

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

Genetické profilování DNA a jeho využití  
Odborem kriminalistické techniky a expertiz v  
Hradci Králové

**Bakalářská práce**

Autor: Pavlína Lásková  
Studijní program: B1501Biologie  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie  
Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2019

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

Pavλίna Lásková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí své práce paní RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této práce. Dále děkuji vedení Odboru kriminalistické techniky a expertiz za propůjčení literatury, odborné konzultace a příležitost spolupráce.

## **Anotace**

LÁSKOVÁ, P. *Genetické profilování DNA a jeho využití Odborem kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové*. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 62 s.

Bakalářská práce popisuje činnost Odboru kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové. Hlavním cílem je zachycení procesu zpracování materiálu zajištěného z místa činu a následné stanovení genetického profilu získaných molekul DNA. Práce shrnuje informace o struktuře DNA a dokumentuje proces genetického profilování s veškerými používanými přístroji a dalšími potřebnými pomůckami. Součástí práce je také reálný genetický profil zpracovaný přímo OKTE v Hradci Králové, na kterém je vysvětlena interpretace genetických profilů. Dále seznamuje s obecnými pravidly správy Odboru kriminalistické techniky a expertiz a dalšími metodami kriminalistické identifikace, které využívá.

## **Klíčová slova**

genetické profilování, genetický profil, DNA struktura, kriminalistika, DNA analýza, forenzní biologie

# Annotation

LÁSKOVÁ, P. *DNA profiling and its use by the Department of Forensic Techniques and Expertise in Hradec Králové*. Hradec Králové, 2019. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 62 p.

This bachelor thesis describes the activities of the Department of Forensic Techniques and Expertise in Hradec Králové. The main purpose is to describe the process of treatment material from the crime scene and to subsequently determine a genetic profile of the DNA molecules obtained. The work summarizes DNA structure information and documents the process of genetic profiling with all used appliances and other necessary instruments. Part of the thesis is also a real genetic profile prepared directly by OKTE in Hradec Králové, which explains the interpretation of genetic profiles. Further, it elucidates the general rules of the Department of Forensic Techniques and Expertise and other methods of forensic identification that are used.

## Keywords

genetic profiling, genetic profile, DNA structure, criminology, DNA analysis, forensic biology

# Obsah

Úvod.....	7
1 Kriminální věda.....	8
1.1 Metody kriminalistické vědy.....	9
1.2 Metody kriminalistické praxe .....	9
1.3 Kriminalistická stopa .....	10
2 Odbor kriminalistické techniky a expertiz .....	15
2.1 Služby kriminální policie a vyšetřování .....	15
3 DNA.....	18
3.1 Primární struktura DNA .....	18
3.2 Sekundární struktura DNA.....	21
3.3 Další struktury DNA .....	22
4 Genetické profilování DNA.....	24
4.1 Metody používané ve forenzní analýze DNA.....	25
4.1.1 Polymerázová řetězová reakce .....	25
4.1.2 Elektroforéza.....	27
4.1.3 Polymorfismus délky restričních fragmentů.....	28
4.1.4 Polymorfismus krátkých tandemových repetitivních sekvencí .....	29
4.1.5 Komerčně vyráběné kity .....	30
4.2 Zajištění stop .....	31
4.2.1 Sběr biologických stop.....	31
4.2.2 Skladování stop .....	31
4.2.3 Určení charakteru stopy .....	32
4.3 Genetická analýza.....	32
4.3.1 Izolace DNA .....	32
4.3.2 Kvantifikace DNA .....	35

4.3.3	Fragmentační analýza.....	38
4.4	Genetické profily .....	39
5	Databáze DNA profilů.....	43
5.1	Systém CODIS (Combined DNA Index System) .....	44
5.2	Národní databáze České republiky .....	45
6	Genetické profilování prováděné Odborem kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové .....	46
6.1	Odbor kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové.....	46
6.2	Odběr stop z místa činu a srovnávacích stop.....	48
6.3	Příjem stop .....	48
6.4	Vzorkování.....	49
6.5	Míchání vzorků .....	50
6.6	Izolace srovnávacích vzorků .....	51
6.7	Kvantifikace DNA .....	51
6.8	Amplifikace DNA pomocí Polymerázové řetězové reakce .....	52
6.9	Fragmentační analýza.....	53
	Závěr .....	55
	Literatura .....	56
	Elektronické zdroje.....	58
	Seznam zkratk .....	61

# Úvod

Tato práce je věnována genetickému profilování DNA a jejímu využití v kriminalistice. I přesto, že je tato technika obecně považována za jeden z nejspolehlivějších nástrojů forenzních metod identifikace, vědecký postup bývá často nepochopen. Cílem práce je shrnutí dosavadních informací a objasnění jejích principů široké veřejnosti, včetně jejího využití v praxi. Na rozdíl od ostatních metod identifikace osob stačí pro analýzu DNA velmi malé množství biologického materiálu. K přesným výsledkům stačí mnohdy jen jediná buňka. Tento typ analýzy DNA se nevyužívá pouze pro kriminalistické účely, ale také například k určování paternity dětí nebo identifikacím obětí hromadných nehod.

Tato metoda patří v současnosti k nejvíce se rozvíjejícím oborům kriminalistické biologie a díky ní dochází často k rozluštění složitých trestných činů. Proto jsem se rozhodla tomuto tématu věnovat podrobněji. Veškeré informace získané z odborné literatury a vědeckých článků jsem si potvrdila při osobních konzultacích s odbornými pracovníky Odboru kriminalistické techniky a expertiz sídlícímu v Hradci Králové. Práce se tedy v první polovině věnuje vysvětlení pojmů kriminalistiky, DNA a různým pracovním postupům. Druhá polovina již popisuje konkrétní metody Odboru kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové od příjmu stopy až po výsledný genetický profil.



# 1 Kriminalistika

Kriminalistiku lze definovat jako samostatný vědní obor, který vznikl na přelomu 19. a 20. století, přestože kriminální problematiku lidstvo řeší už od nepaměti. Zabývá se ochranou občanů a státu pomocí objasňování vzniku, zániku, vyhledávání, zkoumání a zajišťování kriminalistických stop i dalších soudních důkazů [5, 7]. Dále také pro odhalení určité kriminální činnosti vytváří standardní metody, postupy a prostředky samotného pátrání i předcházení trestné činnosti. Kriminalistika je rozsáhlou interdisciplinární vědou, tedy využívá poznatky z mnoha jiných oborů. Takovými obory mohou být například fyzika, matematika, biologie, medicína, psychologie, technické obory a další. Kriminalistika tedy netvoří jen specializaci jednoho z těchto oborů, neboť žádný z nich nezkoumá danou problematiku. Nevěnují se vzniku či zániku stop ani postupy práce se soudními důkazy [12]. Souhrnně lze tedy označit za hlavní objekty zkoumání kriminalistiky trestné činy a jejich následky, pachatele trestných činů, činnost těchto pachatelů, ale i znaleckých institucí, policie, státních zastupitelstev či soudů a v neposlední řadě i oběti trestných činů [8].

Předmět kriminalistiky působí velice různorodě, což je zapříčiněno vysokou variabilitou trestných činů. Proto se i činnosti kriminalistů stávají velmi různorodými [6, 7]. Výsledným úkolem kriminalistických specialistů poté je vyřešení problémů s kriminální činností za pomoci určitých nástrojů – tzv. metod. Je zde potřeba odlišovat metody kriminalistické praxe a metody kriminalistické vědy [14].



Obr. č. 1: Místo činu (převzato z:

[http://www.praha.eu/jnp/cz/co\\_delat\\_v\\_praze/kultura/muzea\\_a\\_vystavy/svet\\_kriminalistiky\\_ocima\\_policistu.html](http://www.praha.eu/jnp/cz/co_delat_v_praze/kultura/muzea_a_vystavy/svet_kriminalistiky_ocima_policistu.html))

## **1.1 Metody kriminalistické vědy**

Základní složku kriminalistické vědy tvoří systém metodologie a metod, využívaných pro účely zkoumání dané problematiky [6]. Kvůli rozsáhlému záběru předmětu této vědy, dochází k užívání metodologie z věd fundamentálních i praktických. Tyto metody kriminalistické vědy podle obecnosti rozdělujeme do 3 skupin:

### **1.1.1 Obecné poznávací metody**

Tyto metody se využívají ve všech vědních oblastech (např. měření, pozorování) [7, 14].

### **1.1.2 Metody vzniklé z jiných oborů (např. chemie, fyzika, sociologie)**

Jedná se o metody, které lze využít při práci se specifickými předměty a cíli [7, 14].

### **1.1.3 Metody využívané výhradně kriminalistikou**

Tyto metody jsou speciálně vypracované pro účely kriminalistiky (např. aplikace poznatků jiných věd či soudní praxe za účelem výlučně kriminalistické činnosti) [7, 14].

## **1.2 Metody kriminalistické praxe**

Tato praktická činnost využívá již konkrétní metody, které kriminalisté využívají k vyhledávání, zajišťování i využívání kriminalistických stop spolu s dalšími forenzními důkazy [6]. Základní funkcí se tedy stává samotné využití vědeckých poznatků při řešení praktických úkolů. Metody kriminalistické praxe lze také rozdělit do 3 skupin:

### **1.2.1 Obecné poznávací metody**

Výhodou těchto metod je obecná platnost a účelnost (např. pozorování či popisování jevu) [7, 14].

### **1.2.2 Metody převzaté z jiných oborů**

Tyto metody mají všestrannější využití než u jejich původních oborů; nejčastěji jde o chemické nebo fyzikální metody (např. mikroskopie, spektrofotometrie). Tato skupina zaznamenává největší rozvoj ze všech kriminalistických praktických metod [7, 14].

### **1.2.3 Metody specifické pro kriminalistickou činnost**

Do této skupiny řadíme metody, které vznikly až v kriminalistice (např. strukturální metody - ohledání, výslech) [7, 14].

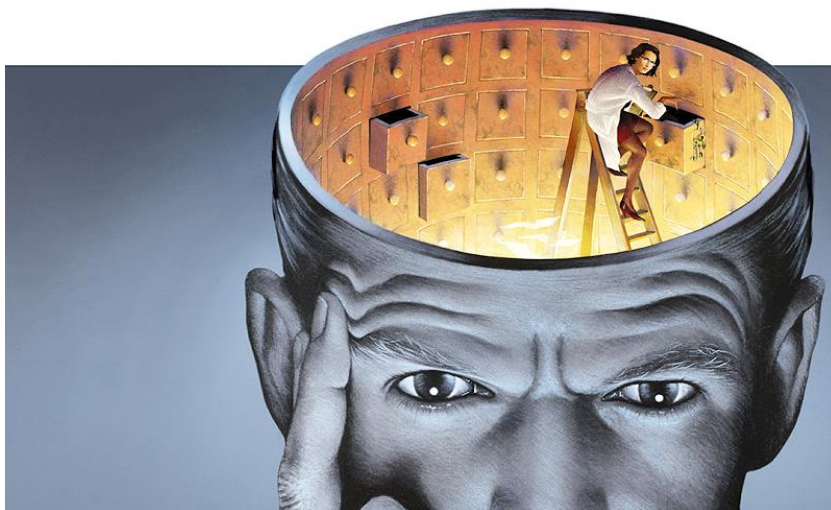
### 1.3 Kriminalistická stopa

Klíčový pojem kriminalistiky tvoří tzv. kriminalistická stopa. Tato stopa je základním zdrojem informací o samotném trestném činu a vychází z ní procesy odhalování i vyšetřování trestných činů [14]. Jak je již zmíněno výše, předmět kriminalistické vědy je velice rozsáhlý, což následně vede i k velké rozmanitosti jednotlivých stop a postupů, jak s nimi správně nakládat [5]. Kriminalistickou stopou je chápána každá změna na místě činu, která s tímto činem souvisí, zároveň je zjistitelná, zajistitelná a využitelná [1, 9]. Stopy můžeme rozdělit podle několika kritérií:

1.3.1 podle prostředí, ve kterém byly vytvořeny:

#### **a) paměťové stopy**

Takové stopy vznikají ve vědomí člověka. Jde tedy o vjemy, které jsou fixovány v podmínkách jedince. I přes to, že jsou bezesporu materiálního charakteru (je to určitá změna biochemického složení buněk v mozku), nejsou nijak exaktně vyhodnotitelné. Z tohoto důvodu je oddělujeme od zbylých materiálních a je s nimi i jinak pracováno [8]. Tyto stopy ve vědomí využívají kriminalisté například u výslechů, konfrontací (slouží k odstranění rozdílů ve výpovědích pomocí přímého střetu vypovídajících osob), rekonstrukcí (využívá se k získání informací pomocí obnovení situace) nebo rekognicí (zde probíhá identifikace osob nebo věcí při jejich dalším shledání). [1]



Obr. č. 2: Paměťové stopy (převzato z: <https://psychologie.cz/hrozne-vlezla-pisnicka/>)

### ***b) materiální stopy***

Tyto stopy jsou všechny ostatní stopy, které nejsou paměťového charakteru [8]. Vznikají v živé i neživé přírodě působením jednotlivých objektů s výjimkou lidského mozku. Tento druh stop lze kategorizovat podle několika hledisek. Například pro práci se stopou rozlišujeme jednotlivé druhy podle odvětví znaleckého zkoumání jako je balistika, biologie, chemie, trasologie atd. [1].

#### **1.3.2 podle různých metod zajištění stop:**

##### ***a) zajištění in natura (v přirozené podobě)***

Tato metoda odebírá stopy, tak jak byly nalezeny. Jedná se o zajištění nosiče obsahující danou stopu. Může to být například nějaká část oděvu, použitá lahev atd. Izolování biologického materiálu poté probíhá až v laboratoři [8]. Značnou výhodou je zpracování stopy až ve vhodných podmínkách laboratoře a následné možnosti zpracování takového materiálu ve více odborných odvětvích. Nevýhodou je možnost poškození nebo zničení stopy během přepravy, pokud není nosič správně zajištěn proti pohybu uvnitř obalu [1].

##### ***b) zajištění kopie stopy***

Tato metoda předává laboratoři obraz nebo kopii stopy. Nejčastěji to mohou být odlitky nebo otisky. Odlitím se zajišťují plastické stopy. Materiál odlitku bývá většinou sádra nebo speciální lékařsky využívané hmoty. Odlitá stopa musí zcela odrážet realitu [1]. Otisky se pořizují na daktyloskopickou fólii, která se přikládá na nosič po zviditelnění stopy daktyloskopickým práškem. Tato metoda se využívá, pokud jsou nosičem příliš velké předměty, které nelze zajistit [8].

##### ***c) zajištění fotografické***

Tato metoda vytváří obrazové zajištění stopy. Pomocí fotografie se podle pravidel zdokumentuje vnější struktura stopy. [1, 8, 9]



Obr. č. 3: Fotografické zajištění stopy (převzato z:  
[http://mofychem.upol.cz/KA5/Modul\\_Kriminalistika.pdf](http://mofychem.upol.cz/KA5/Modul_Kriminalistika.pdf))

### 1.3.3 podle různých metod zviditelnění:

#### ***a) mechanické a fyzikálně chemické zviditelnění***

Tato metoda je založená na stopách, které se projevují jako lepkavá nerovnost na ploše a využívá se schopnost mikroskopických částic určitých látek ulpívat na těchto nerovnostech [1]. Typickým příkladem je daktyloskopie či trasologie, kdy se ke zviditelnění používá nanesení prášku [8].



Obr. č. 4: Zviditelnění daktyloskopické stopy (převzato z: <http://jorjaas.blog.cz/1001/uriznout-si-briska-prstu-destaci-vzor-pro-otisky-se-vam-vrati>)

***b) optické zviditelnění***

Tato metoda využívá fyzikální vlastnosti látek ovlivňující jejich chování pod různými oblastmi viditelného spektra [8]. Řadíme sem například pozorování stop v šikmém osvětlení [1].



Obr. č. 5: Optické zviditelnění stopy UV světlem (převzato z: <https://cz.depositphotos.com/131736136/stock-photo-nice-footprint-visible-only-under.html>)

### ***c) chemické zviditelnění***

Tato metoda využívá fyzikálně chemických vlastností látek. Na rozdíl od ostatních metod zviditelnění zde dochází k reakci látek [8, 12]. Využívá se například chemiluminiscence při zviditelnění krevních stop, ninhydrinový roztok či aerosol při zviditelnění daktyloskopických stop na papíře atd. [1].



## 2 Odbor kriminalistické techniky a expertiz

### 2.1 Služby kriminální policie a vyšetřování

Odbor kriminalistiky a forenzních expertiz (OKTE) řadíme pod organizaci Služby kriminální policie a vyšetřování (SKPV), která tvoří organizační článek Krajského ředitelství policie. Všechny tyto instituce společně spadají pod Policii České republiky. [38]

Služba kriminální policie a vyšetřování Krajského ředitelství policie Královéhradeckého kraje provádí zpracování tzv. „sedmnáctkových věcí“, mezi které řadíme trestné činy se spodní hranicí trestu 5 let odnětí svobody a další specificky jmenované v trestním řádu §17. Ostatními trestnými činy se zabývají jednotlivé oddělení územních odborů spadajících pod jejich územní sektor. [38]



Starý odznak



Nový odznak

Obr. č. 6: Odznak Služby kriminální policie a vyšetřování (převzato z: [https://www.lidovky.cz/domov/bez-odznaku-kriminaliste-prisli-o-svou-chloubu-kvuli-chybe-firmy.A160104\\_160538\\_ln\\_domov\\_jzl](https://www.lidovky.cz/domov/bez-odznaku-kriminaliste-prisli-o-svou-chloubu-kvuli-chybe-firmy.A160104_160538_ln_domov_jzl))



## **2.2 Odbory Služby kriminální policie a vyšetřování**

### **2.2.1 Odbor obecné kriminality**

Tento odbor vykonává trestní řízení například v oblastech násilné trestné činnosti (např. vražda, loupežné přepadení, nebezpečné vyhrožování, zajištění rukojmí, ublížení na zdraví, vydírání, týrání svěřené osoby, únosy, opuštění dítěte), trestné činnosti majetkového charakteru (např. krádeže vloupáním do rekreačních objektů, do bytů a dalších i veřejných budov, krádeže bankomatů, trezorů), trestné činnosti na úseku toxikomanie (např. trestné činy jako je šíření toxikomanie nebo nedovolená výroba a držení omamných a psychotropních látek a jedů), trestné činnosti na úseku mládeže (např. trestná činnost páchaná na mládeži i provinění spáchané mládeží) atd. [38]

### **2.2.2 Odbor hospodářské kriminality**

Tento odbor vykonává trestní řízení v oblastech trestních činů v oblastech trestných činů proti měně a majetku, daňových trestných činů nebo trestných činů proti hospodářské kázní. Nejčastěji se jedná o trestné činy podvodu, zpronevěry, neoprávněné držení platební karty, úplatkářství atd. [38]

### **2.2.3 Odbor technické ochrany**

Tento odbor využívá vyspělé technické prostředky (např. kamerové, elektronické přístupové systémy, GPS systémy atd.) k technické ochraně majetku, zdraví i života osob. Tento odbor výrazně pomáhá při objasňování majetkové trestné činnosti. [32]

### **2.2.4 Odbor analytiky a kybernetické kriminality**

Tento odbor se zabývá správou analytických a informačních systémů služby kriminální policie a vyšetřování daného kraje. Zde dochází k vytváření portrétních identifikací osob a kriminální případové analýzy. Zároveň se podílí na vyšetřování případů souvisejících s informační kriminalitou. [30]

### **2.2.5 Odbor operativní dokumentace**

Tento odbor zodpovídá za plnění úkolů operačních středisek policie, za systém zveřejňování dopravního zpravodajství, zajišťování součinnosti vazeb s ostatními bezpečnostními sbory, vnitřní kontroly operačních středisek, dopravního zpravodajství atd. [34]

### 2.2.6 Odbor kriminalistické techniky a expertiz

Odbor kriminalistické techniky a expertiz Krajského ředitelství policie tvoří útvar Policie ČR. Tato pracoviště jsou Ministerstvem spravedlnosti zapsané v Seznamu znalců [31]. Celkově se v České republice nachází 8 takových znaleckých pracovišť. V celé České republice je 8 kvalifikovaných laboratoří OKTE a to se sídly v městech: Praha (pro hlavní město Praha), Hradec Králové (pro Královéhradecký kraj), Ústí nad Labem (pro Ústecký kraj), Kladno (pro Středočeský kraj), České Budějovice (pro Jihočeský kraj), Frýdek-Místek (pro Moravskoslezský kraj), Brno (pro Jihomoravský kraj), Plzeň (pro Plzeňský kraj) [22]. I přesto, že jsou jednotlivé OKTE sjednoceny pod Kriminalistický ústav Praha - jako řídicí metodické pracoviště, každá laboratoř má své vlastní standardní operační postupy (SOP), používá jiné chemikálie atd. Proto je tato práce zobecněna na OKTE v Hradci Králové [38].

OKTE využívá různé odvětví metod. Pracuje například s analýzou dat a zkoumáním nosičů dat, kdy vyhledává relevantní digitální informace extrahovatelné z technických zařízení. Dále provádí balistiku, která se zabývá zkoumáním zbraní, střelivem, vedlejšími produkty výstřelu a objasněním podmínek střelby. Dalším odvětvím je daktyloskopie, která zkoumá vysoce individuální obrazce papilárních linií na posledních člancích prstů rukou i nohou, také na dlaních i chodidlech. Dále provádí defektoskopii, která využívá nedestruktivní metody k zjišťování stavu materiálu. Toto odvětví pracuje například s UV zářením, zmagnetizováním objektu a dalšími procesy. Dále využívají elektrotechniku a zkoumají možné negativní vlivy elektrické energie. Také se věnuje odorologii, což je odvětví zkoumající vznik a fyzikální i chemické složení pachu živých i neživých objektů. V neposlední řadě při mechanoskopii zkoumá stopy po nástrojích, mechanismy vzniku poškození různých povrchů a nástroji samotnými. Mezi další odvětví patří i metalografie věnující se identifikaci kovů i slitin a jejich struktury, nebo trasologie zabývající se vyhledáváním a zkoumáním stop nohou, obuvi, dopravních prostředků a dalších objektů. K identifikaci a zkoumání koster, lebek, chrupů, vlasů a chlupů využívají poznatky antropologie. Provádí se i zkoumání písemností, které vede k určení zhotovení objektu, jeho původní obsahu a odhaluje případné pozměnění, s tím souvisí i metody zkoumání ručního písma, které provádí syntézu písma, porovnává grafický vzhled i užité jazykové projevy. [13, 27]

## 3 DNA

Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA je uložena v jádře buňky či mitochondriích a plní v organismu důležitou roli. Je nositelkou genetické informace organismu a nese nezbytné informace pro životaschopnost buňky [3, 40]. Obsahuje totiž podklady umožňující buňce schopnost růst a rozmnožovat se. Sama ale nevykonává žádné životní pochody, má pouze informativní funkci. Takové životní pochody vykonávají pouze molekuly RNA a proteiny, které jsou složeny podle návodu zakódovaného právě ve struktuře DNA. Úseky genomu, které kódují strukturu určité RNA kyseliny, se nazývají geny [40].



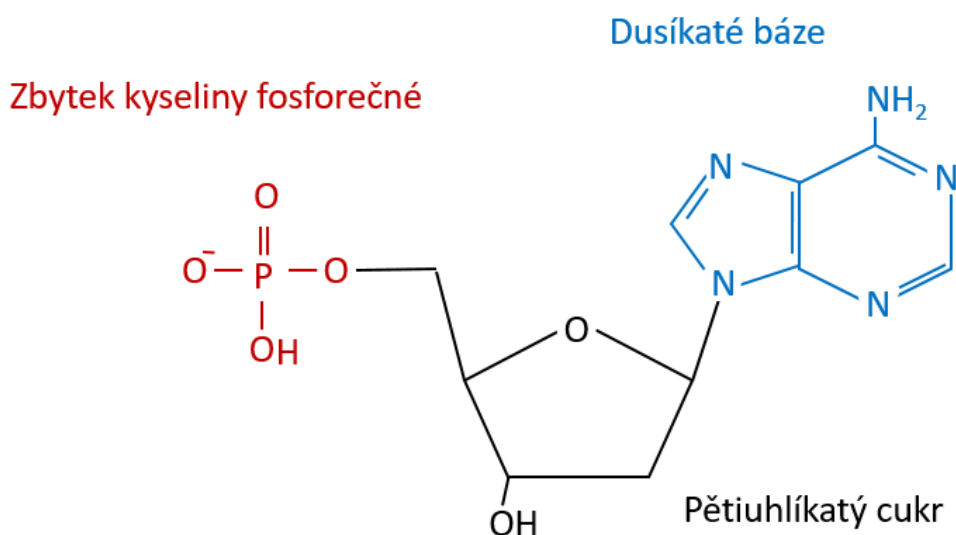
Obr. č. 7: Molekula DNA (převzato z:  
[https://www.godandscience.org/evolution/dual\\_coding\\_dna\\_design.html](https://www.godandscience.org/evolution/dual_coding_dna_design.html))

### 3.1 Primární struktura DNA

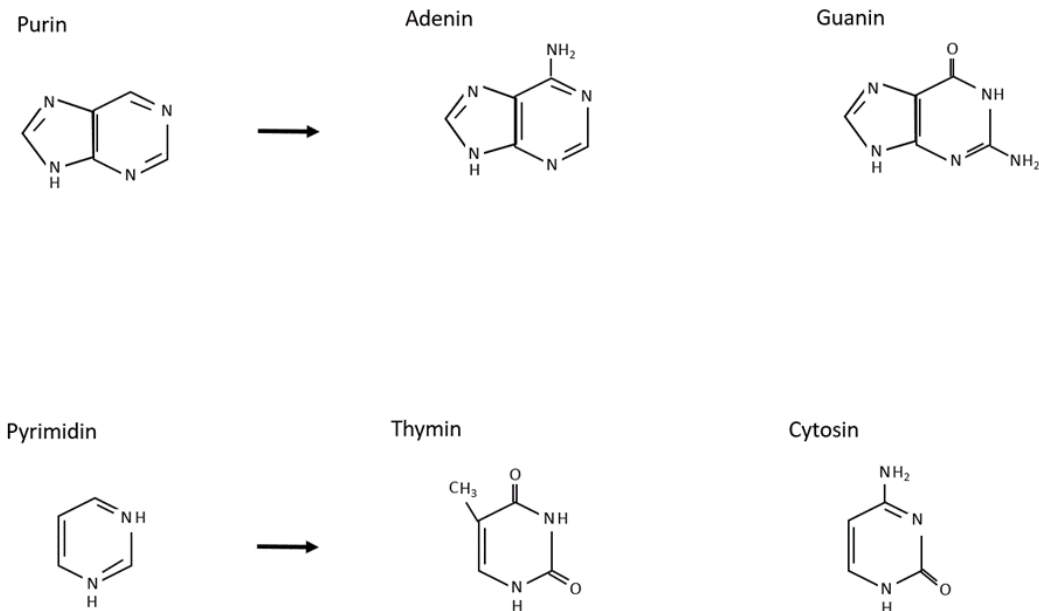
Molekula DNA je polymer složený z jednotek nazývaných **nukleotidy**. Pořadí těchto jednotek označujeme jako primární strukturu dané nukleové kyseliny [40]. Právě tuto strukturu DNA využívá proces genetického profilování [16].

### 3.1.1 Nukleotid

Nukleotid je útvar složený z pětiuhlíkatého cukru (pentózy), zbytku od kyseliny fosforečné (fosfátu) a dusíkaté báze. Pentózou v nukleotidu DNA je 2-deoxy-D-ribóza. Fosfátem je zde zbytek od kyseliny trihydrogenfosforečné. Poslední složkou nukleotidu jsou dusíkaté heterocyklické báze [3, 10]. Základními bázemi nacházejícími se v molekule DNA mohou být buď dva deriváty purinu – adenin (A), guanin (G) nebo dva deriváty pyrimidinu – thymin (T) a cytosin (C). Tyto báze kódují genetickou informaci buňky. Dané báze se navzájem spojují na základě tzv. Chargaffových pravidel tím způsobem, že adenin s thyminem spolu vždy tvoří dva vodíkové můstky a guanin s cytosinem dohromady tři vodíkové můstky [10, 16]. Množství možných vazeb se odvíjí od základní struktury daných bází [3, 16].



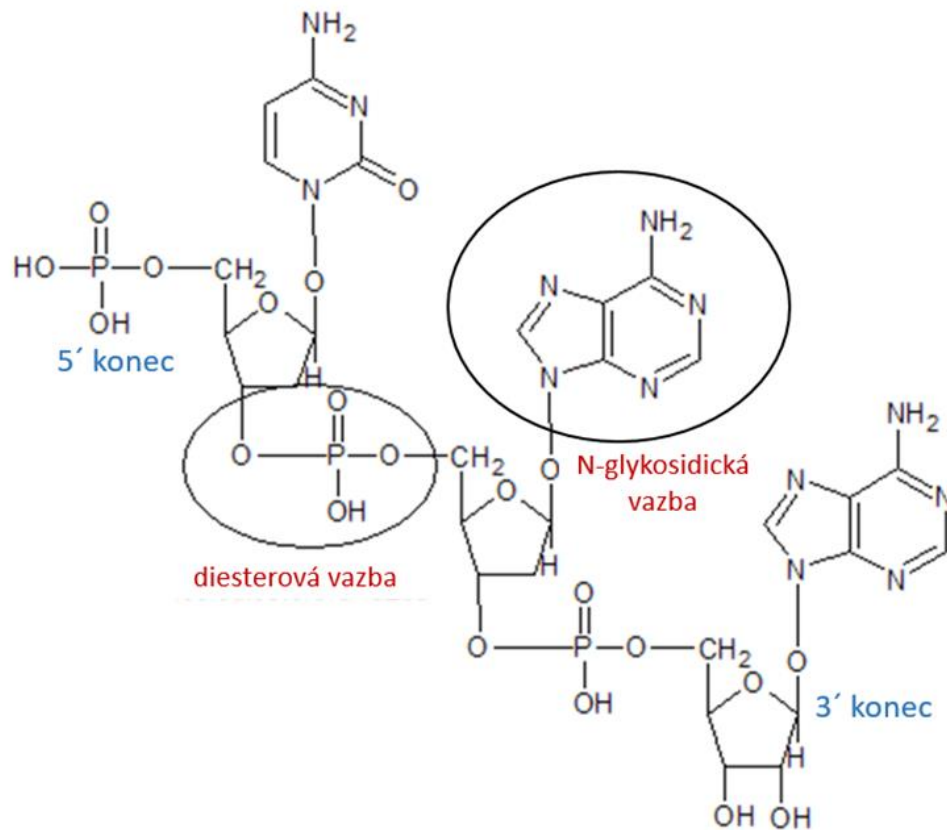
Obr. č. 8: Struktura nukleotidu (převzato a upraveno z: [https://www.webchemie.cz/nukleove\\_kyseliny.html](https://www.webchemie.cz/nukleove_kyseliny.html))



Obr. č. 9: Dusíkaté báze (převzato a upraveno z:

[https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9\\_kyseliny](https://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9_kyseliny))

Báze jsou navázány na 2-deoxy-D-ribózu a tvoří tak útvary označované jako nukleosidy. Podle toho, jakou bázi nukleosid obsahuje, se následně nazývá buď adenosin při účasti adeninu, guanosin při účasti guaninu, thymidin při účasti thyminu nebo cytidin při účasti cytosinu. Po navázání fosfátu vznikají jednotlivé nukleotidy [16]. Molekuly jednotlivých cukrů jsou s fosfáty spojeny esterovou vazbou, která tak tvoří cukr-fosfátovou kostru řetězce dané nukleové kyseliny. Na pentózu se v pozici 5' váže diesterovou vazbou jeden fosfát a na 1' pozici N-glykosidickou vazbou jedna dusíkatá báze. V poloze 3' je následně pentóza přes fosfátovou skupinu napojena na sousední pentózu. Takovou kondenzací nukleotidů vzniká tzv. polynukleotidové vlákno [3].



Obr. č. 10: Řetězec nukleotidů s vyznačenými vazbami (převzato a upraveno z: [http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9\\_kyseliny](http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Nukleov%C3%A9_kyseliny))

### 3.2 Sekundární struktura DNA

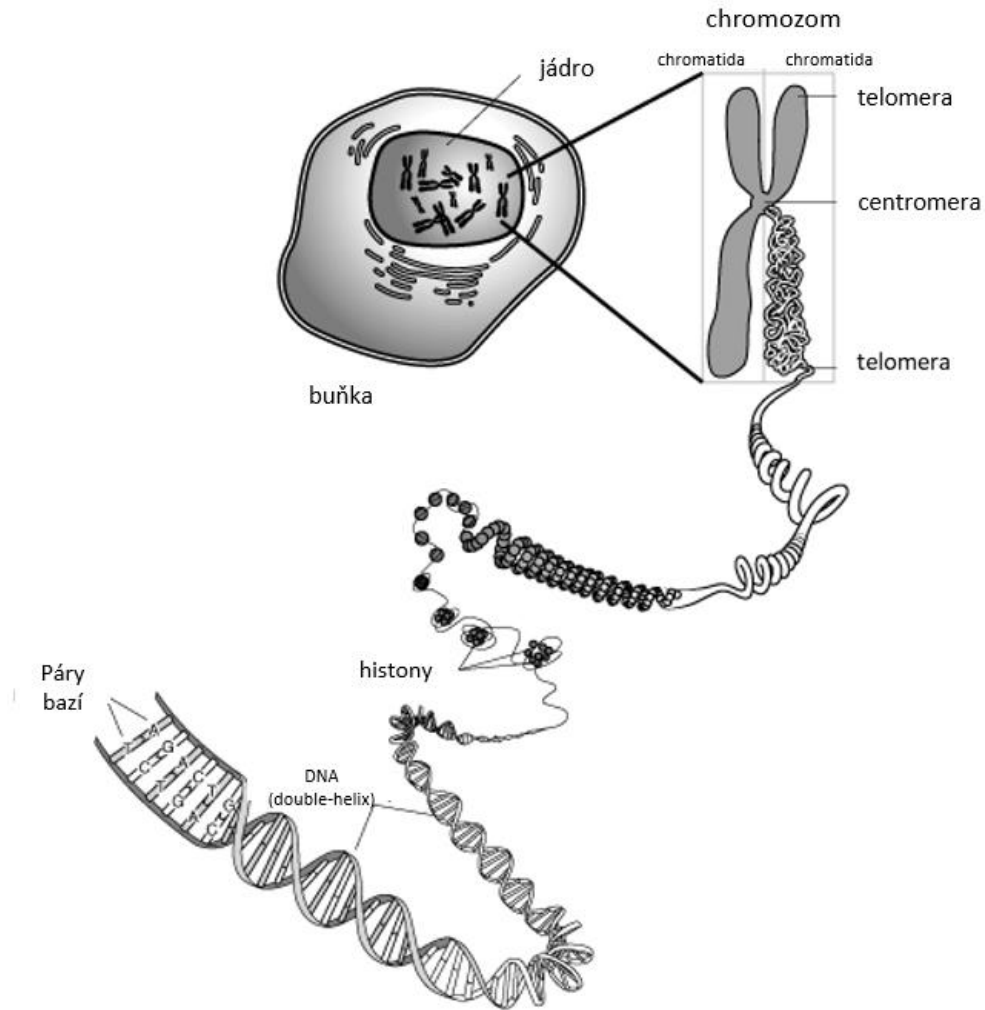
Sekundární struktura popisuje prostorový útvar, který daná molekula tvoří. V případě DNA se tvoří tzv. double-helix neboli dvoušroubovice [3, 16]. Skládá se tedy ze dvou anti-paralelně uložených polynukleotidových vláken, která jsou k sobě poutána vodíkovými můstky vznikajícími mezi bázemi. Jedno z vláken je orientované ve směru fosfodiesterových vazeb od 3'→5' konci a druhé ve směru od 5'→3' konci (jsou tedy orientované protikladně) [36]. Vlákna u sebe drží již zmíněné vodíkové vazby mezi pyrimidinovými a purinovými bázemi jednotlivých řetězců a následně jsou ještě podpořené slabými van der Waalsovými vazbami vznikajícími mezi sousedními bázemi [3, 16].

DNA vytváří několik různých strukturních formací lišících se směrem otáčení, výškou závitů a průměrem závitů [16]. Nejčastější verzí v lidském těle je pravotočivá šroubovice konformace B, kde je poloměr dvoušroubovice 1 nm, výška závitů zhruba 3,4 nm a kde připadá na jeden závit 10 párů nukleotidů. Dalšími nejznámějšími formami jsou například konformace A - pravotočivá, kratší a silnější, nevyskytuje se *in vivo* (v živém těle) a konformace Z - levotočivá a bohatá na cytosin-guaninové sekvence [11].

### 3.3 Další struktury DNA

Veškeré funkční molekuly DNA v živých buňkách podléhají další úrovni uspořádání například tzv. nadšroubovicovému vinutí. Nadšroubovicové závitů neboli superzávitů vznikají v případě rozštěpení jednoho či obou vláken molekuly a následnému zakroucení komplementárních vláken kolem sebe, zatím co opačný konec bývá ukotven bez možnosti otáčení. U téměř všech typů organismů probíhá záporné nadšroubovicové vinutí. Jejich chromozomy poté nemohou bez záporně superspiralizované DNA plnit velké množství svých biologických funkcí. Řada důkazů ukazuje na významnou roli záporného vinutí při replikaci [36]. Další strukturou jsou chromozomy. Chromozomy vznikají asociací bílkovin na molekuly DNA. Jejich vzhled se mění v průběhu buněčného cyklu. V interfázi jsou tyto struktury nenápadné, despiralizované a metabolicky aktivní. Naopak při metafázi mitózy a meiózy dochází ke změně struktury, při které se z chromozomů stávají viditelná tělíčka. Tato změna probíhá formou výrazného zmenšení objemu nazývaného kondenzace. Kondenzovaný chromozom lze rozdělit na několik částí - chromatidu obsahující krátké (p-) raménko a dlouhé (q-) raménko, dále telomery na koncích (obsahující repetitivní sekvence) a centromeru (také obsahuje repetitivní sekvence) [11].

Chromozomy jsou komplexy tvořené tzv. chromatinem, který se skládá z nukleových kyselin a proteinů (histonových a nehistonových). Základní stavební jednotkou chromozomu jsou nukleozomy, což jsou útvary tvořené histonickým oktamerem (sdružení 8 histonů) obtočeným molekulou DNA. Spiralizací nukleozomů vznikají daná chromatinová vlákna a další spiralizací již celé chromozomy. Histony jsou malé specifické bílkoviny obsahující kladně nabitě aminokyseliny (např. lysin, arginin), které zaručují pevné navázání na záporně nabitě fosfátové skupiny DNA. Rozlišujeme 5 základních typů histonů - H1, H2A, H2B, H3 a H4. Histonový oktamer tvoří dvojice typů H2A, H2B, H3 a H4. Typ H1 je vždy umístěn mimo tento oktamer. [11]



Obr. č. 11: Struktura chromozomu a umístění v buňce (převzato a upraveno z:  
<http://www.genetika-biologie.cz/chromozom>

V lidské buňce najdeme 23 párů chromozomů. Z toho je 22 párů autozomálních (nepohlavních), homologních (stejných) – tedy tyto nepohlavní chromozomy jsou v buňce obsaženy vždy v páru. Jeden pár chromozomů je gonozomální (pohlavní), heterologní (odlišný) – tedy obsahují pohlavní chromozomy rozlišené na verzi X a Y. Tyto chromozomy určují pohlaví, kdy XX je žena a XY je muž. [11, 36]



## 4 Genetické profilování DNA

Testování lidské identity proběhlo během historie různými způsoby. Využití DNA k identifikaci osob ve forenzních vědách začalo až v osmdesátých letech 20. století, kdy Alec Jeffreys objevil možnost aplikace RFLP metody na identifikaci osob [9]. Do té doby se využívaly metody zahrnující například testy krevních skupin. Prvním případem kdy byla využita různorodost antigenů na povrchu červených krvinek, byl soudní proces v Itálii roku 1915. Leon Lattes, profesor Institutu forenzní medicíny, využil metodu testování zaschlých kapek krve a poprvé použil genetická data jako důkazní materiál v soudním procesu. Tato metoda se poté rozšířila i do Evropy a obstála po dobu několik desetiletí [35]. Další využívanou metodou se později stalo forenzní profilování proteinů. Sledovaly se tzv. isoenzymy, což jsou také součásti červených krvinek. Ty ale existují pouze ve 2 až 3 formách, takže rozdíl mezi jednotlivci nebyly tolik usvědčující [21].

Genetické profilování DNA patří mezi nejspolehlivější a nejsilnější nástroje forenzních metod identifikace. Tato metoda se nevyužívá jen v kriminalistice, ale například i při testech otcovství nebo identifikaci těl po velkých katastrofách [35]. V následující kapitole bude podrobně popsán celý průběh analýzy DNA, od momentu kdy se teprve odebírají stopy až k samotnému výsledku – genetickému profilu jedince [2].

Důležitou otázkou na začátek je, proč je zkoumána zrovna DNA? Důvodů najdeme více. Největší výhodou je, že jsou nukleové kyseliny obsaženy v každé buněčné struktuře a mají velmi specifickou strukturu. Mimo buněčný prostor ale snadno podléhají degradaci. Tu mohou vyvolat různé fyzikální i chemické vlivy, které způsobují rozpad molekuly na stále kratší fragmenty. Může se stát, že fragmenty budou menší než sledovaný lokus (přesné místo na chromozomu, které obsahuje příslušný gen) [9, 36]. Z takové DNA poté lze získat jen velmi slabé nebo žádné výsledky. Pouze nová metoda zvaná Polymorfismus krátkých tandemových repetitivních sekvencí (STRP), dokáže vytvořit profil i z poměrně velmi fragmentovaného vzorku. Je vědecky potvrzeno, že DNA těmito vnějšími vlivy nedokáže změnit svou strukturu a podat tak mylné výsledky. Po nadměrném poškození pouze nevytvoří žádný profil. Toto zjištění bylo velice důležité, neboť potvrdilo, že při této analýze nelze při určování identity pochybit. Jelikož se profil DNA degradací nemůže změnit, nemusíme se bát, že by identický profil vznikl samovolně a nepocházel od dárce. Další studie také prokázaly, že je DNA dokonce více odolná než ostatní konvekční genetické sloučeniny využívané ve forenzních testech. Na rozdíl od různých konvekčních

proteinů a enzymů, které podléhají degradaci do 2 až 3 měsíců, nukleová kyselina vydrží ve vhodných podmínkách zachována několik let [9].

## 4.1 Metody používané ve forenzní analýze DNA

### 4.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Dalším významným milníkem bylo objevení Polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR). Tuto metodu kdy dochází k množení DNA *in vitro* (mimo tělo, ve zkumavce), vynalezl Kary Mullis a roku 1985 za svůj přínos obdržel Nobelovu cenu. Jedná se o techniku amplifikace neboli množení jednotlivých fragmentů DNA ve vzorku. [28, 39]

Principem této metody je cyklická enzymatická syntéza vybraných řetězců DNA vedoucí k exponenciálnímu namnožení cílového úseku DNA [15]. Celý tento proces probíhá v přístrojích zvaných tzv. termocykléry. Tyto přístroje jsou schopny velmi rychlého přechodu teplot [16]. Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci DNA, ale zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Bez této metody by nebylo možné analyzovat velké množství vzorků. Stopy odebrané z místa činu jsou často limitované jak množstvím, tak kvalitou. Metoda PCR je ale velice citlivá, rychlá a není tak limitovaná kvalitou a množstvím DNA jako například metoda RFLP. K úspěšnému výsledku stačí pár stovek párů bází, jejichž molekulární hmotnost se může pohybovat kolem 0,3 -0,5 ng [2]. Další výhodou PCR metody je možnost vytvoření požadované specifické sekvence DNA, aniž by byla nejprve klonována ve vektorech [4]. Proces PCR může být i negativně ovlivňován některými chemickými látkami tzv. inhibitory. Takové látky mohou být ve styku se vzorkem již na místě činu. Například stopy krve lze nalézt již na různých materiálech (listy, půda, dřevo, textilie) obsahujících určité inhibitory. Jako konkrétní příklady inhibitorů lze uvést například hematin pocházející z krve, melanin z chlupů, polysacharidy a žlučové soli ze stolice, močovinu z moči, textilní barviva z oblečení atd. [35].

K zajištění věrohodnosti výsledků PCR využíváme různé kontroly efektivnosti. Tyto kontroly PCR reakcí potvrzují vhodnost podmínek a zvolené techniky. Nejčastěji se provádí tzv. negativní kontrola, při které se zúčastní procesu PCR veškeré komponenty kromě templátové DNA. Takto lze zjistit, zda nebyl nějaký komponent náhodou kontaminován jinou DNA, která by mohla negativně ovlivnit celkový výsledek. Dále se

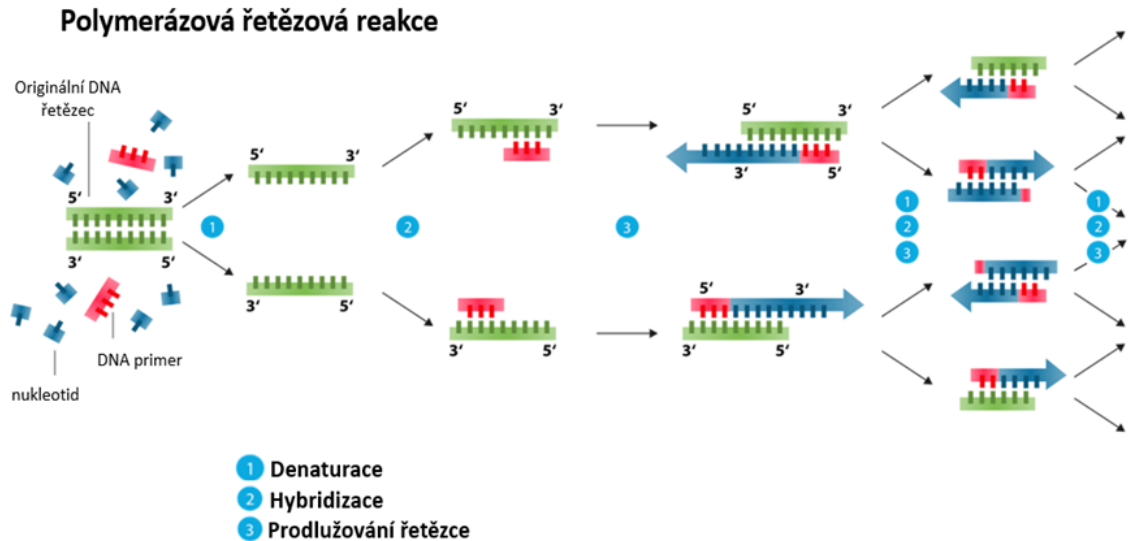
využívá i tzv. pozitivní kontrola, která sleduje, zda nějaký z komponentů neselhal. Zde se používá standartní templát DNA a stejné primery. [2]

#### **Reakční směs Polymerázové řetězové reakce obsahuje:**

1. sekvence dvouřetězcové DNA, která slouží jako předloha
2. dva oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k 3' koncům obou řetězců dané DNA
3. termostabilní enzym – DNA polymeráza, nejčastější je *Taq* polymeráza
4. směs deoxyribonukleotidů, ze kterých se bude skládat nový řetězec
5. reakční pufr obsahující  $Mg^{2+}$  ionty, které zajišťují aktivitu termostabilní DNA polymerázy [16, 28].

#### **Průběh Polymerázové řetězové reakce:**

Nové řetězce DNA se syntetizují vždy ve směru 5'→3' pomocí enzymu DNA-polymerázy. Sledovaný úsek DNA je vymezen připojením dvou primerů. Primery jsou krátké syntetické fragmenty DNA (20-30 nukleotidů), které musí být komplementární k bázím daného templátu [9]. Primery se napojí na konce templátové DNA a označí tak začátek syntézy. Kromě primerů se ke vzorku přidávají také DNA polymerázy a volné nukleotidy. Po přidání všech složek se spouští syntéza, která probíhá na obou vlákních souběžně a vytvoří tak z jedné molekuly dvě nové. Pro správnou syntézu DNA se používají tzv. termostabilní polymerázy. Nejčastěji využívanou je *Taq* DNA-polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza odolává vysokým teplotám, které jsou potřebné k denaturaci dvouvláknové DNA [28, 39].



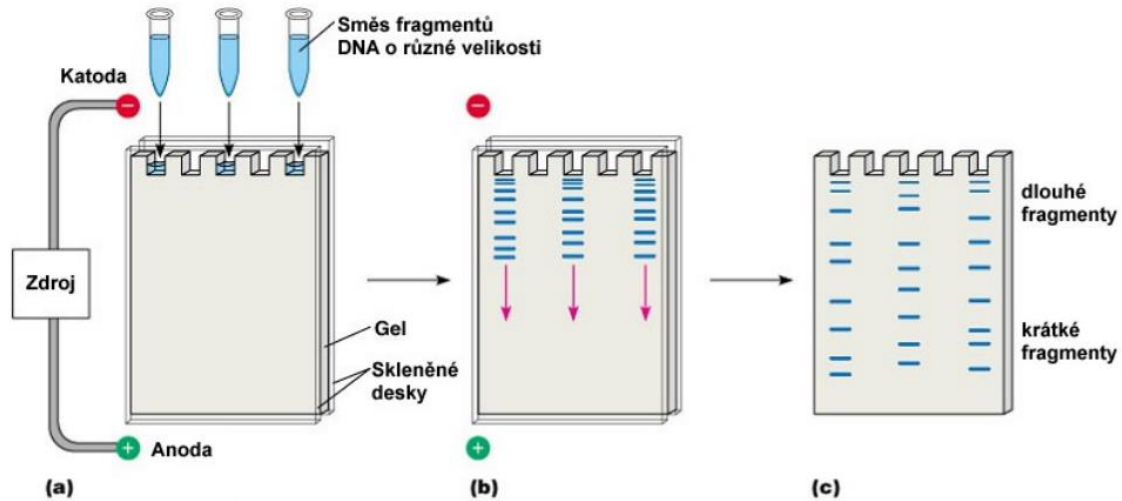
Obr. č. 12: Polymerázová řetězová reakce (převzato a upraveno z: <http://www.socmucimm.org/pcr-polymerase-chain-reaction/>)

#### Souhrnně tedy Polymerázová řetězová reakce probíhá ve třech krocích:

1. fáze – **denaturační** – rozrušení vodíkových můstků a oddělení dvou řetězců DNA. Provádí se pomocí vysoké teploty (94 °C) trvající 20-30 sekund
2. fáze - **hybridizační** - připojení primerů na jednovláknové řetězce DNA za snížení teploty (50-65 °C)
3. fáze – **prodlužovací** – s pomocí DNA-polymerázy probíhá syntéza nových řetězců DNA za zvýšení teploty (65-75 °C) [15].

#### 4.1.2 Elektroforéza

Již v roce 1892 bylo publikováno, že koloidním roztokem v elektrickém poli putují anorganické částice určitým stálým způsobem. Následně byl stejný jev popsán i u proteinů obsažených ve vodních roztocích. Nicméně až v roce 1948 získal švédský vědec Arne W. Tiselius Nobelovu cenu za sestavení elektroforetické aparatury. Elektroforéza je separační metoda, která se v molekulární biologii využívá k izolaci nukleových kyselin a bílkovin. Principem této metody je pohyb nabitých částic v jednosměrném elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu závisí na celkovém náboji, velikosti i tvaru molekuly a také na její koncentraci v roztoku. Nukleové kyseliny mají díky fosfátové skupině záporný náboj, který udává pohyb molekuly od anody (kladná elektroda) ke katodě (záporná elektroda). [4, 15]



Obr. č. 13: Elektroforéza (převzato z: [https://fvhe.vfu.cz/files/mbhp\\_2018\\_02.pdf](https://fvhe.vfu.cz/files/mbhp_2018_02.pdf))

#### 4.1.3 Polymorfismus délky restričních fragmentů

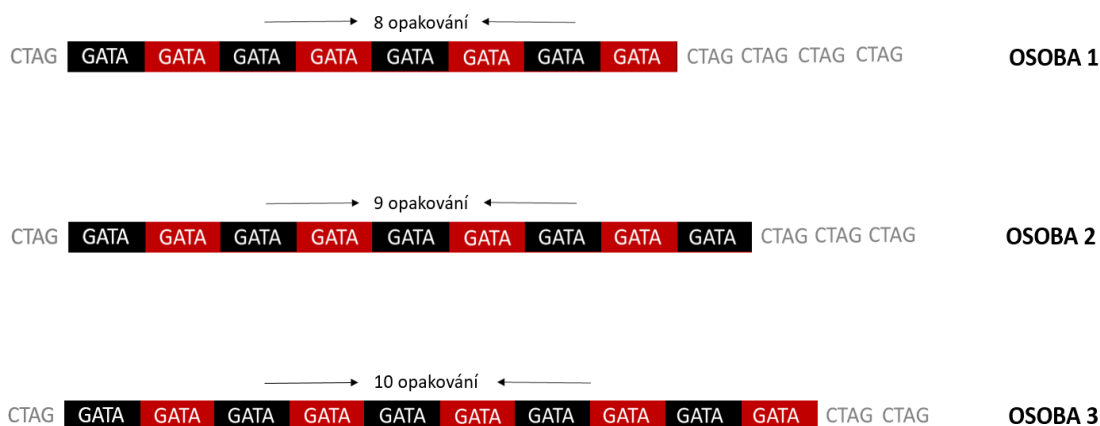
Roku 1980 David Botstein se spolupracovníky využíval odlišnosti genetických sekvencí jednotlivců ke konstruování lidské genové mapy. Sledoval tehdy rozdíly v délkách určitých opakujících se fragmentů DNA (Variable Number Tandem Repeat, VNTR). Na tuto myšlenku navázal anglický genetik Dr. Alec Jeffreys a následně ji aplikoval na vědeckou identifikaci jednotlivých osob [9]. Roku 1985 pak publikoval své poznatky o možnosti využití repetitivních sekvencí DNA k diferenciaci jednotlivců a odstartoval tak první fázi testování DNA [2]. Tuto metodu popsanou Dr. Jeffreysem známe pod názvem Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) a byla první metodou využívanou k analýze DNA [35, 37].

Tato analýza sleduje různé variace délky určitého fragmentu DNA tak, že vlákno rozštěpí tzv. restričními endonukleázami (enzymy) přesně v místech specifických sekvencí. Nejvíce využívaný enzym laboratořemi v USA nese název *Hae III* (pocházející z *Haemophilus aegyptius*). Tento enzym rozpozná sekvenci Guanin Guanin /Cytosin Cytosin a v tomto místě řetězec pokaždé rozštěpí [2, 35]. Vzniklé fragmenty se následně pomocí elektroforetické separace rozdělí v gelu podle délky. Množství a velikosti těchto fragmentů jsou pro každého jedince specifické a tak se dá porovnáním výsledků dvou vzorků určit, zda jde o tu samou osobu [20, 35].

RFLP umožňuje zaznamenat vysoký stupeň rozlišení v jednom lokusu a tak i lehce určit, zda je v daném vzorku DNA více osob. I přes tyto výhody dnes tato metoda není již tolik využívána. Oproti novějším postupům je zde potřeba poměrně velké množství kvalitně zachované DNA. Forenzní stopy jsou ale často staré, degradované a v omezeném množství, takže se tato metoda nedá vždy využít. Dostačující množství nukleových kyselin potřebných k provedení RFLP metody musí mít alespoň 500 ng molekulové hmotnosti DNA [17, 37]. Také záleží na vybavení laboratoře a dalších podmínkách. Jeden originální RFLP test probíhal až několik týdnů. Výsledkem RFLP metody je schéma, které lze přirovnat k velmi jednoduchému čárovému kódu [9].

#### **4.1.4 Polymorfismus krátkých tandemových repetit**

Polymorfismus krátkých tandemových repetit (Short Tandem Repeat Polymorphism, STRP) je modernější a v současnosti nejvyužívanější metoda. Je poměrně podobná metodě RFLP, ale pracuje s jinak získanými fragmenty DNA [37]. Lidská DNA je z 10 % tvořena tzv. kódující částí, která obsahuje informace určující vlastnosti organismu. Zbylých 90% je tvořeno „nekódujícími“ oblastmi, které zřejmě neslouží ke kódování genů a často obsahují opakující se úseky. Tyto úseky bývají tvořeny 2-4 nukleotidy, které jsou mnohokrát opakované. Označujeme je jako tzv. tandemové repetice a v lidské DNA jich je dnes známo více než 8 000. Počet a složení těchto repetit je velice individuální. To je nejspíš dáno tím, že probíhající mutace zde nejsou řešeny, neboť se jedná o „nekódující“ část DNA. V momentě kdy mutace probíhají naopak na kódujících genech, bude organismus nejspíš poškozen a nepřežije, tudíž se jeho pozměněná genetická výbava nepřenese do dalších generací [17, 26]. Krátké tandemové repetice se vždy zkoumají ve větším počtu. Je pravděpodobné, že najdeme jedince s jedním stejným lokusem. Když se ale testuje více lokusů, pravděpodobnost se blíží k nule. V současnosti se takových lokusů běžně testuje 16 až 30. Na rozdíl od metody RFLP zde stačí k testování pouze 50 pg DNA. Jedná se o extrémně citlivou metodu [19, 41].



Obr. č. 14: Krátké tandemové repetice 4 bází (GATA) tří různých osob na stejném lokusu (převzato a upraveno z: <https://royalsociety.org/-/media/about-us/programmes/science-and-law/royal-society-forensic-dna-analysis-primer-for-courts.pdf>)

#### 4.1.5 Komerčně vyráběné kity

V posledních letech byla práce s analýzou DNA ještě zjednodušena možností využívat tzv. kity. Kit je předpřipravená chemická soustava využívaná při analýze DNA v mnoha reakcích – v případě, že mluvíme o genetickém profilování, je využíváme v izolaci, kvantifikaci a amplifikaci DNA. Tyto soupravy jsou komerčně vyráběné různými společnostmi a využívány nespočtem laboratoří. [2]



Obr. č. 15: Komerčně vyráběný kit QIAGEN Multiplex PCR Plus kit (převzato z: <https://www.dynex.cz/material/-696/>)

## 4.2 Zajištění stop

### 4.2.1 Sběr biologických stop

DNA představuje biologický materiál, který často zůstává na místech činu. DNA se dá izolovat z různých biologických materiálů a díky metodě PCR kdy dochází k namnožení molekul DNA, může docházet k úspěšnému testování. Aby ale mohly být analýzy DNA brány jako solidní důkaz u soudu, musí se dodržovat pravidla práce s tímto materiálem od samého začátku. Důležité je správné odebrání vzorků, skladování i přemístění do laboratoře. Národní institut spravedlnosti v USA vydal soubor pravidel „What Every Law Enforcement officer Should Know About DNA Evidence“, který pomáhá pracovníkům, kteří se budou pohybovat na místě činu poprvé. Například je zcela nutné nosit rukavice, které se musí měnit po manipulaci s každou stopou, okamžitě se stopy musí zvlášť zabalit do papírových obálek (v plastových sáčcích by hrozila degradace DNA kvůli vlhkosti, která se drží uvnitř). [2]

Existují dva typy odebírání stop. Prvním způsobem je **přímý odběr** stopy. Tento postup je velice využívaný, neboť je tam menší riziko ztráty materiálu. Nejčastěji se jedná například o části oblečení nebo jiné věci, které se uloží například do boxů a dále se s nimi manipuluje až přímo v laboratoři. Sejmutí vzorku je tedy provedeno analytikem, který má lepší podmínky a provede odběr kvalitněji. Druhým typem odebírání stop je **převedení vzorku na lépe přenosný materiál**, nejčastěji vatovou tyčinku. Hodně se využívá metoda dvojitého stěru, kdy se poprvé místo přetře tamponkem navlhčeným destilovanou vodou a tím rehydratuje (zavodní) povrch. Druhý stěr se provádí již suchou vatovou tyčinkou, na kterou se již buňky lépe nalepí. Následně musí být ale vata se vzorkem opět vysušena, aby nehrozilo poškození substancí vlhkem. Odebrané vzorky musí být vždy porovnány se vzorkem obviněného či odsouzeného [9]. Výhodou je možnost odběrů bezbolestně. Většina laboratoří využívá stěr z bukální sliznice, protože zde dochází ke snadnému uvolnění buněk. Další možností je „odebrání“ několika kapek krve na filtrační papír. Výhodou této metody odběru krve je, že je okamžitě zřejmé, jestli se odběr zdařil [2].

### 4.2.2 Skladování stop

Získané stopy musí být uloženy na chladném a suchém místě, aby se zabránilo množení bakterií a degradaci (rozložení na menší fragmenty), neboť by potom již nebylo možné sestavit genetický profil. Nejčastěji bývají vzorky umístěny do chladničky se 4 °C nebo



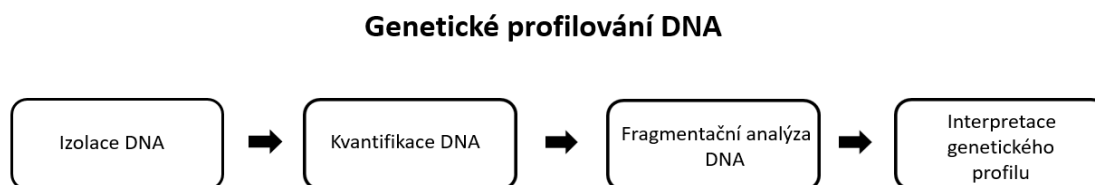
- 20 °C, ale při dlouhodobém skladování je potřeba teplota dosahující až k -70 °C. Dále je nutné vzorek před uložením vysušit a zabránit tak rozpadu molekuly DNA vlivem vlhkosti. Stabilita polymeru DNA může tedy být ovlivněna časem, teplotou, vlhkostí, světlem nebo vystavením nějaké chemické látky [2, 9]. Testy biologických stop jsou vždy destruktivní, protože při testu dochází ke spotřebování látek. Je tedy potřeba i přes veškeré pokusy udržovat určité stálé uskladněné množství vzorku, aby mohl být případně znovu testován. Žádný test nesmí vzorek zcela zničit [1, 2].

### 4.2.3 Určení charakteru stopy

Při přijetí stopy do laboratoře není pokaždé zjevné, jestli stopa obsahuje nějaké biologické vzorky nebo ne. Většina laboratoří tedy začíná orientačním testem. Tento test má odhalit, zda je na zajištěné stopě nějaký tekutý biologický materiál jako například krev, sperma, sliny atd. Takové testy by měly být vždy jednoduché, finančně nenáročné a snadno proveditelné. Testování probíhá pomocí kartičky, jejíž membrána obsahuje určité protilátky reagující s biologickým materiálem. Při kontaktu membrány s biologickým vzorkem proběhne reakce, která na kartičce zanechá barevný proužek. Orientační testy krve se zaměřují na hemoglobin, testy slin na amylázu, testy spermatu na kyselou fosfatázu nebo na specifický prostatický antigen atd. [2]

## 4.3 Genetická analýza

Genetická analýza DNA se skládá z jednotlivých procesů - izolace DNA, kvantifikace DNA a fragmentační analýzy DNA. Tato analýza DNA vede k vytvoření genetického profilu, který odborníkům slouží k identifikaci osob. [36]



Obr. č. 16: Schéma genetického profilování DNA (vlastní tvorba)

### 4.3.1 Izolace DNA

Před samotným testováním DNA je potřeba tuto molekulu izolovat od ostatních částí buněčného obsahu. Izolace se provádí několika základními způsoby, které závisí na tom, o jaký typ biologické stopy se jedná. Například s krví se musí zacházet jinak než

se zaschlými krevními skvrnami nebo kousky kostí [4, 16]. Izolovat DNA je možné za pomoci několika metod:

### ***Organická (Fenol-chloroformová) extrakce***

Tato extrakce nechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí a postupně odstraňuje nečistoty přidáváním různých chemických látek. Přidáním SDS (dodecylsírán sodný) a proteinázy K dochází k rozpadu buněčných struktur a degradaci proteinů, které chrání DNA v chromozomech. Po přidání fenol-chloroformu dojde k odpoutání proteinů od DNA a následnou centrifugací dochází k izolaci samotné DNA [2, 9]. Tato metoda byla velice využívána, ale novější typy extrakcí nyní využívají méně toxické látky a proto se dnes už nevyužívá [2].

### ***Chelexová extrakce***

V této extrakci se využívá var a působení chelatačních činidel, kterými mohou být například divinylbenzenové pryskyřice. Varem se naruší membrány buněk, DNA s ostatními složkami se uvolní do roztoku a následně se chelexové jednotky naváží na látky, které by mohly reagovat s DNA. Po odstranění ostatních složek centrifugací dostáváme samotnou DNA, která se ale vlivem varu rozpadla na jednotlivá vlákna a netvoří tak již typickou dvoušroubovici. S jednovláknovou molekulou už ale dále nemůže pracovat metoda RFLP. Pokračuje se tedy pomocí PCR, což může vést k STR analýze. [2, 9]

### ***Qiamp Extrakce***

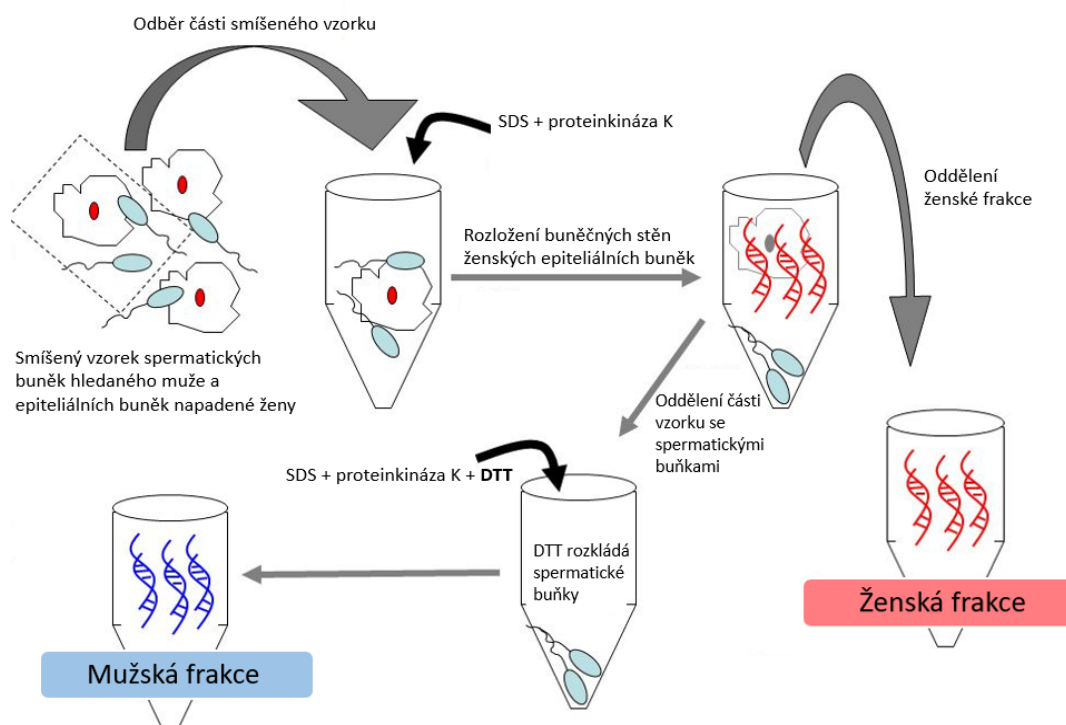
Tato extrakce patří mezi metody založené na adsorbci na silikát. Tyto metody využívají adhezi DNA na silikátové povrchy (např. sklo nebo křemelina) a vymytí ostatních složek vyplavených z buňky. Konkrétně Qiamp extrakce také využívá k oddělení DNA od ostatních složek, její schopnost adheze na daný povrch. Adhezi záporně nabitě DNA na záporně nabitěho sklo zajišťují chaotropní soli - například guanidin hydrochlorid, chloristan sodný a další. Následně dochází k promývání ethanolem a po odstranění veškerých nečistot může být DNA opět uvolněna vhodným puforem. [2]

### ***Rozlišovací extrakce***

Jedná se o modifikovanou verzi organické extrakce. Nejčastěji se využívá u sexuálních napadení a pracuje se směsí DNA. Směs lze rozdělit na část se spermatickými buňkami a část s ostatními epiteliálními buňkami (nejčastěji jde o vaginální buňky). Cílem této metody je rozlišení těchto dvou složek a následné oddělení mužské DNA pachatele od

ženské DNA oběti. Proces se dělí na dvě základní fáze. V první fázi dochází k rozbití buněčných membrán speciálními chemickými látkami – SDS (dodecylsírán sodný) a proteinkinázou K - působícími specificky jen na nespermatické buňky. Tato frakce s buněčnými obsahy epiteliálních ženských buněk je následně oddělena a ve vzorku zůstávají jen buňky původu mužského. Druhou částí je lyze (rozbití) membrán spermatických buněk pomocí DTT (dithiothreitol) a uvolnění jejich obsahu do roztoku. Samotná izolace DNA u obou frakcí poté probíhá jako klasická organická extrakce. [2, 9]

## Rozlišovací extrakce



Obr. č. 17: Průběh rozlišovací extrakce (převzato a upraveno z: <https://slideplayer.com/slide/5731980/>)

V současnosti se k izolaci DNA využívají komerčně prodávané izolační kity (soustavy látek pomáhající reakci), které lze rozdělit do dvou skupin:

- a) Kit pro izolaci DNA z tělních tekutin – slouží k získávání DNA z krve, plazmy, séra, moči či bukalních stěrů
- b) Kit pro izolaci DNA z tkání – umožňuje získat DNA z různých typů tkání [2].

### **4.3.2 Kvantifikace DNA**

Kvantifikace DNA zahrnuje stanovení množství získané DNA. Tento krok je důležitý kvůli rozhodnutí o dalším postupu analýzy. Například u PCR může extrémně malé i velké množství narušit nebo úplně zastavit celý proces [2]. Stanovení koncentrace extrahované DNA lze provést následnými metodami:

#### ***Spektrofotometrické měření***

Tato metoda byla využívána především v počátcích forenzní genetiky. Mezi její nevýhody patří náročnost na spotřebu vzorku, obtížnost analýzy malého množství nukleových kyselin a vysokou možnost ovlivnění výsledků přítomností některých látek (např. bílkovin, fenolů). Podstatou tohoto stanovení množství je vysoká míra absorpce ultrafialového záření (délka 260 nm) molekulami DNA. Množství absorbovaného UV záření vzorkem je přímo úměrné obsahu DNA v použitém roztoku. [2, 4]

#### ***Slotblot***

Tato metoda byla nejvíce využívána od pozdních 90. let 20. století po začátek 21. století. Nejprve byly využívány radioaktivní sondy, ty ale byly časem nahrazeny chemiluminiscenčními a kolorimetrickými detekčními variantami. Chemiluminiscence je proces vydávání záření vzniklého pomocí chemické reakce. Kolorimetrie je metoda určení koncentrace pomocí míry zbarvení vzorků [4]. Tento proces umožnil zachytit genomickou DNA na nylonovou membránu a následně k ní přidat specifické sondy. Výsledné kolorimetrické intenzity zbarvení se následně porovnávají s barvou stanovených vzorků, u kterých známe koncentraci. Stanovení kvantifikace kolorimetricky tedy znamená porovnávání vzorku s neznámou koncentrací se vzorkem stanoveným. Toto porovnávání probíhá pouze vizuálně, tudíž je výsledek subjektivně ovlivněn samotným analytikem. I přes to, že byly později vyvinuty i počítačové programy na porovnávání, se dnes tato metoda nepoužívá [2, 4].

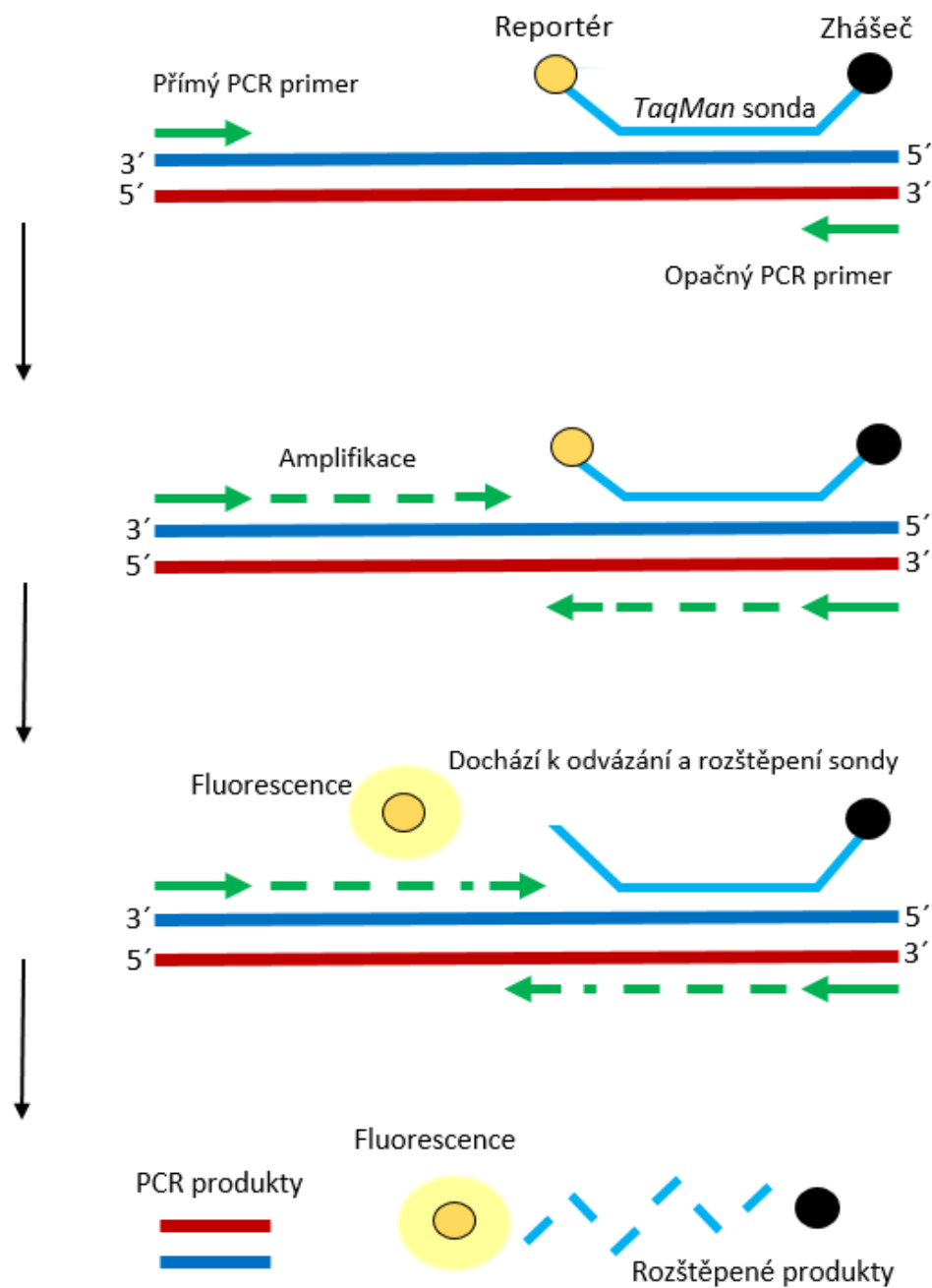
U obou zmíněných metod (Spektrofotometrické měření, Slotblot) je dále nutné namnožit danou DNA, to se provádí pomocí klasické PCR amplifikace. [2]

#### ***Real-time PCR***

Real-time PCR je dnes nejvíce využívaná metoda kvantifikace DNA. Tato metoda je založena na principu klasické PCR, která během amplifikace navíc kontinuálně zaznamenává aktuální množství získané DNA – odtud název Real-time PCR [2]. Využívá

se zde speciální přístroj tzv. cyklér, který zaznamenává změnu koncentrace fluorescenčních substrátů [4]. Tyto substráty získávají fluorescenční schopnost až po reakci s DNA, samotný substrát se tedy nijak neprojevuje [4, 25].

Pro zdroj fluorescence se využívá několik technologií, SYBR Green, *TaqMan* sondy, Scorpion sondy, FRET a další. SYBR Green je na rozdíl od ostatních substrátů vzhledem k vazbě na DNA nespecifický, váže se kdekoliv. Výsledky po použití SYBR Greenu tedy mohou být v některých případech méně přesné. Naopak *TaqMan* sondy patří mezi dvojité barvené sondy a ve vazbě na DNA jsou specifické, vždy se váží mezi primery. Jsou to nukleotidy obsahující na 5'konci reportéry a na 3'konci zhášeče, které fluorescenci reportéru prozatím blokují. Teprve po odvázání a vzdálení reportéru od zhášeče dochází k jeho očekávané fluorescenci. K aktivaci zde dochází při amplifikaci komplementární DNA, kdy je sonda hydrolyzovaná (rozložena) činností *Taq* polymerázy. [25]



Obr. č. 18: Real-time PCR (převzato a upraveno z: [https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/polymerase\\_chain\\_reaction\\_qpcr.php](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php))

Pro usnadnění amplifikace (namnožení) se využívají amplifikační kity. Tyto kity jsou specificky připraveny k tomu, aby k nim bylo přidáno určité množství DNA - takto lze dosáhnout nejlepšího výsledku. V současné době je počet STR lokusů amplifikačních kitů

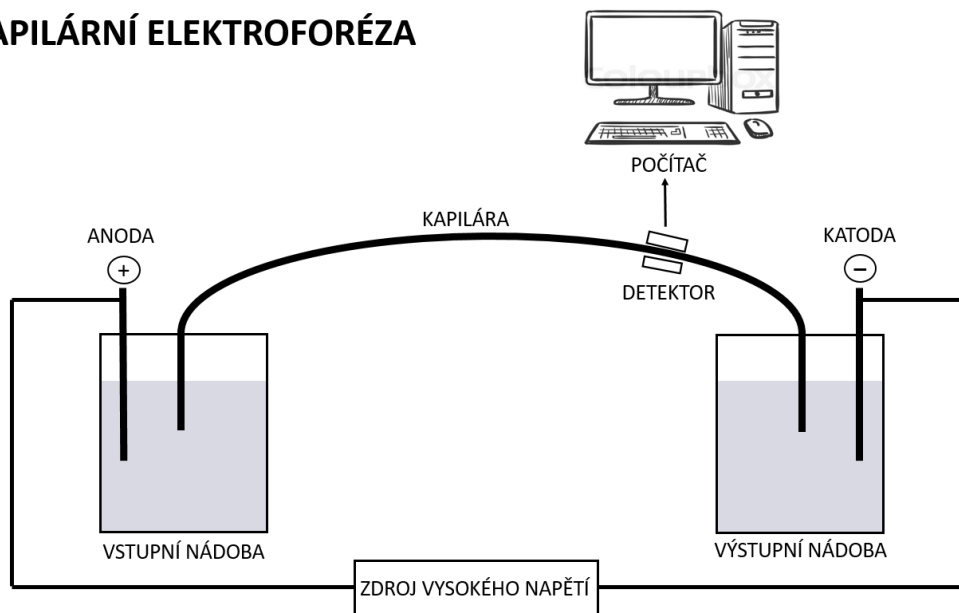
nastaven minimálně na standardních 15. Dříve se primery značily stříbrem, ale dnes se využívá fluorescenčních barviv. Amplifikační kit se skládá z pufru (vnitřní prostředí pro amplifikaci), primerů, DNA pozitivní kontroly a někdy i postamplifikační části obsahující vnitřní standart (tato část se ale musí často objednat zvlášť). [2]

### **4.3.3 Fragmentační analýza**

Po amplifikaci následuje proces tzv. fragmentační analýzy, který zahrnuje označení DNA fragmentů fluorescenčními barvivy a rozdělení podle velikosti. Tato metoda pomocí kapilární elektroforézy analyzuje velké množství markerů (známé sekvence DNA, které mohou být jednoduše identifikovány - v našem případě krátké tandemové repetice, STR). Jedná se o relativně mladou metodu, ale i přesto je v současné době považována za jednu z nejspolehlivějších. Proto je dnes ve forenzní praxi nejvíce využívána. Tato metoda využívá pohyb fragmentů DNA ve speciálním akrylamidovém gelu, který je uzavřen v kapiláře napojené na elektrody. Průběh pohybu vzorku DNA v kapiláře je obdobný jako u ostatních typů elektroforéz. Již v průběhu PCR musí dojít k začlenění primeru s fluorescenčními vlastnostmi do řetězců DNA. Díky fluorescenční schopnosti jednotlivých fragmentů DNA může docházet k finální detekci. Fragменты putují postupně - od velikostně nejmenších po největší - až do koncové části kapiláry, kde se nachází okénko osvětlované laserem. Laserový paprsek zde indukuje fluorescenci připojených primerů a ta je poté odečítána detektory jako tzv. píky. K porovnání fragmentů slouží velikostní žebříček neboli vnitřní standart, který je vždy přidán přímo k analyzovanému vzorku. Předmětem zájmu je zde velikost fragmentu a jeho kvantita. Analyzují se zde STR markery (krátké tandemové repetice), které byly speciálně vytipovány pro forenzní využití a jsou tak zahrnuty ve většině komerčně vyráběných kitů. [2]

Kapilární elektroforéza probíhá v tzv. sekvenátorech – automatizované genetické analyzátořy. V současnosti existují osmi, šestnácti a devadesáti šesti kapilárové sekvenátory, ve kterých probíhá tato analýza paralelně. [18]

## KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA



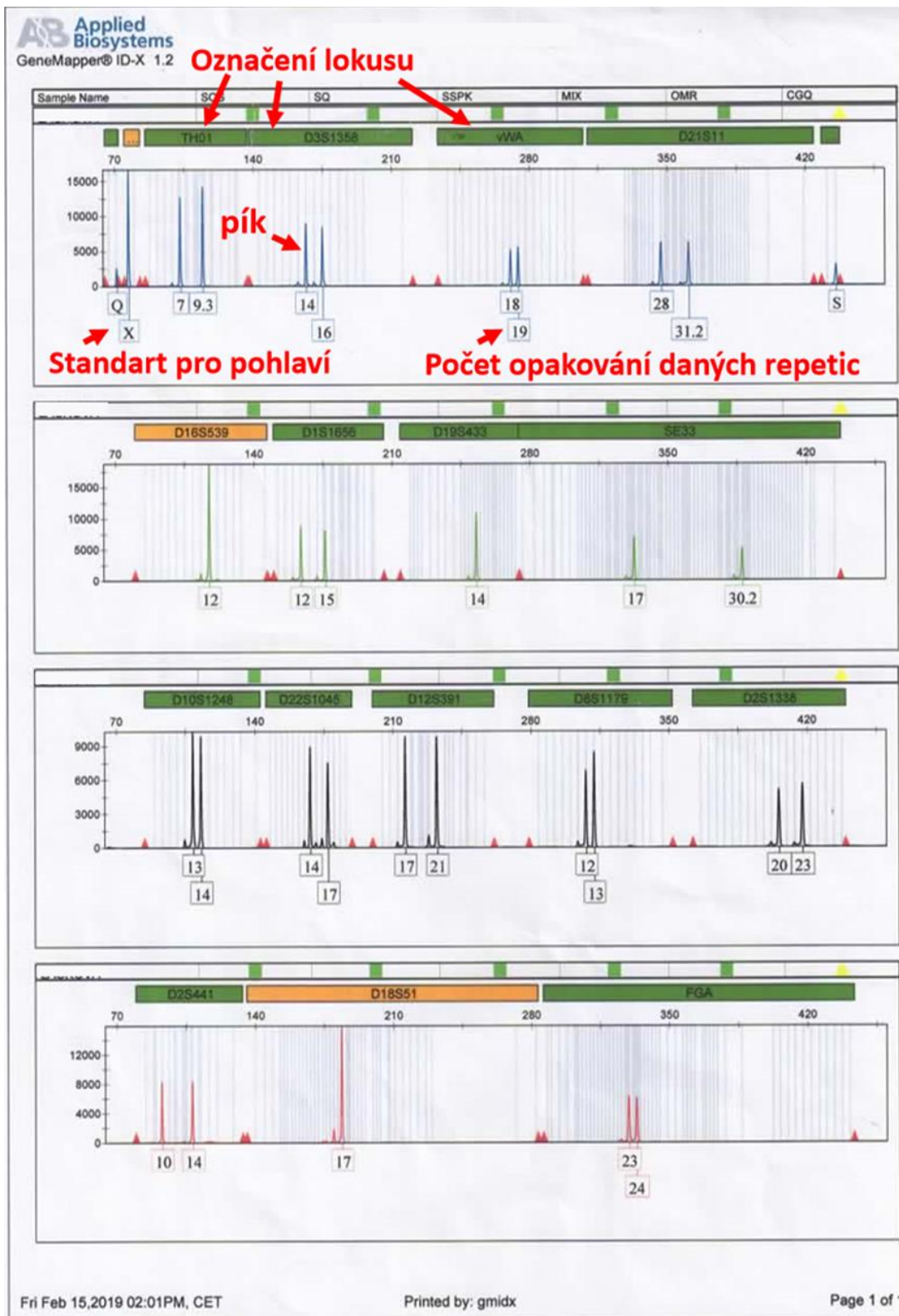
Obr. č. 19: Kapilární elektroforéza (převzato a upraveno z:

<https://vi0pp.blogspot.com/2018/09/procedure-dellanalisi-strutturale-del.html>)

### 4.4 Genetické profily

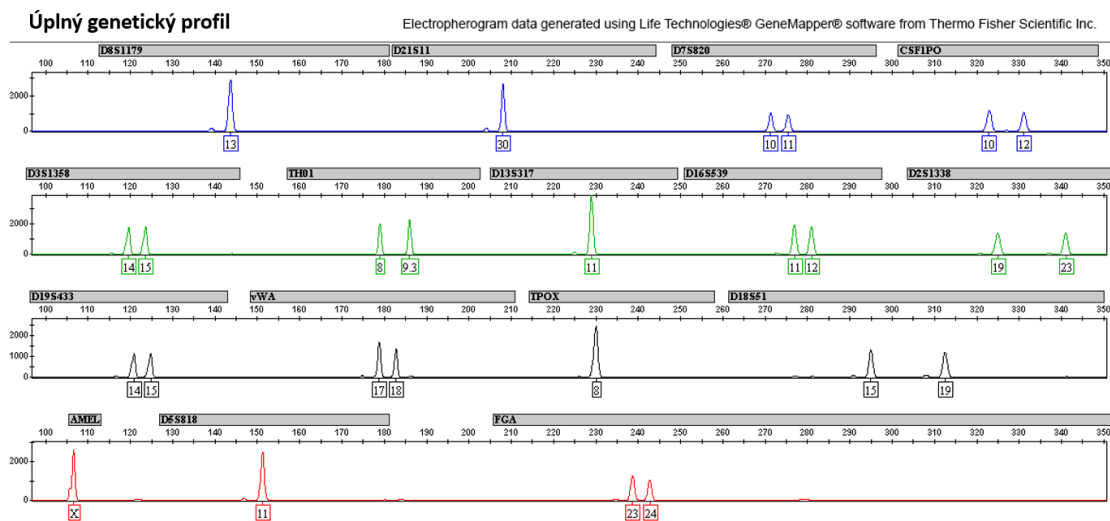
Výsledkem fragmentační analýzy je genetický profil (graf či tabulka). Zde jsou znázorněny jednotlivé píky. Každý pík označuje daný STR polymorfismus a je mu přiřazeno charakteristické číslo. V takovém profilu lze nalézt 17 různých STR polymorfismů – to je současně minimální počet polymorfismů pro vložení do databáze DNA profilů. Tento profil je pro jednoho člověka zcela jedinečný a stejný po celý život. Výjimkou, kdy mají dva lidé stejný profil, je samozřejmě případ jednovaječných dvojčat. Jinak je zcela nemožné najít dva jedince se stejným profilem. Genetický profil zobrazuje genetický materiál přítomný v každém testovaném lokusu. Vertikální osa označuje množství DNA detekované na tom lokusu. V úplném profilu nalezneme v každém lokusu jeden nebo dva píky - jeden od matky a druhý od otce. V případě, že lokus obsahuje pouze jeden pík, znamená to, že tato osoba zdědila od obou rodičů stejný marker. Naopak v případě, že se v jednom lokusu objeví dva píky, zdědila osoba od rodičů rozdílné markery. Jako příklad můžeme uvést jedince, který na stejném lokusu zdědil od matky 7krát opakující se segment a od otce 11krát opakující se segment. V genetickém profilu tedy bude mít tento lokus znázorněné dva píky - jeden pro 7 opakování a jeden pro 11 opakování. [36]





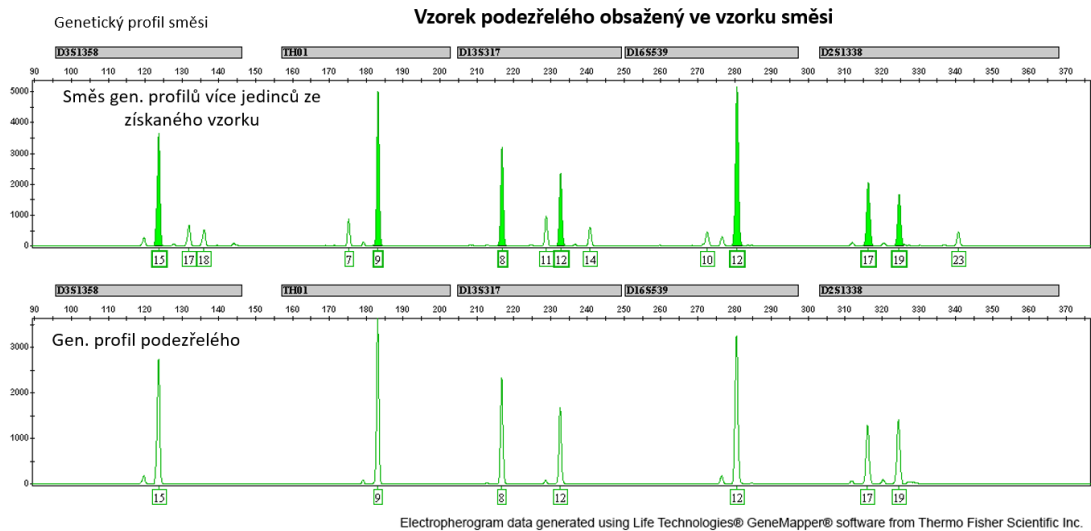
Obr. č. 20: Genetický profil s popisky vytvořený OKTE v Hradci Králové (vlastní tvorba)

**Profil** může vyjít buď **pro jednotlivce**, který je znázorněný níže (Obr. č. 21). Na tomto profilu nalezneme lokusy s jedním píkem (např. modré píky v prvních dvou lokusech prvního řádku - D8S1179 a D21S11) i lokusy se dvěma píky (např. modré píky v posledních dvou lokusech prvního řádku - D7S828 a CSF1PO). [36]



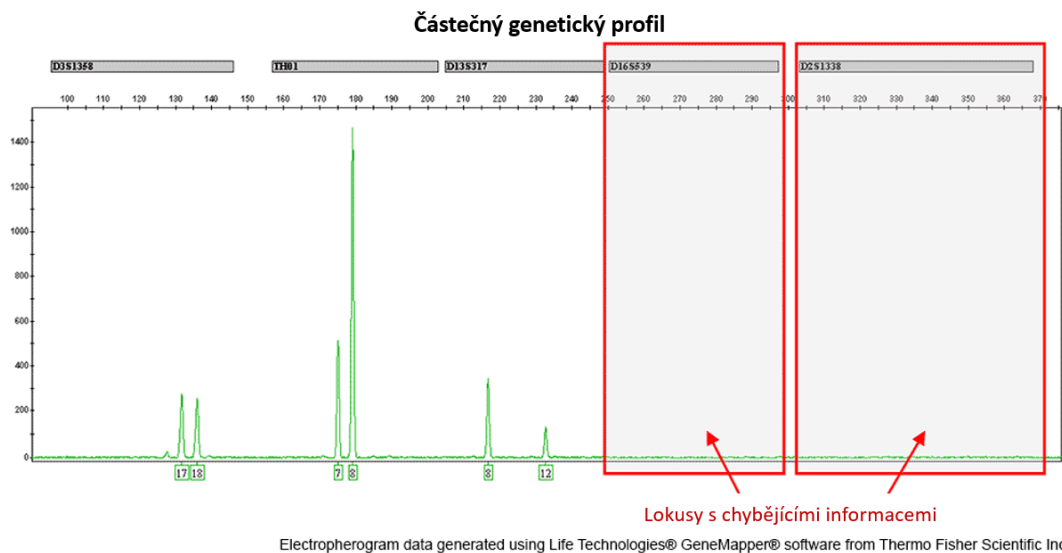
Obr. č. 21: Jednoduchý genetický profil (převzato a upraveno z: <http://www.forensicsciencesimplified.org/dna/how.html>)

V praxi se často jedná o **směs DNA od více než jednoho dárce**. Takové směsi mohou být složité k analýze i interpretaci. V takovém případě je každý marker ze směsi zahrnut do profilu směsi získaného profilu. Genetický profil směsi níže (Obr. č. 22). [36]



Obr. č. 22: Genetický profil směsi (převzato a upraveno z: <http://www.forensicsciencesimplified.org/dna/how.html>)

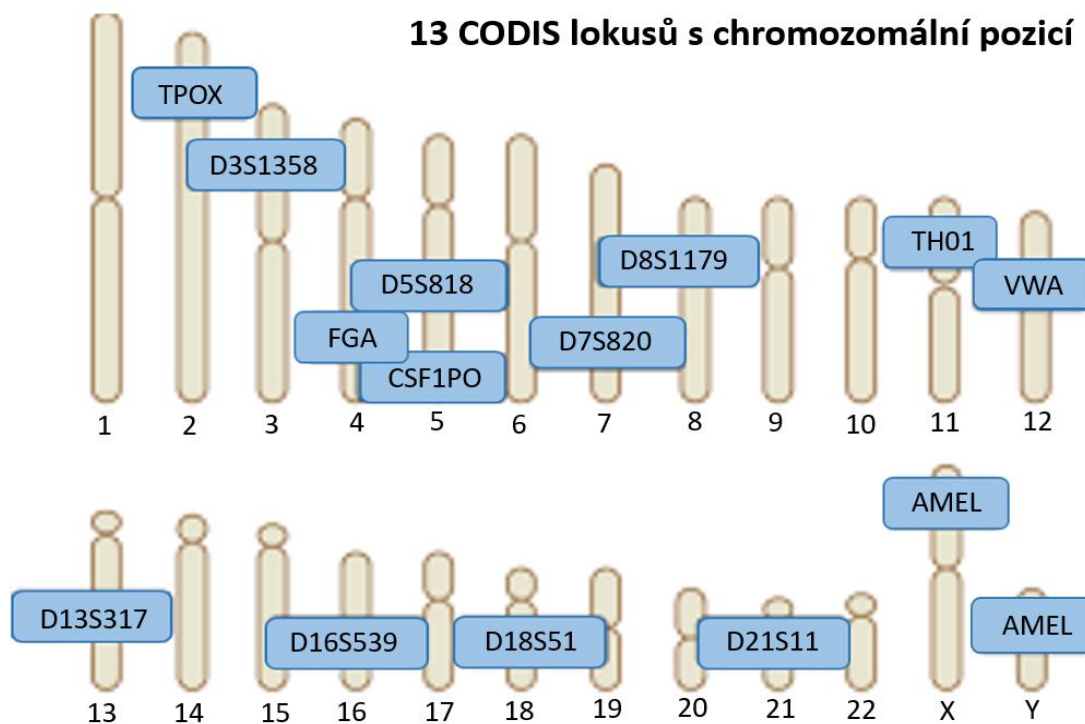
**Profil** může být také **částečný**. Takový profil postrádá alelu v nějakém lokusu. Částečné profily vznikají například z degradovaných vzorků. Takový profil může vzniknout i v případě, že každý lokus sice obsahuje pík, ale daný pík nedosáhl na předem stanovenou hodnotu. Každý pík musí tedy překročit určitý stanovený limit, aby s ním mohlo být dále pracováno. [36]



Obr. č. 23: Částečný genetický profil (převzato a upraveno z: <http://www.forensicsciencesimplified.org/dna/how.html>)

## 5 Databáze DNA profilů

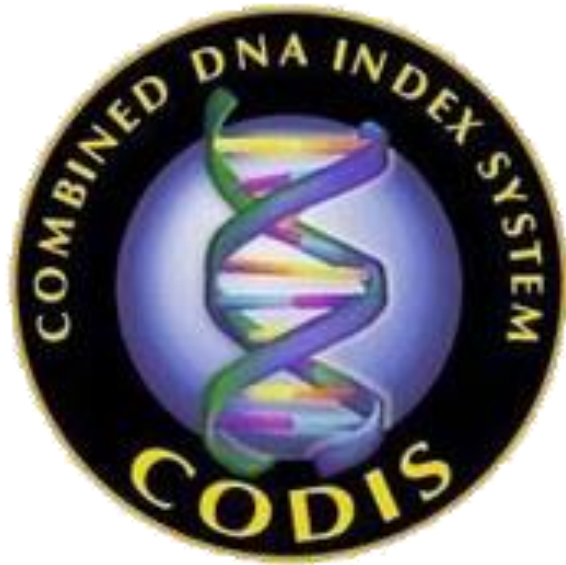
Databáze DNA profilů se stala velmi efektivním pomůckou při vyšetřování kriminálních činů. Většina zločinců své činy často opakují a pomocí této databáze mohou být rychleji dopadeni. Bylo totiž zjištěno, že až 60% vězňů opakují podobné zločiny nejpozději do 3 let [9]. Toto sdílení informací z celého státu nebo i mezi více státy zároveň pomáhá zachraňovat životy, objasňovat staré, nevyřešené případy nebo propojovat různé případy dohromady. Zločinci se často nezdržují na jednom stálém místě, ale putují po různých oblastech i státech. Dané mezinárodní databáze pak dokáží jednotlivé případy propojit a urychlit jejich polapení. Největším rozmachem tyto systémy procházely od konce 20. století [24]. Databáze DNA profilů jsou složité počítačové systémy, které obsahují jednotlivé složky s genetickými profily. Tento systém umí vyhledat shody mezi samostatnými profily, určit případnou shodu a tak identifikovat pachatele. DNA profily jsou zde uvedeny ve formě soupisu STR genotypů vzniklého genetickým profilováním DNA. Jednotlivé státy ale mohou používat odlišné markery, které následně přináší lehce odlišné verze a profily tedy nemohou být vzájemně posuzovány. Aby se předešlo takovým nekompatibilním výsledkům, bylo 13. - 14. listopadu roku 1997 stanoveno 13 základních STR lokusů, které se využívaly v organizaci CODIS - mezinárodní databázi DNA profilů. Od roku 2017 je systém CODIS rozšířen na celkový počet 20 možných STR lokusů [2, 37].



Obr. č. 24: 13 standardizovaných lokusů znázorněných na chromozomech (převzato a upraveno z: <https://strbase.nist.gov/fbicare.htm>)

## 5.1 Systém CODIS (Combined DNA Index System)

Tento systém zajišťuje vzájemné propojení počítačových databází DNA profilů mnoha laboratoří. Systém má tři úrovně – místní (LDIS), státní (SDIS) a mezinárodní (NDIS). Jednotlivé laboratoře využívají totožný systém, který je nastaven na rozdílné pravomoci k přístupu do zmíněných tří typů úrovní. CODIS systém byl založen ve Spojených státech amerických roku 1998 odborníky z FBI. Jedná se o téměř celosvětový systém, do kterého byla například roku 2001 zapojena i Česká republika. Je důležité podotknout, že systém CODIS využívaný přidávanými státy, pracuje jen se svou vlastní databází a není tak propojen s jakoukoliv úrovní databáze USA. Tento systém rozlišuje dané genetické profily do dvou tříd. První třídou jsou forenzní profily, které byly získány ze vzorků z místa činu. Druhou třídou tvoří profily obžalovaných, které pochází od odsouzených osob. Databáze v žádném případě neobsahuje jakékoliv osobní informace majitelů profilů. Poskytuje pouze záznamy potřebné k určení shody profilů [23, 24]. Najdeme zde tedy pouze DNA profil, identifikaci laboratoře vydávající daný profil, identifikační číslo vzorku a personál, který vzorek zpracoval a je tak za něj zodpovědný [2].



Obr. č. 25: Znak systému CODIS (převzato z:  
<https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis>)

## 5.2 Národní databáze České republiky

Národní databáze ČR vznikla roku 2002, kdy došlo k otevření první genetické laboratoře Kriminologického ústavu Praha provozované systémem CODIS. Nalezneme zde například profily získané od osob dříve stíhaných či odsouzených za závažné trestné činy, obžalovaných z trestného činu, nalezených nezletilých, nebo profily částí těl osob neznámé totožnosti. V roce 2016 bylo pomocí databáze nalezeno celkem 1 143 shod. Ke dni 20. 5. 2018 bylo v tomto systému uloženo 245 392 profilů DNA. [29]

## **6 Genetické profilování prováděné Odborem kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové**

### **6.1 Odbor kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové**

Tento odbor poskytuje odborná vyjádření a znalecké posudky k objasňování trestné činnosti na území Královéhradeckého a Pardubického kraje [38]. Hlavní účel tohoto oddělení spočívá ve zpracování a vyhodnocení předložených materiálních důkazů pro další orgány uplatňující se v trestním řízení. OKTE v Hradci Králové se stal 1. března 2007 úplně prvním policejním akreditovaným znaleckým pracovištěm na území České republiky a zůstává zařazené mezi nejprestižnějšími laboratořemi v České republice. Akreditaci tomuto odboru udělil Český institut pro akreditaci, o.p.s. Roku 2008 laboratoř úspěšně obhájila a následně doakreditovala i metodu, při které lze identifikovat pachatele pomocí metody DNA profilování [33]. Královéhradecká laboratoř OKTE provádí různé expertizy jako je například analýza dat a zkoumání nosičů dat, balistika, forenzní biologie, daktyloskopie, defektoskopie, elektrotechnika, chemie, mechanoskopie, metalografie, trasologie, technické zkoumání dokladů či písemností a zkoumání ručního písma [27, 38].





Obr. č. 26: Budova OKTE v Hradci Králové (vlastní tvorba)

Aby mohla laboratoř plnit své povinnosti, musí být akreditována. Akreditace musí být v souladu s podmínkami uznanými v rámci Evropské unie. Akreditované laboratoře by tedy měly vykazovat trvale vysoký standart práce, splňovat dané normy a zaměstnávat kvalifikované pracovníky. Daná akreditace platí po dobu tří let a po uplynutí této doby musí být proveden reaudit. Při splnění reauditů získává laboratoř akreditaci na dalších 5 let. V průběhu času jsou tato pracoviště pravidelně externě auditována, a pokud kontrola odhalí nedostatečné plnění daných norem, akreditaci laboratoři odebere. [33]

Jak bylo zmíněno ve druhé kapitole, každý jednotlivý OKTE má vlastní standartní operační postupy (SOP). Následující kapitola je tedy věnována výhradně OKTE v Hradci Králové a nemusí se shodovat s operačními postupy ve zbývajících institucích. Uvedené postupy byly konzultovány se zdejšími odbornými pracovníky. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

I přes to, že lze analyzovat DNA jadernou i mimojadernou (mitochondriální), dále popsané procesy se vztahují pouze k jaderné DNA. Testy mitochondriální DNA tvoří spíše doplňkové vyšetření. Analyzuje se pouze při potvrzení identity mrtvých částí těl nebo při



určení maternity (testy mateřství) – mitochondriální DNA se totiž dědí jen z matky na potomky [35, 36]. Tuto mimojadernou DNA běžně testuje jen Kriminalistický ústav, neboť ostatní laboratoře by tyto testy prováděly velmi sporadicky, nakoupené kity by tak překročily lhůtu trvanlivosti a musely by se zlikvidovat. Proto se na analýzy této DNA odesílají vzorky z laboratoří po celé ČR a Kriminalistický ústav je poté provede najednou. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

## **6.2 Odběr stop z místa činu a srovnávacích stop**

Odběr stop z místa činu provádí výjezdový technik. Narušení integrity těla, tedy odebírání biologických tkání - již musí provést soudní lékař. Nalezené stopy musí být následně separovaně uloženy do zapečetěných obalů a jednoznačně popsány. Je nutné uvést identifikační číslo stopy, čas, místo a důvod odběru. Pro správný odběr srovnávacího vzorku potřebují technici soupravu na odběr materiálu, která zahrnuje skládací krabičku a 2 vatové tyčinky. Tyčinkami se provádí stěr z bukální sliznice tím způsobem, že se koncem s vatičkou několikrát přejede po vnitřní straně tváře směrem nahoru a dolů. Tato technika stěru z bukální sliznice umožňuje rychlý a bezbolestný způsob získání vzorku. Následně se použité vzorky umístí do složené krabičky a přelepí 3 nálepkami se vzorem OKTE. Každá taková krabička má předtištěné své identifikační číslo, pod kterým bude vedena v elektronickém systému. Dále zde musí být uvedené informace o tom, kdo odběr prováděl, kdy, komu, jaké jednacím číslem danému odběru patří. Nakonec se musí podepsat odebíraný jedinec i odebírající pracovník. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

## **6.3 Příjem stop**

Laboratoř OKTE vyřizuje žádosti o odborném vyjádření v oboru kriminalistiky a genetiky pro Královehradecký a Pardubický kraj. Žádosti mohou přicházet například od okresu, generálních inspekcí, celních správ a dalších institucí. Takovou žádost o odborný posudek přijímá laboratoř OKTE HK v zapečetěném boxu s označením „PGENE poptávky“. Box obsahuje samotnou žádost, stopy zajištěné z místa činu a také stopy srovnávací. Srovnávací stopy mohou být v podobě stěrů z bukální sliznice, částí tkání nebo krevního vzorku. Menší stopy bývají připnuté rovnou k žádosti, ale objemnější stopy musí být v boxu uloženy samostatně v řádně popsaných pytlích. Součástí bývají také některé informace o případu. Je zde například uvedeno o jaký případ se jedná (vloupání, krádež, vražda, znásilnění), kdy se situace odehrála, kdo je poškozený, obviněný nebo domácí

osoba. V některých případech může laborant požádat o více informací o průběhu skutku, které mu mohou napovědět, na jaké části se více zaměřit při hledání vzorku. Již při příjmu je vzorku přiřazeno genetické číslo. To se stává kódem, kterým již bude označován po celou dobu práce. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

## **6.4 Vzorkování**

Vzorkování nastává v případě, když nejsou stopy ve formě stěru. Stěry jsou už v tento moment připraveny k izolaci a vzorkování se tedy neprovádí (v každém případě dochází k izolaci vzorku vždy až v laboratorních podmínkách). Izolací rozumíme proces získávání buněčného materiálu z povrchu nějakého předmětu. V laboratoři OKTE v Hradci Králové nalezneme dvě místnosti zvané „Ohledovny“. Ohledovna č. 1 je menší místnost, která se využívá na práci s drobnějšími předměty. Ohledovna č. 2 je prostornější a slouží ke zkoumání objemnějších předmětů. Obě místnosti je vždy potřeba po skončení práce řádně vysterilizovat, aby byly připraveny pro následující práci v nekontaminovaném prostředí. Ve větší Ohledovně č. 2 najdeme i UV zářivky, které napomáhají udržet celý prostor sterilní. U větších stop totiž hrozí vyšší riziko kontaminace. O čistotu a sterilitu prostředí i nástrojů se starají samotní pracovníci laboratoře. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

Na samém začátku práce se provádí orientační testy. Daný předmět se musí detailně zdokumentovat, vyfotografovat, popsat vzhled atd. Jsou zde k dispozici také mikroskopy, které se využívají při pozorování biologických materiálů, jako jsou například vlasy nebo sperma. Pracuje se zde s chirurgickými nástroji (např. pinzeta, jehla, nůžky), které musí být také po skončení práce důkladně sterilizovány. V případě, že není stopa spotřebována celá a nemá charakter stěru (stěr se vždy spotřebuje celý), může se dále skladovat. Zbytek stopy je potřeba správně zabalit a uložit do speciální skříně. Tady stopy zůstávají do doby, než je vyhotoveno odborné vyjádření. V případě nepovedené analýzy může být stopa opět využita. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]



Obr. č. 27: Vybavení Ohledovny č. 2 (vlastní tvorba)

## 6.5 Míchání vzorků

Míchání vzorků probíhá v „Mokré laboratoři“. Dříve se zde připravovaly roztoky potřebné k různým metodám využívaným při genetickém profilování DNA. V dnešní době se využívají komerčně vyráběné kity a tím se míchání vzorků zredukovalo na minimum. Provádí se zde ale například přípravy na Chelexové metody kvantifikace. Z chelexových jednotek je potřeba nejprve připravit roztok – nejčastěji 5%, 10% nebo 20%. Připravený

koncentrát se následně autoklávuje (proces sterilizace), aby se mohl bezpečně využívat. Zde se také sterilizují použité nástroje. Po ukončení práce se nástroje musí omýt v destilované vodě speciální látkou utvořenou ke sterilizaci nástrojů. Omyté nástroje se zatavují vždy po jednom do fólie a poté se suší v sušárně nebo se autoklávuje. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

## **6.6 Izolace srovnávacích vzorků**

Dalším krokem je izolace tzv. srovnávacích vzorků pocházejících od osob, u kterých chceme dokázat, zda jsou totožné se vzorkem dané stopy. Aby bylo následné srovnání vzorků věrohodné, musí se se stopami z místa činu a srovnávacími stopami pracovat již od začátku odděleně, aby se předešlo případné kontaminaci. Práce se srovnávacími vzorky bývá snadnější, protože je obvykle k dispozici dostatek materiálu. V dnešní době se nejvíce využívají komerčně vyráběné izolační kity. Kity obecně jsou soupravy chemických látek využívaných v různých reakcích. V průběhu genetického profilování se setkáme s kity izolačními (uplatňují se v izolaci DNA), amplifikačními (uplatňují se v PCR) a kvantifikačními (uplatňují se při kvantifikaci DNA). (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

Laboratoř OKTE v Hradci Králové využívá komerčně vyráběné izolační kity od 3 společností:

1. Qiagen
2. Promega
3. NucleoSpin

Izolace vzorku stopy z místa činu probíhá stejným postupem, jen odděleně od srovnávacího vzorku, aby nedošlo ke kontaminaci. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]

## **6.7 Kvantifikace DNA**

Stanovení množství získané DNA probíhá metodou Real-time PCR. Všechny ostatní metody jsou příliš zastaralé. Celý proces se provádí v laminárních boxech, aby se zabránilo kontaminaci. I zde probíhají reakce s pomocí komerčně vyráběných kitů. OKTE v Hradci Králové momentálně využívá pouze 1 druh kvantifikačních kitů a to od

společnosti Applied Biosystems. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]



Obr. č. 28: Laminární box - Biohazard box, model Airstream, třída II – ESCO (vlastní tvorba)

## **6.8 Amplifikace DNA pomocí Polymerázové řetězové reakce**

Při amplifikaci dochází k namnožení DNA. Práce opět probíhá v laminárních boxech kvůli zamezení kontaminace. Využívají se tzv. termocykléry, což jsou přístroje, které podle

stanoveného programu rychle mění teplotu a tím zajišťují jednotlivé kroky metody PCR. Zde se opět využívají komerčně vyráběné kity, tzv. amplifikační kity. OKTE v Hradci Králové využívá amplifikační kity od 3 společností:

1. Qiagen

2. Promega

3. Thermo Fisher Scientific (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019].

## **6.9 Fragmentační analýza**

Po amplifikaci DNA následuje finální proces – fragmentační analýza. Zde se využívá přístroj zvaný sekvenátor, konkrétně 8-kapilárový sekvenátor typu Eplide 3500. Výsledkem fragmentační analýzy může být buď tabulkové nebo grafické znázornění STR polymorfismů - v OKTE v HK se využívají pouze grafické. Získané grafy jednotlivých - již anonymních - genetických profilů bývají barevně rozlišené a znázorňují 17 stanovených STR polymorfismů. Jeden polymorfismus zde označuje pohlaví (X žena a Y muž), ostatní polymorfismy již ale žádnou výpovědní hodnotu o fenologii člověka (např. barva očí) nemají. Aby mohl být genetický profil vložen do databáze DNA profilů, musí zahrnovat minimálně 17specifických STR lokusů. Genetické profily vytvořené laboratoří OKTE v Hradci Králové tedy tento limit splňují a jsou součástí databáze CODIS. (ústní sdělení) [Odborní pracovníci] [OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810 ] [23. 1. 2019]



Obr. č. 29: Sekvenátor Eplide 3500 (vlastní tvorba)

## Závěr

Téma bakalářské práce „Genetické profilování a jeho využití Odborem kriminalistické techniky a expertiz v Hradci Králové“ jsem si vybrala, protože mě toto téma osobně zajímalo a pokusila jsem se ho zjednodušit případným dalším zájemcům. V současné době je genetické profilování využíváno v různých modifikacích po celém světě a napomáhá objasňování nespočtu kriminálních případů- a to jak současných, tak i starých neobjasněných. I tak je ale veřejnost stále klamána prostřednictvím nejrůznějších kriminalistických seriálů a vytváří tak nereálné představy o celém procesu identifikace osob pomocí DNA. Proto jsem ráda osvětlila základní pravidla a principy tohoto mocného nástroje kriminalistů, jelikož dostatek DNA se dá snadno získat i z pár buněk a většinou není problém určitý vzorek na místě činu nalézt. Práce detailně popisuje manipulaci s takovým biologickým materiálem od místa činu až po samotnou forenzní laboratoř. Hlavním záměrem bylo seznámení s pravidly zacházení s kriminalistickou stopou, jejím dalším zpracováním v laboratoři a závěrečné interpretace získaných výsledků. Veškeré metody jsem zpracovávala podle odborných publikací, které mi doporučili pracovníci OKTE v HK a odborných článků publikovaných na vědeckém portálu PubMed. Správnost informací jsem si ověřila při konzultacích s odborníky z OKTE v Hradci Králové.

Doufám, že se mi podařilo vytvořit srozumitelný pohled na genetické profilování a případně podpořit další zájemce o šíření reálného pohledu na celou metodu.



## Literatura

- [1] BAIZOVÁ, P. *Modul Kriminalistika*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. 59 s. ISBN 978-80-244-4180-1.
- [2] BUTLER, J. M. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Boston: Academic Press, 2010. 500 s. ISBN 978-0-12-374999-4.
- [3] MARKOŠ, A. *Molekulární a buněčná biologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. 138 s.
- [4] MAZURA, I. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum, 1999. 101 s. ISBN 80-246-0258-x.
- [5] MUSIL, J. *Úvod do kriminalistiky*. 2. vydání. Praha: Policejní akademie České republiky, 1995. 129 s. ISBN 80-85981-00-9.
- [6] PORADA, V. *Kriminalistika*. 1. Vydání. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, 1995. 98 s. ISBN 80-7076-451-2.
- [7] PORADA, V. *Kriminalistika: (teorie, metody, metodologie)*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2014. 459 s. ISBN 978-80-7380-490-9.
- [8] PORADA, V., STRAUS, J. *Kriminalistické stopy: teorie, metodologie, praxe*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2012. 506 s. ISBN 978-80-7380-396-4.
- [9] RUDIN, N., INMAN, K. *An introduction to forensic DNA analysis*. 2. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2001. 312 s. ISBN 978-08-4930-233-6.
- [10] SLÁDEK, Z. *Buněčná biologie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 106 s. ISBN 978-80-7375-086-2.
- [11] SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. *Genetika*. 2. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2017. 844 s. ISBN 978-80-210-8613-5.
- [12] STRAUS, J. *Úvod do kriminalistiky*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2004. 175 s. ISBN 80-86473-82-1.

- [13] STRAUS, J., PORADA, V. *Teorie, metody a metodologie kriminalistiky*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2017. 417 s. ISBN 978-80-7380-666-8.
- [14] SUCHÁNEK, J. *Kriminalistika – kriminalistickotechnické metody a prostředky*. Praha: Policejní akademie České republiky, 1996. 347 s. ISBN 80-85981-21-1.
- [15] ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [16] VYMĚTALOVÁ, V. *Biologie pro biomedicínské inženýrství*. 2. vydání. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2016. 105 s. ISBN 978-80-01-05884-8.
- [17] VANĚK, D. Genetika jako identifikační nástroj ve službách kriminalistiky. *Živa*. Praha: Nakladatelství Academia. 2011, **2**, 56 – 57. ISSN 0044-4812.
- [18] ZVÁROVÁ, J., MAZURA, I. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2012. 343 s. ISBN 978-80-246-2150-0.

Odborní zaměstnanci OKTE v Hradci Králové - ústní sdělení (OKTE, Ulrichovo náměstí č. p. 810, Hradec Králové) dne 23. ledna 2019

## Elektronické zdroje

[19] ALAMA, A., LONKISZ, A., TOKARSKI, M., MALODOBRA-MAZUR, M., LEBIODA, A., KOWALCZYK, E., BODOSZ, T. *Preliminary analysis of polymorphism of STR markers in the population of domestic cats (*Felis catus*) in Lower Silesia* [online]. Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 2018 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30509022>

[20] BELL, S., SAH, S., ALBRIGHT, T. D., GATES, S. J., DENTON, M. B., CASADEVALL, A. *A call for more science in forensic science* [online]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29650539>

[21] COLE, S. A. *Suspect Identities: A History of Fingerprinting and Criminal Identification* [online]. Cambridge: Harvard University Press, 2002 [cit. 18. 4. 2019]. ISBN 0-674-01002-7. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=3CYqtVk6oI8C&oi=fnd&pg=PP8&ots=M1l1XYMITo&sig=u-nBgR6jyoRM\\_tFEtj1uhGtc5bl&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=3CYqtVk6oI8C&oi=fnd&pg=PP8&ots=M1l1XYMITo&sig=u-nBgR6jyoRM_tFEtj1uhGtc5bl&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

[22] *Český institut pro akreditaci* [online]. © 2019 [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: [https://www.cai.cz/?page\\_id=4499](https://www.cai.cz/?page_id=4499)

[23] *Frequently Asked Questions on CODIS and NDIS* [online]. U.S. Department of Justice [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.fbi.gov/services/laboratory/biometric-analysis/codis/codis-and-ndis-fact-sheet>

[24] GILL, P., FEREDAY, L., MORLING, N., SCHNEIDER, P. M. *The evolution of DNA databases--recommendations for new European STR loci* [online]. Forensic Science Service, 2006 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002250/>

[25] HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. *Real time quantitative PCR* [online]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8908518>

- [26] KISTLER, L., JOHNSON, M. J., IRWIN, M. T., LOUIS, E. E., RATAN, A., PERRY, G. H. *A massively parallel strategy for STR marker development, capture, and genotyping* [online]. Oxford University Press, 2017 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28666376>
- [27] *Kriminalistická technika* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/kriminalisticka-technika.aspx>
- [28] LORENZ, T. C. *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies* [online]. Journal of Visualized Experiments, 2012 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664923>
- [29] *Národní databáze DNA* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/narodni-databaze-dna.aspx>
- [30] *Odbor analytiky* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/odbor-analytiky.aspx>
- [31] *Odbor kriminalistické techniky a expertiz* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/odbor-kriminalisticke-techniky-a-expertiz-741862.aspx>
- [32] *Odbor technické ochrany* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/sluzby-odbory-skupiny-odbor-technicke-ochrany.aspx>
- [33] *OKTE – historicky první policejní akreditované znalecké pracoviště v ČR* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/okte-historicky-prvni-policejni-akreditovane-znalecke-pracoviste-v-cr.aspx>
- [34] *Operační odbor Policejního prezidia České republiky* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/npp-pro-vnejsi-sluzbu-operacni-odbor-operacni-odbor-policejniho-prezidia-ceske-republiky.as>
- [35] PRIMORAC, D., SCHANFIELD, M. S. *Application of forensic DNA testing in the legal system* [online]. Verona, 2000 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10810166>

[36] RAFFERTY, A., DAÉID, N. N. *Forensic DNA analysis A PRIMER FOR COURTS* [online]. London: The Royal Society, 2017 [cit. 18. 4. 2019]. ISBN 978-1-78252-301-7. Dostupné z: <https://royalsociety.org/-/media/about-us/programmes/science-and-law/royal-society-forensic-dna-analysis-primer-for-courts.pdf>

[37] ROEWER, L. *DNA fingerprinting in forensics: past, present, future* [online]. Investigative Genetics, 2013 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24245688>

[38] *Služba kriminální policie a vyšetřování* [online]. © 2019 Policie ČR [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.policie.cz/clanek/o-nas-clanky-sluzba-kriminalni-policie-a-vysetrovani.aspx>

[39] SOCHIVKO, D. G., FEDOROV, A. A., ALEKSEEV, Y. I., KUROCHKIN, V. E., DUBINA, M. V. *Mathematical model of polymerase chain reaction with temperature-dependent parameters* [online]. Doklady Akademii Nauk, 2017 [cit. 14. 5. 2019]. ISSN: 1607-6729. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28421451>

[40] TRAVERS, A., MUSKHELISHVILI, G. *DNA structure and function* [online]. FEBS Journal, 2015 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25903461>

[41] ZAHRA, A., HUSSAIN, B., JAMIL, A., AHMED, Z., MAHBOOB, S. *Forensic STR profiling based smart barcode, a highly efficient and cost effective human identification system* [online]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018 [cit. 14. 5. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30591790>

## Seznam zkratek

**OKTE** – Odbor kriminalistické techniky a expertiz

**SKVP** - Služby kriminální policie a vyšetřování

**SOP** - standardní operační postupy

**DNA** – kyselina 2-deoxy-D-ribonukleová

**STRP** - Polymorfismus krátkých tandemových repetit (Short Tandem Repeat Polymorphism)

**PCR** - Polymerázové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction)

**Taq DNA-polymeráza** - polymeráza izolovaná z bakterie *Thermusaquaticus*

**VNTRs** - opakující se fragmenty DNA (variable number tandem repeat)

**Hae III** - pocházející z *Haemophilus aegyptius*

**SDS** - dodecylsírán sodný

**DTT** - dithiothreitol

**RFLP** - Polymorfismus délky restričních fragment (Restriction Fragment Length Polymorphism)

**CODIS** – databáze DNA profilů (Combined DNA Index System)