusit se získat co nejčitelnější data. Je důležité zdůraznit, že v některých případech ani obměny v analýzách nepomohou a data jsou nepoužitelná (Šimková, 2012).

7.1 Kvalita v laboratoři

O kvalitu v laboratořích se stará akreditace a certifikace.

- Akreditace

Jde o to, zdali je laboratoř kvalifikovaná pro určité činnosti či zkoušky. Jde o formální stránku, kdy ověřená instituce vystaví laboratoři potvrzení, že osoba či orgán jsou natolik schopné danou činnost kvalitně vykonávat. Hlavním cílem je, aby se v institucích zvyšovala celková kvalita (Šimková, 2012).

- Certifikace

Certifikace definuje např. postup, který se musí dodržovat podle normativního dokumentu (Bartůňková, Paulík at Al., 2011).

7.1.1 Výběr vhodné metody na analýzu

Jak již bylo zmíněno dříve, volba vhodné metody pro následnou forenzně genetickou analýzu má na starosti validace, která využívá izolační soupravy (kity), které pomáhají zlehčit průběh získávání vzorku DNA k analýze. Nutno dodat, že se kity získávají komerční cestou (Bártová, 2014). Validované kity je nejprve nutné verifikovat (Šimůnková, 2012). Verifikace se chápe jako ověření, které bylo provedené na základě předem uvedených dat např. referenční institucí či jinou laboratoří získaná v dané laboratoři (Štambergová, 2012).

7.1.2 Průběžné ověřování výsledků z DNA analýzy

Výsledky, které vzniknou DNA analýzou, ověřují svojí kvalitu a správnost dat metodou zvanou okružní testy, které spočívají v tom, že se do participujících laboratoří posílají vzorky různého druhu, např. sliny, sperma či krev. V participujících laboratořích jsou poté testovány a vráceny zpět s náležitou analýzou (Vaněk, 2011). Ověřovací testy se v různém časovém horizontu opakují (Šimková, 2012).

7.2 Inferenční logika hodnocení dat

Inferenční logika pracuje na základě pravděpodobností a hypotéz. Jsou-li dané různé hypotézy. Po forenzně genetické analýze se z výsledků a přidružených informací stanoví pravděpodobnost, která posílí pravděpodobnost jedné z hypotéz, ale zároveň jinou hypotézu oslabí či zcela vyvrátí. Inferenční logika převážně zkoumá tři druhy hypotéz. První hypotéza se zajímá o vzorek autora, který může být totožný či rozdílný. Druhá hypotéza zkoumá, zda-li se biologický materiál nachází ve smíšené stopě, biologický materiál může být tedy přítomný nebo nepřítomný. Poslední, třetí hypotéza, testuje příbuznost či nepříbuznost mezi dvěma jedinci (Šimková, 2012).

7.2.1 Postup znalce při určování hodnoty důkazu

- 1) Na základě předem daných alternativních hypotéz. Znalec zkoumá jejich správnost na základě dat získaných z analýzy, k tomu se používá Bayesův faktor (Šimková, 2018).
- 2) Studuje četnost faktorů, které se nacházejí v populaci (Relichová, 2003).
- 3) Sleduje změny lokusů v DNA, které mohou přijít (mutace).
- 4) Vyhodnocuje, jak jsou získaná data spolehlivá.
- 5) Bere na vědomí kolik je možných pachatelů atd. (Šimková, 2012).

8 Chyby ve forenzně genetické analýze

Chyb se nikdy nedá zbavit. Můžou nastat kdykoliv, kdekoliv, v čemkoliv a udělá ji každý člověk, jev či věc, zkrátka chyby jsou normální a to i ve forenzní genetice. Jestli nastane ve forenzní genetice chyba, je důležité najít zdroj, za kde a za jakých okolností vznikla a popsat ji. Také se musí charakterizovat její důsledky. Nakonec je snaha zdroj chyby odstranit nebo zmenšit pravděpodobnost vzniku dalších chyb (Šimková, 2012).

Soudní vyšetřování mohou ovlivnit jak chyby ve znaleckém posudku, tak i samotná předpojatost. Odborníci se mohou dopustit systematických, náhodných či hrubých chyb.

Do systematických chyb se zařazuje, například, teplota, která jestliže není ideální, může změnit dané výsledky analýzy. Do systematických chyb se také řadí instrumentální kalibrace. Náhodné chyby se nedají předvídat. Kvůli různým faktorům, které se nedají ovlivnit, může vzniknout kdykoliv náhodná chyba. Posledním typem jsou chyby hrubé. Ty vznikají převážně odborníky, kteří nedělají svoji práci pořádně a podle pravidel (DU, 2017).

8.1 Nalézání chyb ve forenzní genetice

Podle různých statistik lze chyby ve forenzní genetické analýze nalézt kdekoli. Díky statistikám můžeme říci, že ve větší míře chyby vznikají mimo vědecké bádání, či mimo vědecké rozborů. Jedná se o chyby, za které může nedorozumění, nepozornost lidí, selhání lidského faktoru. Např. špatné označení vzorku nebo nesprávné přečtení vzorku, což může být zapříčiněné špatnou čitelností písma, záměna dvou vzorků, atd.

8.2 Kde chyby vznikají a jak jim předcházet

Vznik chyb můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu můžeme pojmut tak, že za vznik chyb může člověk, v druhém případě jde o chyby způsobené technikou.

Do první skupiny můžeme zařadit člověka, který úmyslně vytvoří chybný výsledek výzkumu, většinou za nějakým cílem, např. zbohatnout – druhá strana nabídne finanční odměnu. Dalším způsobem vzniku chyby, je situace, kdy člověk, který ví, že svým jednáním pravděpodobně změní výsledek, původně analýzu nechtěl záměrně ovlivnit. Například osoba pracující s materiálem způsobí chybu záměnou vzorků a tím pádem změní výsledek.

U těchto dvou případů lze úmyslným chybám zabránit velmi těžko. Pokud se chce zabránit těmto záměrným chybám, musí se začít hned od začátku. Před tím, než se osoba přijme do týmu spolupracovníků, tak by se každý měl řádně prověřit, např. kde daný člověk pracoval, jaké má morální zásady, apod. Po nástupu by určitě neměl mít přístup ke všem chemikáliím, neměl by mít přístup do všech místností, které jsou jakýmkoli způsobem zabezpečené, např. čipovými hodinkami, otiskem prstů, měl by být kontrolovaný přístup do počítačů, které jsou zabezpečené heslem a každý jedinec má heslo přiřazené, atd.

Také může být případ, kdy člověk si je vědomý toho, že udělá chybu, ale zároveň doufá v to, že jeho jednání neovlivní výsledek. Tento případ může vzniknout, když si pracovník si ulehčí práci tím, že porušuje pracovní postup a tuší, že svým jednáním pozmění výsledek, ale na druhou stranu spoléhá, že se tak nestane.

Na druhou stranu tu může být také člověk, který je tzv. nevědomě nedbalý. Ten neví, že svým jednáním může způsobit chybu, ale vědět by to měl, jelikož toto jednání může mít fatální následky. Takový případ může vzniknout u špatně proškolené či vůbec neproškolené osoby.

Pro zabránění nedbalosti, ať už vědomé či nevědomé, je nejlepší když se stanoví jasná pravidla, která se musí dodržovat, jinak může hrozit předem specifikovaná sankce, např. finanční postih. Aby pracovník daná pravidla skutečně dodržoval, tak se může začít provádět namátková kontrola. Je možné přivést specialistu, který dohlíží na dodržování pravidel nebo se do laboratoře zavádí software, který bude

kontrolovat danou práci, např. naměřené hodnoty, také bude vyhodnocovat správnost výsledků, které jsou připisovány k dané osobě.

Jako nejtypičtější chybu a jako nejznámější můžeme uvést selhání lidského faktoru, také označovaný jako lidský omyl. Například, když se člověk přehlídne, upíše se, zamění zkumavky, či dá do nadepsané zkumavky jiný roztok, než by měl, aj.

Běžné omyly lidí můžeme zkusit eliminovat tím, že zaměstnancům opět pohrozíme jistou sankcí. To ovšem může vyvolat záporné výsledky, protože pracovník pracující pod větším stresem může udělat více chyb nebo se pracovník bude bát a pokouší chybu skrýt. Aby se zabránilo lidskému omylu, musí se zavést kontrolní mechanismy. Např. Dva pracovníci budou přeměřovat stejné roztoky a oběma musí vyjít stejné hodnoty, apod.

V druhé skupině nalzáme chyby, které zapříčinila technika. Existují dvě možné skupiny příčin. Očekávaná a neočekávaná příčina. Do předpovídajících se řadí např. napadení počítače virem, náhlá závada na přístroji, použití nekvalitních chemikálií, apod. V nenadálých příčinách se nachází vnější faktory, např. biologický či chemický.

K odbourávání technických chyb postačí zavedení normy, která se stará, aby stroje a všechny další technické součásti byly řádně seřízené. Pravidelně se kontroluje, aby přístroje fungovaly tak, jak mají. Také se provádí kontrola jednotlivých chemikálií a laboratorního vybavení.

Pokud se se má chybám v mechanismu zabránit, musí se nejdříve zjistit. Poté se určí a odstraňují se. Ale není 100% šance, že se chyba zcela eliminovala (Šimková, 2012).

9 Uchovávání zdrojů genetických informací v kriminalistice

9.1 Databáze v České Republice

V DNA databázi se nachází DNA profily usvědčených lidí, kteří se dopustili trestného činu, nacházející se v trestném stíhání za provedení trestného činu či se v databázi vyskytují DNA profily osob, jejichž činy ještě nejsou zcela objasněné. Tak se do databáze ukládají DNA profily lidí, kteří jsou obviněni z trestného činu či lidí pokládaných za pohřešované, ale nalezených. DNA databáze dále obsahuje DNA profily z mrtvol, kosterních pozůstatků či neznámé DNA profily z částí mrtvých těl.

Biologický materiál u osoby, k níž se odběr vztahuje, je odebrán, jen kvůli důkazu. Není však zapsán do Národní databáze DNA. Biologický materiál obsahující DNA, který se odebírá od svědka či podezřelého v trestném řízení, je jejich vzorek DNA dán k porovnání do systému CODIS. Samotná expertíza se provádí v Kriminalistickém ústavu, nacházejícím se v Praze (Folda, 2007).

V červnu 2002 vznikla Česká národní databáze, která využívá systém CODIS (Rak, Matyáš, Říka).

9.2 Banky (archivy, depozity) biologického materiálu

Existují dva typy bank, banky biologického materiálu a banky, které uchovávají izolovanou DNA.

Banka biologického materiálu je instituce, ve které jsou uloženy biologické materiály. Každý nový vzorek je zaevidován a má své identifikační číslo. Pod každým identifikačním číslem jsou informace o biologickém materiálu, např. původ. Každá banka se nachází u laboratoře, kde je zkoumán forenzně genetický materiál. Biologický materiál může být až 191 krát zkoumán, poté už je vyřazen. Jestliže je biologický materiál v bance už delší dobu, může se DNA rozpadnout (degradovat), Proto jsou vyžadovány vysoké požadavky pro manipulaci a práci se vzorky (Šimková, 2012). Vlhké biologické materiály jsou v mrazících boxech o teplotě -80°C, kdežto suché v papírových obálkách (Vinkler, 2015).

Jak už je známo, při každé analýze DNA, se jako první krok DNA odizoluje. Tak jako biologický materiál se uchovává také izolovaná DNA. Banka izolátu DNA funguje jako banka biologického materiálu. Může být podrobena expertíze a opakovat se. Izolát DNA se uchovává v boxu o teplotě $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vydrží až v řádech desítek let (Šimková, 2012).

Závěr

Metody forenzní genetiky využívané v kriminalistice jsou velice důležité pro identifikaci pachatele trestného činu. První použití forenzně genetické metody, která se uplatnila ve vyšetřování, bylo v polovině 90. let 20. století. Konkrétně byla využita metoda polymorfismus délky restričních fragmentů neboli RFLP. Pomohla vyřešit dvě do té doby neobjasněné vraždy.

Samostatnému použití forenzně genetické metody předchází dlouhý proces. Nejdříve se musí na místě činu, kde byl spáchán trestný čin, najít biologická stopa, která obsahuje biologický materiál obsahující vzorek DNA, tím může být například krev, slina či ejakulát. Pokud se biologická stopa najde, je nutné ji zajistit podle předem daných, striktních, pravidel. Různé DNA vzorky nemohou být zajištěny, např. v jednom obalu, ale každý je zabezpečený samostatně. Při samostatném odběru vzorku se musí dávat pozor, aby DNA vzorek nebyl kontaminován jinou DNA, např. se to může stát, když policista kýchne. Poté biologické stopy technici transportují do laboratoře, kde je forenzně geneticky zkoumán.

Proces identifikace DNA vzorku obsahuje několik kroků, při kterých se musí dávat pozor, aby při analýze nedošlo k chybě a to na základě lidského faktoru. Existuje několik forenzně genetických metod, které se používají.

Na základě repetitivní sekvence existují dvě metody, analýza dlouhých tandemových repetit a analýza krátkých tandemových repetit. Obě dvě metody fungují na principu, kdy se určitý úsek DNA opakuje a je řazen vedle sebe a změny v jejich opakováních se detekují a porovnávají. Pro namnožení vzorku DNA se využívá metoda polymerázové řetězcové reakce, která může vytvořit i přes 50 milionů nových dvouvláken. Využívá se také Sangerovo sekvencování, kde se kopíruje jen jeden řetězec DNA či Andersonova sekvence, také označována jako Cambridgeská referenční sekvence, která se používá při analýze mtDNA. Metoda využívající polymorfismus délky restričních fragmentů používá štěpení enzymu v určitém místě. Poslední zmíněná metoda je náhodná amplifikace polymorfní DNA, kdy se řetězec DNA nejprve spojí s primery a následně prochází amplifikací, při které jí pomáhá metoda PCR.

Poté se výsledky vyhodnocují a na základě toho se stanoví DNA profil, který se zaregistruje do české národní databáze DNA, vzorky DNA a izolát DNA se uskladní v bankách.

Seznam použité literatury

ADVANCED NTD LTD. ALS - Alternative Light Sources. *Advanced NTD Ltd* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: http://www.advanced-ndt.co.uk/als_forensic_lighting.htm

ANONYMUS. *Archeologické rozhledy LXIX–2017, sešit 2* [online]. Praha, 2017 [cit. 2018-07-8]. ISSN ISSN 0323–1267. Dostupné z: http://www.arup.cas.cz/wp-content/uploads/2010/11/Archeologick%C3%A9-rozhledy-2_2017.pdf

ANONYMUS. Fotoléze – reparace DNA po účinku UV záření. *Masarykova univerzita* [online]. 2007 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi8540/um/UV_zareni.ppt?lang=e

ANONYMUS. DNA Fingerprinting. DNA Forensics [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <http://www.dnaforensics.com/DNAFingerprinting.aspx>

ANONYMUS. Genetická daktyloskopie. *Wikipedie* [online]. 2018 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: Genetická_daktyloskopie

ANONYMUS. Genetický marker. *Wikipedie* [online]. 2017 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Genetick%C3%BD_marker

ANONYMUS. Reverse transcription polymerase chain reaction. *Wikipedia* [online]. [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Real-time_polymerase_chain_reaction#cite_note-Bustin2009-1

BAIZOVÁ, Pavlína. Kriminální stopa. *Modul Kriministiky*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014, s. 7-10. ISBN 978-80-244-4180-1.

BÁRTOVÁ, Eva. Metody molekulární biologie. *Biologie a genetika pro bakaláře* [online]. 2014 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=c

BÁRTOVÁ, Eva. RFLP – restriční reakce. *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-rflp&lang=cz

BÁRTOVÁ, Eva. Sekvenování DNA. *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-sekvenovani&lang=cz

BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005, s. 163. ISBN 80-247-0691-1.

BERÁNEK, Martin. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3224-7.

BOOPATHI, N. Manikanda. *Genetic mapping and marker assisted selection: basics, practice and benefits*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-81-322-0958-4.

BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2007, s. 6. ISBN 978-80-244-1719-6.

ČIHÁK, Radomír. Vlasové folikuly a jejich vývoj. *Anatomie*. Praha: Grada, 1997, s. 653. ISBN 80-7169-140-2.

ČÍLOVÁ, Daniela. Genetické profilování (DNA profil). *KCHČSV* [online]. 2015 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.cswolfdog.cz/index.php/clanky/43-chov/742-geneticke-profilovani-dna-profil>

ČSSFG. Co je forenzní genetika. *Československá společnost pro forenzní genetiku* [online]. 2018 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.cssfg.org/cz/1111/co-je-forenzni-genetika>

DNA CENTRUM BULOVKKA. Forenzní genetika. *DNA centrum Bulovka* [online]. [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.dnacentrum.cz/forenzni-genetika/>

DOLEŽAL, Tomáš. Pojmy. *Základy moderní biologie* [online]. 2018 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/pojmy.html>

DU, Mingxiao. Analysis of errors in forensic science. *Journal of forensic science and medicine* [online]. 2017, 3(3), 139-143 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://www.jfsmonline.com/article.asp?issn=2349-5014;year=2017;volume=3;issue=3;spage=139;epage=143;aulast=Du>

FARMACEUTICKÁ, Fakulta UK. Enzymologie. *Farmaceutická fakulta UK* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z:

<https://www.faf.cuni.cz/Studium/Magisterske/Zdravotnicka-bioanalytika/Studijni-plany/Studijni-plan-1-usek/Enzymova-kinetika/>

FARRELL, Robert. Chapter 18 - RT-PCR: A Science and an Art Form. *ScienceDirect* [online]. [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123747273000188>

FOLDA, Jan. Databáze DNA. *Úřad pro ochranu údajů* [online]. 2007 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://www.uoou.cz/databaze-dna/ds-2479>

HIRT, Miroslav, VOREL, František. *Soudní lékařství II*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-271-0268-6.

HOLDEN, Simon. Man who murdered two girls aged 15 was world's first DNA conviction. *Hinckley Times* [online]. 2014 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://www.hinckleytimes.net/news/local-news/man-who-murdered-two-girls-7798455>

JEDLIČKA, Miloslav. Genetika ve službách kriminalistiky. *Kriminalistika a příbuzné obory* [online]. 2018 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://kriminalistika.eu/dna/dna.html>

JEDLIČKA, Miloslav. VYŠETŘOVÁNÍ: První vražda v ČR objasněna analýzou DNA (sexuální agresor Milan Lubas). *Dooffy Design - Eorld for everyone* [online]. 2010 [cit. 2018-07-11]. Dostupné z: <http://www.dooffy.com/cs/vysetrovani-prvni-vrazda-v-cr-objasnena-analyzou-dna-sexualni-agresor-milan-lubas.html>

JEFFREYS, Alec, BROOKFIELD John F. Y., SEMEONOFF Robert. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* [online]. 1985, 317, 818-819 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/317818a0>

JEFFEREY, Alec, WILSON, Victoria. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* [online]. 1985, 314(6006), 67 - 73 [cit. 2018-08-07]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/314067a0>

KING, Robert C., STANSFIELD, William D., MULLIGAN, Pamela K. *A dictionary of genetics*. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 978-019-5307-610.

KOČÁREK, Eduard. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika: molekulární biologie: biotechnologie: genomika*. Praha: Scientia, 2004. Biologie pro gymnázia. ISBN 80-718-3326-6.

KODÍČEK, Milan. Biochemie. *From Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2018-08-06]. Dostupné z [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=biochemie](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=biochemie)

KOLÍSKO, Martin. Principy sekvenování DNA vybranými moderními metodami. *Živa* [online]. 2017, (3) [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/principy-sekvenovani-dna-vybranymi-modernimi-metod.pdf>

KOOLMAN, Jan, RÖHM, Klaus-Heinrich. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

KOUKAL, Milan. Kam vedou biologické stopy?. *21. století* [online]. 2005 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://21století.cz/2005/12/19/kam-vedou-biologicke-stopy/>

KROUPOVÁ, Kateřina. Gen. *Slovník speciálněpedagogické terminologie: vybrané pojmy*. Praha: Grada, 2016, s. 23. Pedagogika (Grada). ISBN 978-80-247-5264-8.

KULOVANÁ, Eliška. Identifikace odrůd brambor pomocí metody RAPD. *Úroda* [online]. 2001 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://uroda.cz/identifikace-odruda-brambor-pomoci-metody-rapd/>

LANDER, Eric. Use of DNA in Identification. *Access Excellence* [online]. 1992 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://web.archive.org/web/20080426014318/http://www.accessexcellence.org/RC/AB/BA/Use_of_DNA_Identification.php

LEONARD, Debra G.B. et al. *Molecular Pathology in Clinical Practice*. 2nd ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. ISBN 978-3-319-19673-2.

ANONYMUS. Fotoléze – reparace DNA po účinku UV záření. *Masarykova univerzita* [online]. 2007 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi8540/um/UV_zareni.ppt?lang=e

MAZURA, Ivan. Forenzní genetika - identifikace jedince pomocí nukleových kyselin. *Soudní lékařství*. Praha: Grada Publishing, 2016, s. 67-68. ISBN 978-80-247-5680-6.

NGUYEN. *Nam. Essential 18000 Medical Words Dictionary In Czech* [online]. 2018 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=0gVTDwAAQBAJ&pg=PT145&dq=vagin%C3%A1ln%C3%AD+sekret&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwiW-5jnkffbAhWFLlAKHXLnCy4Q6AEIMDAB#v=snippet&q=gen&f=false>

OTOVÁ, Berta, MIHALOVÁ, Romana. *Základy biologie a genetiky člověka*. V Praze: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.

PETR, Miroslav. *Sportovní genomika: genetické determinanty pohybové činnosti*. Praha: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, 2017, s. 12. ISBN 978-80-246-3745-7.

PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ Eva. et al. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

PENVEN, Don. Alternate Light Sources and How CSIs Use Them. *Crime Scene Training* [online]. 2011 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <http://www.csitechblog.com/2011/01/alternate-light-sources-and-how-csis-use-them.html>

PIERCE, Benjamin A. *Genetics*. Fifth edition. New York: W.H. Freeman and Company, 2014. ISBN 978-1-4641-0946-1.

PRŮŠA, Richard. Amplifikační metody. *Učebnice Biochemie* [online]. 1998 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>

PRŮŠA, Richard. et al. RFLP (détkový polymorfismus reakčních fragmentů). *Učebnice biochemie* [online]. [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa3.htm>

PORADA, Viktor, SUCHÁNEK, Jaroslav, STRAUS, Jiří. Vyhledávání a zajišťování kriminalistických stop na místě činu. *Soudní inženýrství* [online]. 2005, 16, 312-328 [cit. 2018-07-11]. Dostupné z: <http://www.sinz.cz/archiv/docs/si-2004-06-312-328.pdf>

RAK, Roman, MATYÁŠ, Vašek, ŘÍHA, Zdeněk. *Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích*. Praha: Grada, 2008. Profesionál. ISBN 978-80-247-2365-5.

RÉDEI, George P. *Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics*. New York: Springer, 2008. ISBN 978-140-2067-532.

RELICHOVÁ, Jiřina. Dědičnost a medicína. *Vesmír* [online]. 2003, 82(8) [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2003/cislo-8/dedicnost-medicina.html>

ROVENSKÝ, Jozef. et al. Genom. *Revmatologický výkladový slovník*. Praha: Grada, 2006, s. 74. ISBN 80-247-1614-3.

SANGER, F., COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1975, 94(3), 441-446 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283675902132>

SUCHÁNEK, Jaroslav. *Kriminalistické stopy odrážející vnitřní stavbu objektu*. Praha: PA ČR, 2000, 87 s.

STRAUS, Jiří, SUCHÁNEK Jaroslav, PORADA, Viktor. Kriminalistické stopy obsahující informaci o obsahu vnitřní stavby (struktury) nebo vnitřního složení objektu. *Soudní inženýrství* [online]. 2014, 15(3), 131-145 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.sinz.cz/archiv/docs/si-2004-03-131-145.pdf>

STREBLOVÁ, Eva. *Souhrnné texty z chemie: pro přípravu k přijímacím zkouškám (přírodovědné obory, lékařství)*. 3., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2013, s. 166-167. ISBN 978-80-246-2242-2.

SUGAVANAM, Lakshmi K. Application of RAPD in Molecular Biology. *Biotech Articles* [online]. 2011 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z:

<https://www.biotecharticles.com/Biotech-Research-Article/Application-of-RAPD-in-Molecular-Biology-813.html>

SZUSTAKOWSKI, J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [online]. 2001, 409(6822), 860-921 [cit. 2018-08-09]. DOI: 10.1038/35057062. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35057062>

ŠIMKOVÁ, Halina. *Breviář forenzní genetiky* [online]. Tribun EU, 2012 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: http://www.cssfg.org/gallery/1/392-breforgen_web_verze.pdf

ŠIMKOVÁ, Halina. Obálka čísla „Kvalitní“ bič na genetiky. *Vesmír* [online]. 2018, 97(4) [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2018/cislo-4/detektivka-stinadel.html>

ŠÍPEK, Antonín. Genetika obecně. *Genetika - Biologie* [online]. 2014 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/genetika-obecne>

ŠÍPEK, Antonín. Historie genetiky. *Genetika - Biologie* [online]. 2014 [cit. 2018-07-11]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/historie-genetiky>

ŠÍPEK, Antonín. Mutace. *Genetika - Biologie* [online]. 2014 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>

ŠÍPEK, Antonín. Molekulární genetiky. *Genetika - Biologie* [online]. 2014 [cit. 2018-08-06]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/molekularni-genetika>

ŠÍPR, Květoslav. Začátek individuálního lidského života a biomedicína. *Fórum života* [online]. 2007 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.forumzivota.sk/2007/09/24/zacatek-individualniho-lidskeho-zivota-a-biomedicina/>

ŠTEFAN, Jiří, HLADÍK Jiří et al. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3594-8.

ŠTEFAN, Jiří. MACH, Jan. Prohlídka a vyšetření osob podezřelých ze spáchání trestního činu. *Soudně lékařská a medicínsko-právní problematika v praxi*. Praha: Grada, 2005, s. 130. ISBN 80-247-0931-7.

ŠTEFÁNEK, Jiří. Deoxyribonukleová kyselina. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. 2011 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=deoxyribonukleova-kyselina>

ŠTRAMBEROVÁ, Alexandra. Validace a verifikace vyšetření v molekulární genetice. *Docplayer* [online]. 2012 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/2449892-Validace-a-verifikace-vysetreni-v-molekularni-genetice.htm>

TELLIER, Raymond, BUKH, Jens. et al. Long PCR Amplification of Large Fragments of Viral Genomes. *PCR protocols*. Totowa: Humana Press, 2003, s. 167-172. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), s. 226. ISBN 978-0-89603-642-0.

TREUREN, Rob van. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Wageningen University & Research* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.wur.nl/en/show/Random-Amplified-Polymorphic-DNA-RAPD.htm>

VAN OORSCHOT, Roland AH. Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics* [online]. 2012, 14 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://investigativegenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/2041-2223-1-14#Sec18>

VANĚK, Daniel. Genetika jako identifikační nástroj ve službách kriminalistiky. *Živa* [online]. 2011, (2), 56-57 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/genetika-jako-identifikacni-nastroj-ve-sluzbach-kr.pdf>

VANĚK, Daniel. Obálka čísla „Kvalitní“ bič na genetiky. *Vesmír* [online]. 2011, 90(10) [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2011/cislo-10/kvalitni-bic-genetiky.htm>

VANĚK, Daniel. Obálka čísla Zrození a dospívání forenzní genetiky. *Vesmír* [online]. 2010, 89(415) [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2010/cislo-7/zrozeni-dospivani-forenzni-genetiky.html>

VINKLER, Michal. et al. Genetická banka. *Přírodovědecká fakulta UK* [online]. 2015 [cit. 2018-07-8]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/zoologie/geneticka-banka>

VWR, part of avantor. Karty typu FTA, Whatman. *VWR, part of avantor* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://cz.vwr.com/store/product/565085/karty-typu-fta-whatman>

Seznam použitých obrázků

ANONYMUS. K čemu slouží polymerázová řetězová reakce?. *Odpovědi.cz* [online]. 2018 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.odpovedi.cz/otazky/k-cemu-slouzi-polymerazova-retezova-reakce>

ANONYMUS. Variable number tandem repeat. *Wikipedia* [online]. 2008 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat

ANONYMUS. SNP. *TubaScan* [online]. 2018 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.tubascan.eu/tubascan/snp/>

BÁRTOVÁ, Eva. Sekvenování. In: *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=foto_video-sekvenovani&lang=cz

BRENNAN, John. What Are Some Advantages and Disadvantages of Using DNA Analysis to Aid Law Enforcement in Crime?. *Sciencing* [online]. 2018 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://sciencing.com/advantages-aid-law-enforcement-crime-6776368.html>

DISTRIBUIDORA COMERCIAL ZOGBI. Swab Solution. In: *DISTRIBUIDORA COMERCIAL ZOGBI* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <http://www.dczogbi.com/swab.html>

FÉR, Tomáš, FLAŠKOVÁ, Lenka. Metody. *DNA laboratoř katedry botaniky PřF UK* [online]. [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: https://botany.natur.cuni.cz/dna/index.php?option=com_content&view=section&id=5&Itemid=54

HITECH. Test věrnosti s UV lampou. *HiTech Ltd.* [online]. 2005 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://www.esko.cz/test-vernosti-s-uv-lampou.html>

KRIMI-LTSEZAM. Tampon odběrový v tubě, sterilní. In: *Krimi-LTsezam.cz* [online]. 2018 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <http://www.krimi-ltsezam.cz/cs/tampon-odberovy-v-tube-sterilni-300252/>

LABGUIDE. Sangerova metoda. *LabGuide* [online]. 2015 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://labguide.cz/klasicke-metody-sekvenovani/sangerova-metoda/>

NCBI. Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP). *NCBI* [online]. 2017 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>

NORWAY DNA NORGESPROSJEKTET. SNP vs STR Jobling. In: *Norway DNA Norgesprosjektet* [online]. 2013 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <http://www.norwaydna.no/y-dna/snp-vs-str-jobling/>

YOURGENOME. What is a DNA fingerprint?. *Yourgenome* [online]. 2016 [cit. 2018-08-09]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-dna-fingerprin>

VANĚK, Daniel. *Forezní genetika v procesu dokazování*. Praha: Forensica, 2011.