

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Trufan Kateryna

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

Kriminalistické techniky detekce biologických materiálů  
Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Forensic techniques for the detection of biological materials  
Bachelor thesis

2024

Trufan Kateryna

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateryna Trufan**  
Osobní číslo: **C21337**  
Studijní program: **B0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Kriminalistické techniky detekce biologických materiálů**  
Téma práce anglicky: **Forensic Analysis of Biological Fluids**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma kriminalistické techniky detekce biologického materiálu.
2. Definujte téma z hlediska významu oboru biochemie v kriminalistice. Zaměřte se na strukturu ohledu metod ve způsobu řešení zločinu, metodologii. Porovnejte metody včetně jejich kladů a záporů a navrhněte možnosti zlepšení a urychlení detekce biologického materiálu ve vzorku.
3. Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martina Špryncová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

**Prohlašuji:**

Práci s názvem „*Kriminalistické techniky detekce biologických materiálů*“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne

Trufan Kateryna, v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat vedoucí Ing. Martině Špryncové, Ph.D. za možnosti konzultace, věnovaný čas, kontrolu a pomoc, a taky všem nejbližším, kdo mě podporoval během psaní této práce.

## **ANOTACE**

Tato práce popisuje důležité aspekty forenzní vědy – detekci a analýzu poskytnutých a odebraných materiálů pomocí presumptivních a/nebo přesnějších technik k identifikaci a zpracování hmotných důkazů. Práce zkoumá, jaké materiály lze použít, jak lze určit jejich biologický původ a jaké techniky se používají k jejich identifikaci a dalšímu zpracování. Cílem práce bylo porovnání současných metod, včetně výhod a nevýhod, a navrhnout zlepšení a zdokonalení stávajících technik.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Presumptivní testy, potvrzující testy, DNA-profiling, databáze

## **TITLE**

Forensic techniques for the detection of biological materials

## **ANNOTATION**

This thesis describes important aspects of forensic science – the detection and analysis of provided and collected materials using presumptive and/or more precise techniques to identify and process physical evidence. The thesis examines what materials can be used, how their biological origin can be determined, and what techniques are used to identify and further process them. The aim of the thesis was to identify the advantages and disadvantages of these methods and how to improve and refine existing techniques.

## **KEYWORDS**

Presumptive tests, confirmatory tests, DNA-profiling, database

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	12
TERMINOLOGIE .....	14
ÚVOD.....	15
1 IDENTIFIKACE BIOLOGICKÝCH TEKUTIN .....	16
1.1 Metody analýzy materiálů .....	16
1.1.1 Krev .....	16
1.1.1.1 Presumptivní testy.....	16
1.1.1.2 Potvrzující testy .....	19
1.1.2 Sperma .....	20
1.1.2.1 Prezumptivní testy .....	20
1.1.2.2 Potvrzující testy .....	22
1.1.3 Slina .....	24
1.1.3.1 Prezumptivní testy .....	24
1.1.3.2 Potvrzující testy .....	25
1.2 Porovnání metod .....	26
1.2.1 Krev .....	26
1.2.2 Sperma .....	27
1.2.3 Slina .....	28
1.3 Možnosti zlepšení současných technik .....	28
2 DNA-FINGERPRINTING .....	30
2.1 Odběr vzorku a izolace materiálů .....	30
2.2 Markery.....	31
2.2.1 Jednonukleotidový polymorfismus.....	31
2.2.2 Krátké tandemové opakování .....	31

2.2.3 Variabilní počet tandemových opakování .....	31
2.2.4 Mikro haplotypy .....	32
2.2.5 Transpozibilní elementy .....	32
2.3 Metody analýzy materiálů .....	32
2.2.1 Southern blotting.....	32
2.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	33
2.2.3 Sekvenování.....	37
2.4 Porovnání.....	44
2.4.1 Metody.....	44
2.5 Možnosti zlepšení současných technik.....	46
3 DNA DATABÁZE .....	47
3.1 Metody identifikace .....	47
3.1.1 Analýza DNA v rodině .....	47
3.1.2 Krátké tandemové opakování Y-chromozomu.....	48
3.1.3 Genetická genealogie.....	48
3.2 Komplikace při detekci.....	48
ZÁVĚR .....	50
POUŽITÁ LITERATURA .....	51

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schema reakce luminolu s peroxidem vodíku za vzniku chemiluminescence [2] ..	18
Obrázek 2 ABACard (pozitivní a negativní výsledky) [15] .....	21
Obrázek 3 Struktura spermie a zbarvení jednotlivých oddílů [22] .....	23
Obrázek 4 Test RSID™-Semen [23] .....	24
Obrázek 5 Test RSID™-Saliva [27] .....	25
Obrázek 6 Schéma polymerázové řetězcové reakce [32] .....	34
Obrázek 7 Porovnání analýzy tradiční PCR (A), qPCR (B) a rapid DNA (C) [53] .....	35
Obrázek 8 Amplifikační křivka PCR [55] .....	36
Obrázek 9 Schéma Sangerova sekvenování [59] .....	38
Obrázek 10 Schéma sekvenování pomocí metody Illumina [59] .....	41
Tabulka 1 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace krve .....	26
Tabulka 2 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace spermy .....	27
Tabulka 3 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace sliny .....	28
Tabulka 4 Porovnání metod typizace DNA .....	44

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AFLP	polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (z angl. amplified fragment length polymorphism)
AP	kyselá fosfatasa
CCS	konsenzuální kruhové sekvenování (z angl. consensus circular sequencing)
cDNA	klonální DNA (z angl. copy DNA)
CLR	kontinuální sekvenování dlouhých čtení (z angl. continuous long read sequencing)
CODIS	kombinovaný DNA indexový systém (z angl. Combined DNA Index System)
ddNTP	dideoxyribonukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
HIFI	vysoce přesné dlouhé sekvenační čtení (z angl. highly accurate long sequencing reads)
IGG	výzkumná genetická genealogie (z angl. investigative genetic genealogy)
KM-test	Kastlého-Meyerův test
LDIS	lokální DNA indexový systém (z angl. Local DNA Index System)
LMG-test	leucomalachite-green test
NDIS	národní DNA indexový systém (z angl. National DNA Index System)
NGS	sekvenování nové generace (z angl. next generation sequencing)
ONT	Oxford nanopore sekvenování
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PSA	prostatický specifický antigen
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative real-time polymerase chain reaction)

RE	restrikční endonukleasa
RFLP	polymorfismus délek restrikčních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
SDS	dodecylsírán sodný
SINEs	krátké proložené elementy (z angl. short interspersed elements)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (z angl. Single nucleotide polymorphism)
STR	krátké tandemové opakování (z angl. short tandem repeats)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan
uwCL	ultra slabá chemiluminiscence
VNTR	variabilní počet tandemových opakování (z angl. variable number tandem repeats)
ZMW	vlnovod s nulovým módem (z angl. Zero-Mode Waveguides)
$\alpha$ HL	stafylokokový $\alpha$ -hemolyzin

## **TERMINOLOGIE**

Amplifikace – zvýšení počtu určitých fragmentů DNA pomocí PCR nebo molekulárního klonování.

Amplikony – produkty PCR, které byly syntetizovány během amplifikace templátové DNA.

cDNA (z angl. copy DNA) – DNA, syntetizovaná ze specifické mRNA pomocí enzymu reverzní transkriptáza.

Efekt vysoké dávky (z angl. High Dose Hook Effect) – popisuje chybné naměření nízké koncentrace analytů, které jsou ve vzorku přítomny ve velmi vysoké koncentraci. Pokud je koncentrace analytu příliš vysoká, jsou všechna vazebná místa pro protilátky plně obsazena. Další molekuly analytu nelze měřit a tato skutečnost vede k nesprávně nízkým výsledkům.

Interkalace (do DNA) – vmezeření určité látky mezi obě vlákna DNA.

Sonda – uměle připravená oligonukleotidová sekvence, která se váže ke komplementární cílové části DNA.

## ÚVOD

Hlavními aspekty rozvoje vědy jsou zlepšení kvality lidského života, prodloužení délky života a účinnější léčba onemocnění. Často se však stává, že lidé trpí nejen nemocemi, ale také jednáním jiných lidí. V průběhu času se kriminologie a její principy vyvíjely tak, aby nám umožnily účinněji identifikovat osoby, které se podílejí na trestné činnosti – jak oběti, tak pachatele. Bez ohledu na to, jak přísný je trest, je v současné době hlavním odstrašujícím faktorem strach z dopadení. Proto je tak důležité pracovat na zdokonalování stávajících a vytváření nových technik.

V současné době existuje celá řada metod, které umožňují rychle vyřešit případy, zjistit příčiny, zabránit nespravedlivému odsouzení nebo zpomalení vyšetřování na mnoho let. Výzkum a srovnávání umožňují analyzovat stávající metody, zjistit jejich účinnost a identifikovat nedostatky s cílem zlepšit stávající metody nebo vyvinout nové. Biochemické metody a jejich vývoj pomohly vytvořit důkazní základnu, která je podložena dostatečným počtem testů a konzistentními výsledky.

Forenzní věda umožnila přejít od dlouholetého řešení případů k jejich rychlému vyřešení. Díky rozvoji metod a využívání biochemických postupů mohli lidé zlepšit svůj blahobyt a zajistit si bezpečnější život.

# 1 IDENTIFIKACE BIOLOGICKÝCH TEKUTIN

Klíčovým krokem při analýze místa činu je identifikace biologických tekutin. Zjištění původu zkoumaných materiálů ve forenzních vědách umožňuje další shromáždění biologických důkazů a zvýšení pravděpodobnosti genetické identifikace.

Testy pro identifikace biologických tekutin lze rozdělit na předběžné a potvrzující. Předběžný test ukazuje přítomnost tělní tekutiny na základě tvorby barvy nebo světla. Jeho výhodou je obvykle citlivost. Potvrzujícím testem lze ověřit přítomnost konkrétní sloučeniny. Jeho výhodou je vyšší specifita než u předběžných testů.

V této části se budu zabývat metodami používanými k analýze odebraných vzorků, výhodami a nevýhodami popsaných technik, porovnám je mezi sebou a zvážím, v čem mohou tyto techniky být vylepšeny za použití modernějších metod.

## 1.1 Metody analýzy materiálů

### 1.1.1 Krev

Krevní skvrny jsou obvykle poměrně snadno zjistitelné díky své charakteristické červenohnědé barvě, ale pokud se objeví na tmavém pozadí, jsou-li slabé nebo malé, může být obtížné je odhalit bez použití pečlivých vyšetřovacích technik a speciálního osvětlení.

Pro identifikaci krve bylo vyvinuto velké množství metod a protokolů, každý z nich má své výhody i nevýhody.

Princip většiny testů je založen na peroxidasové vlastnosti hemoglobinu. Tento typ detekce krve je docela rychlý a citlivý, ale takové testy jsou pouze orientační a mohou být náchylné k falešně pozitivním reakcím.

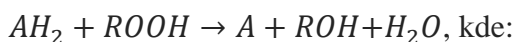
#### 1.1.1.1 Presumptivní testy

##### Katalytické testy

Katalytické testy jsou založeny na katalytické aktivitě hemoglobinu a některých jeho derivátů v přítomnosti peroxidu vodíku. Enzymy jsou definovány jako proteiny, které vykazují katalytické funkce, proto hemoglobin nemůže být zahrnut jako enzym. Nicméně hemoglobin je, stejně jako řada jeho derivátů, schopen chovat se jako enzym a projevovat katalytickou aktivitu v reakcích oxidace peroxidem organických látek za vzniku barevného produktu. Enzymy s touto vlastností se nazývají peroxidasy; když mluvíme o hemoglobinu – říká se tomu „peroxidasová aktivita“ [1].

Testy jsou pojmenované podle sloučeniny, která je oxidovaná (benzidine test, guaiacum test, fenolftalein test) nebo podle jména jeho objevitele (Adler's test, van Deen's test, Kastle-Meyer test) [2].

Zobecněná reakce vypadá takhle:



AH<sub>2</sub> – donor

ROOH – peroxid.

Příklady katalytických testů pro presumptivní analýzu krve:

### **Kastlého – Meyerův (KM)- test**

Jako indikátor se používá fenolftalein. Pozitivní výsledek analýzy pozorujeme při změně barvy substrátu na růžovou v důsledku spotřeby protonů v průběhu reakce, která má vliv na zvýšení pH roztoku [3, 4].

Analýzu krevních skvrn pomocí činidla KM lze provést dvěma způsoby:

„KM-rub“ – testovací činidlo se aplikuje na malé množství skvrny odstraněné na filtračním papíru třením. Ve většině případů stačí jen malé množství krve, protože test je na to dostatečně citlivý.

Přímé testování KM se provádí na dílčím vzorku skvrny nebo v případě výtěrů přímo na výtěru samotném, když je potřeba zvýšit citlivost testování. [5]

### **Hemastix test**

Používají se testovací proužky, které obsahují diisopropylbenzen dihydroperoxid a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Pozitivní výsledek pozorujeme při okamžité změně barvy ze žluté na zelenou v důsledku přeměny redukované bezbarvé formy 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu na jeho oxidovanou barevnou formu [6].

Mezi další katalytické testy taky patří guaiacum test, aloin test, leucocrystal violet a leucomalachite-green (LMG)- test [2].

Nevýhodou této řady testů je možnost narušení krvavé skvrny zředěním vodou, mytím detergenty/bělidlem. Výsledky testu mohou ovlivňovat materiály, ze kterých se provádí odběr (například džiny) nebo další sloučeniny, jako antioxidanty (například černý nebo zelený čaj),

podle kterých je možnost získat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky [7]. Často vzorky není možné použít pro další analýzu, protože činidla ovlivňují DNA [5]. Testy nejsou specifické pro lidskou krev, ukazují pozitivní výsledky i pro řadu živočišné krve.

### Chemické testy

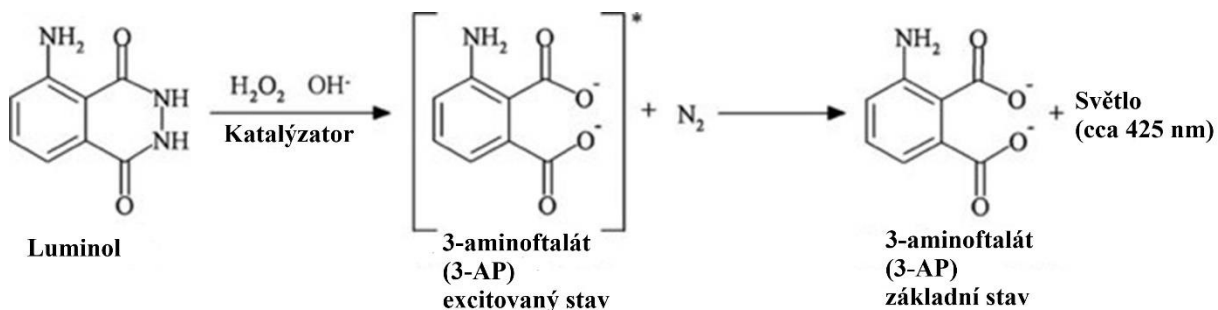
Chemické testy jsou obvykle založeny na změně barvy nebo vyvolávání záření určitého činidla při kontaktu se zkoumanou tělní tekutinou [1].

### Luminol test

Testy s luminolem jsou docela specifické, protože řadí se mezi katalytické testy, i když podle mechanismu účinku nefungují stejně jako výše uvedené testy.

Pro analýzu se používají reakce luminolu (3-aminofthalhydrazid) s peroxidem vodíku v alkalickém roztoku, která vyvolává vznik silné modré chemiluminiscence. Toto záření je možné zesílit pomocí přechodných kovů (například kobalt nebo měď), jejich komplexů a peroxidas, které tuto reakce katalyzují. Železo  $Fe^{2+}$ , které je částí hemoglobinu v krvi, má schopnost katalyzovat reakce za vzniku modrého až fialového záření (Obrázek 1) [2].

U současných analýz se nejčastěji používá Weberův protokol pro přípravu sloučeniny [8].



Obrázek 1 Schéma reakce luminolu s peroxidem vodíku za vzniku chemiluminiscence [2]

Luminol test je velmi citlivá metoda a ukazuje vyšší specifitu v porovnání s řadou katalytických testů, nicméně nevýhodami této analýzy jsou: potřeba tmavého prostředí a speciálního zařízení, krátká doba trvání chemiluminiscence (30 – 60 s) a taky někdy škodlivé účinky pro vedlejší analýzu DNA.

U reakce s luminolem mají schopnost zesilovat chemiluminiscenci i jiné sloučeniny – přechodné kovy a jejich komplexy, bělidla, peroxidasy, rostlinné a živočišné proteiny, antioxidanty [1, 2].

### **1.1.1.2 Potvrzující testy**

#### **Krystalické testy – Takayama test a Teichmann krystal test**

Krystalické testy jsou založeny na metodě potvrzení přítomnosti hemoglobinu a jeho derivátů pomocí reakce, která vyvolává tvorbu krystalů.

Principem Teichmannova testu je tvorba hematinu při zahřívání zaschlé skvrny za přítomnosti ahalidu a ledové kyseliny octové. Výsledkem tohoto testu je tvorba hnědých, kosočtverečných krystalů. Test je velmi citlivý na nedostatečné a nadměrné zahřátí [9].

Principem Takayamova testu je tvorba hemochromogenu při zahřívání zaschlého barviva v přítomnosti pyridínu a glukosy za alkalických podmínek. U tohoto testu pozitivním výsledkem je tvorba jehlicovitých krystalů. Test je výhodnější v porovnání s hematinovým testem – má menší citlivost k zahřívání a širší škálu kompatibility barviv [9].

#### **Imunochromatografické testy – RSID Test for Human Blood a ABACard® HemaTrace®**

RSID™-Blood je imunochromatografická zkouška, která používá dvě myší monoklonální protilátky specifické pro lidský glykoforin A. Jedna z těchto protilátek je konjugovaná s koloidním zlatem a aplikuje se na konjugovanou destičku pod okénkem pro vzorek. Druhá protilátka se aplikuje v proužku na destičku [10].

Testovací linie na membráně je připojená ke konjugované destičce. Kontrolní linie na membráně se skládá z protilátky proti myšimu IgG a používá se jako vnitřní kontrola.

Jakmile se do okénka pro vzorek přidá testovaná tekutina, pracovní pufr a vzorek difundují přes konjugát a znovu rozpouštějí protilátku konjugovanou se zlatem.

Pokud je ve vzorku přítomen lidský glykoforin A, vytvoří se komplex antigen-protilátka-koloidní zlato. Vzorek a protilátky (komplexní i volné) jsou transportovány objemovým tokem kapaliny do membránové fáze proužkového testu. Imobilizované protilátky proti glykoforinu A na testovacím proužku zachytí komplex antigen-protilátka-koloidní zlato a vytvoří červenou čáru v poloze Test.

Pokud se neobjeví žádný lidský glykoforin A ve vzorku, nevytvoří se žádné komplexy protilátka-antigen konjugované se zlatem a na testovací linii se nenahromadí žádné koloidní zlato. Na kontrolní testovací linii zachytí antimitý IgG protékající kolem testovacího řetězce a vytvoří červenou linii v kontrolní pozici. To znamená, že vzorek je transportován po celé délce testu a že složky proužkového testu pracují správně [11].

## **ABAcard® HemaTrace®**

ABAcard® HemaTrace® je imunochromatografický test pro forenzní identifikaci lidské krve. Pokud je ve vzorku přítomen lidský hemoglobin, reaguje s barvivem konjugovaným s mobilními monoklonálními protilátkami anti-hemoglobinu (anti-Hb) za vzniku mobilního komplexu antigen – protilátka hemoglobinu (Ag-Ab) [10]. Tento komplex migruje přes absorpční testovací proužek směrem k testovací oblasti T testovací karty. V oblasti T je imobilizována polyklonální protilátka anti-hHb. Tato imobilizovaná protilátka zachytí pohyblivý komplex Ag-Ab, čímž vznikne sendvičový komplex Ab-Ag-Ab. Pozitivní výsledek pozorujeme při vzniku růžového pásu v oblasti T, čímž potvrzujeme přítomnost krve [12].

Vzorky musí být správně naředěny, aby se předešlo efektu vysoké dávky (z angl. high dose hook effect). Pokud je ve vzorku nadměrné množství testovací látky, nenaváže se celé množství antigenu na protilátku značenou zlatem. Volná látka se dostane do zóny hodnocení testu a naváže na protilátku fixovanou v této zóně. Vazebná místa protilátky se zablokují, takže látka navázaná na zlatem značenou protilátku se nemůže již vázat. Tvorba sendvičového komplexu je potlačena a nedochází ke vzniku barevné čáry, což má za následek falešnou negativitu. Pokud je podezření na příliš vysokou dávku, měl by se vzorek dále naředit a znovu otestovat [13].

### **1.1.2 Sperma**

Kromě krve, další tělní tekutinu, kterou lze použít k identifikaci, je sperma. Sperma může být cenným důkazem v případech znásilnění, často může být použito k prokázání, že k znásilnění skutečně došlo, a v mnoha případech i k identifikaci osoby odpovědné za trestný čin.

Charakterizace spermatu je možná, protože specifické složky jsou přítomny jenom ve spermatu nebo v koncentracích výrazně vyšších než v jiných částech těla. Nejvýraznějším z těchto markerů je přítomnost spermií, což lze použít jako potvrzující test [14].

#### **1.1.2.1 Presumptivní testy**

##### **PSA (ABAcard™ kit)**

P-30 antigen nebo prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein produkovaný v prostatě a uvolňovaný do spermatu bez ohledu na produkci spermií. Slouží ke zkapalnění spermatu a usnadnění pohybu spermií. Přítomnost p30 se používá jako způsob identifikace semenné tekutiny, zejména u vzorků s nízkým nebo žádným počtem spermií.

Ačkoli p30 se vyskytuje nejen v semenné tekutině, jeho extrémně vysoká koncentrace v semenné tekutině z něj činí účinný marker pro potvrzení přítomnosti spermatu na zkoumaných skvrnách [15].

P30 lze detekovat pomocí chromatografické enzymové imunosorbční analýzy. Extrakt skvrny se aplikuje na porézní membránu v přítomnosti monoklonální protilátky PSA, která je vázaná na barvivo. Pokud je v extraktu přítomen PSA, vytvoří se komplex anti-PSA Ab s Ag. Tento komplex pak migruje podél membrány, kde ve zkoumané oblasti interaguje s monoklonální protilátkou vůči PSA usazenou v membráně. Vzniklý komplex Ab-Ag-Ab se projeví barevnou čárou potvrzující přítomnost p30 (Obrázek 2) [16, 17].



Obrázek 2 ABACard (+ pozitivní a - negativní výsledky) [15]

Po uplynutí desetiminutové doby reakce by neměl být zaznamenán žádný výsledek testu – neomezená doba detekce by mohla vést k falešně pozitivní reakci. Nedostatečná kvalita a/nebo množství vzorku by mohlo znamenat falešně pozitivní výsledky [15].

### **Kyselá fosfatasa**

Kyselá fosfatasa (AP) je enzym, který vzniká v prostatě. Ačkoli je přítomen i v jiných tělesných tekutinách, vyskytuje se v semenné tekutině v 20 až 400krát vyšších koncentracích.

Kvalitativní vyšetření kyselé fosfatasy (AP) se používá jako screeningový test spermatu. Enzym AP působí na  $\alpha$ -naftylfosfát za vzniku  $\alpha$ -naftolu, který se pak spojí s barvivem Diazo Blue B a vytvoří fialově zbarvený komplex. Za nepřítomnosti AP nemá  $\alpha$ -naftylfosfát schopnost se spojit s barvivem a vytvořit barevný komplex a reakce zůstane bezbarvá. Vzhledem k tomu, že AP se nevyskytuje výhradně v lidském spermatu, lze jej použít pouze jako předběžný test na přítomnost ve spermatu [18, 19].

Změna barvy musí být pozorována do 30 sekund, aby byla považována za pozitivní výsledek testu. Neomezená doba detekce by mohla vést k falešně pozitivní reakci. Nedostatečná kvalita a/nebo množství vzorku by mohly znamenat falešně pozitivní výsledky [18].

### **Krystalické testy**

Krystalické testy jsou používané pro zjišťování prezenze látek, přítomných ve zkoumaném materiálu (například cholin a spermin), na základě reakce reagentů s látkou a následnou tvorbou krystalů. Nicméně tyto látky se mohou vyskytovat i v jiných tělních tekutinách, proto se testy používají jako presumptivní [20].

### **Florencův test a Barberio test**

Florencův test se používá ke zjištění přítomnosti cholinu – látky, která má důležitou roli při regulaci struktury a tekutosti membrán, zrání a oplodňovací schopnosti spermií. Pro zjištění přítomnosti cholinu se ke zkoumanému materiálu přidává činidlo na bázi jódu. Pozitivním výsledkem je tvorba hnědých krystalů cholin-periodidu. Počet krystalů záleží na době trvání reakce a koncentraci cholinu [20].

Barberio test se používá ke zjištění prezenze sperminu – látky, zodpovědné za specifický zápach spermatu. Pro detekce sperminu se ke zkoumanému materiálu přidává nasycený roztok kyseliny pikrové. Pozitivním výsledkem je tvorba jehlovitých, kosočtvercových žlutých krystalů spermin pikrátu [20].

### **Pomocné testy – fluorescence**

Spermie má schopnost fluorescence pod UV světlem, což umožňuje přítomnost flavinu nebo cholin-konjugovaných bílkovin. Barva záření se liší od modré do žluté podle použitých světelných zařízení (například Wood's Lamp, 360 nm) [21].

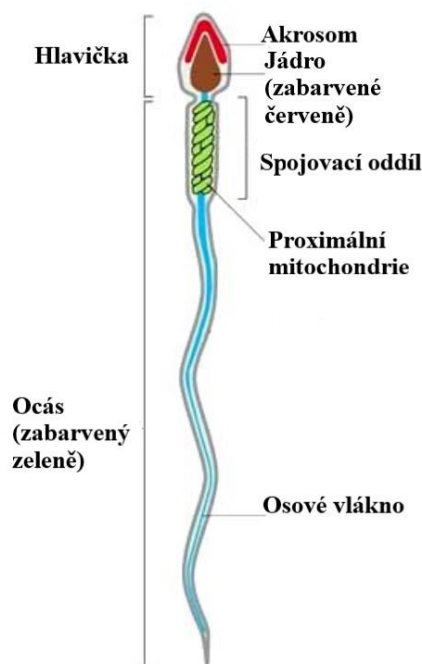
#### **1.1.2.2 Potvrzující testy**

### **Christmas Tree Stain**

Jednou z nejlepších metod identifikace spermií je mikroskopické vyšetření materiálů v důkazní skvrně. Spermie se rozpoznávají na základě morfologického vzhledu neporušené buňky – hlavička (s akrozomem), střední díl a ocas [14].

Pro lepší pozorování buněk se používá tzv. diferenciální barvení Christmas Tree Stain. Buňky barvíme pomocí dvou barviv – Nuclear Fast Red a pikroindigokarmínu. Jádra uvnitř buněk se

barví růžově až fialově barvivem Nuclear Fast Red, ocas a epiteliální membrány se barví pikroindigokarmínem zeleně (Obrázek 3) [22].

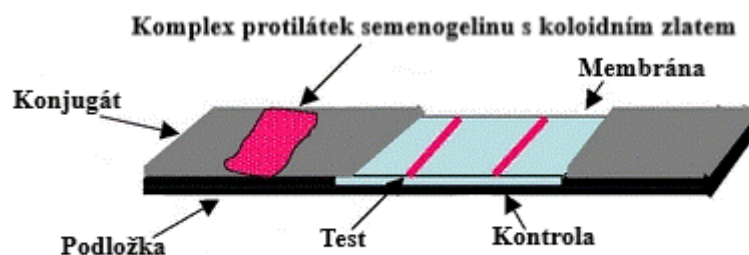


Obrázek 3 Struktura spermie a zbarvení jednotlivých oddílů [22]

Nedostatečná kvalita a/nebo množství vzorku by mohly omezit detekci spermií. Stejným způsobem se barví kvasinky pomocí barviva Nuclear Fast Red a mohou připomínat hlavičku spermie. Barvení je však rovnoměrné v celé buňce a rozšiřuje se do polypovitých struktur, které občas můžeme pozorovat u kvasinkových buněk [22].

### **RSID<sup>TM</sup>-Semen (Semenogelin)**

Test RSID<sup>TM</sup>-Semen je imunochromatografický test, který využívá dvě monoklonální protilátky specifické pro semenogelin. Jakmile je vzorek přidán do okénka pro vzorek, prochází pufr a vzorek konjugovanou podložkou, která je předem nabitá monoklonálními protilátkami proti lidskému semenogelinu konjugovanými s koloidním zlatem [17]. Vzorek redisolvuje protilátky proti semenogelinu značené koloidním zlatem, které vážou semenogelin ve vzorku, pokud je protein přítomen. Komplexy protilátek semenogelinu a koloidního zlata jsou transportovány objemovým tokem do membránové fáze testovacího proužku. Tyto komplexy, pokud jsou přítomny, migrují podél membrány a jsou vázány na testovací linii, která vytváří červenou linii v přítomnosti lidského spermatu (Obrázek 4) [23].



Obrázek 4 Test RSID™-Semen [23]

Kontrolní linie se vytvoří proužkováním kozí protilátky proti myším na membránovou složku proužkového testu; nanesená protilátka zadrží koloidní zlato proti myší monoklonální protilátce proti semenogelinu, která migruje za testovací linii. Čára nejbližší k jamce se vzorkem je testovací čára a ukazuje, že ve vzorku je přítomen lidský semenogelin. Testovací linie se vytvoří proužkováním myší monoklonální protilátky proti semenogelinu na membránovou složku proužkového testu; komplexy myší monoklonální protilátky proti semenogelinu značené koloidním zlatem, které se vytvoří v roztoku po přidání vzorku do jamky pro vzorek a které prošly konjugovanou podložkou a membránou, se zachytí na testovací linii. Pro interpretaci výsledků musí být 10 minut po přidání vzorku viditelná červená kontrolní linie [23].

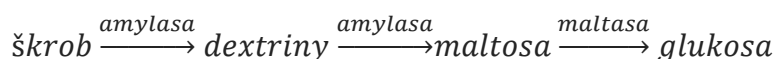
### 1.1.3 Slina

Třetí důležitou tělní tekutinou je slina. Přítomnost slin na místě činu může být někdy cenná, ačkoli testy potvrzující přítomnost slin jsou obtížnější než podobné testy krve a spermatu. Například při vyšetřování podezření na sexuální znásilnění může forenzní vědec hledat přítomnost slin na těle oběti. Sliny mohou být přítomny i na mnoha dalších forenzních důkazech, například v lepidle na razítku dopisu o únosu.

#### 1.1.3.1 Presumptivní testy

##### Enzymatické vyšetření

Standardní metodou identifikace sliny je přítomnost enzymu amylasy, jejíž funkcí je rozkládat škrob na menší molekuly. Škrob je glukózový polysacharid, tj. velmi velký polymer složený z monomerů glukosy. Amylasy hydrolyzuje některé  $\alpha$ -1,4 vazby ve škrobu, čímž vznikají glukózové polysacharidy s nižší molekulovou hmotností, známé jako dextriny. Dextriny jsou pak dále hydrolyzovány amylasou za vzniku disacharidu maltosy [24]:



Při provádění amylasového testu se přitiskne filtrační papír nebo tampon navlhčený roztokem škrobu ke skvrně, která může obsahovat sliny. Pokud jsou sliny přítomny, amylasa hydrolyzuje škrob a přemění jej na maltosu.

Pro testování přítomnosti maltosy se filtrační papír nebo tampon postříká roztokem, který detekuje přítomnost maltosy, například Benediktovým roztokem, Brentaminovou modří nebo Procionovou červení [4, 25].

### Pomocné testy – fluorescence

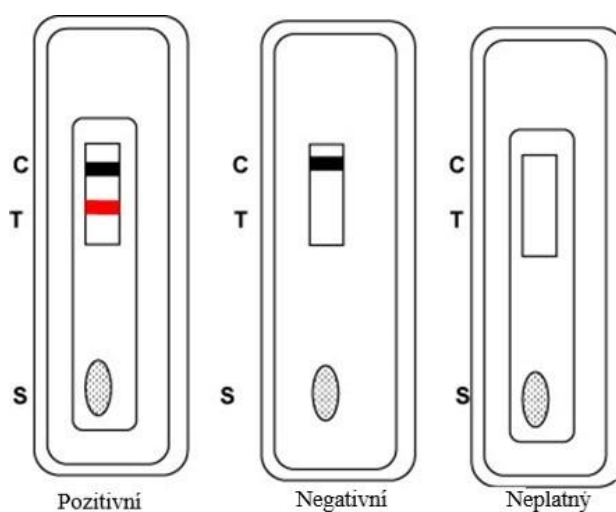
Aromatické aminokyseliny, tryptofan v slinné  $\alpha$ -amylase jsou schopné vytvářet charakteristické emisní spektrum při fluorescenční spektroskopii (345 – 355 nm) a má tak dobrou citlivost při detekci zaschlých skvrn od slin na kůži [26].

#### 1.1.3.2 Potvrzující testy

##### Amylase test – RSID Test for Human Saliva

Test RSID<sup>TM</sup>-Saliva je imunochromatografický proužkový test s laterálním průtokem určený k detekci přítomnosti lidské slinné  $\alpha$ -amylasy. Test, který používá dvě monoklonální protilátky proti lidské slinné amylase, detekuje přítomnost slinné amylasy.

Do okénka pro vzorek (S) se napipetuje 100  $\mu$ l vzorku a výsledky se odečtou po 10 minutách. Přítomnost dvou červených čar, jedné v testovací oblasti T a jedné v kontrolní oblasti C, znamená pozitivní výsledek. Červená čára v kontrolní oblasti C znamená pouze negativní výsledek. Nepřítomnost červené čáry v oblasti C znamená neplatný test (Obrázek 5) [27].



Obrázek 5 Test RSID<sup>TM</sup>-Saliva [27]

## 1.2 Porovnání metod

### 1.2.1 Krev

Tabulka 1 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace krve

Test/ skupina testů	Výhody	Nevýhody
Presumptivní testy		
Katalytické testy	Rychlost a citlivost	Testy nejsou specifické a mohou být ovlivněné řadou faktorů, falešné výsledky
Chemické testy	Rychlost, citlivost a vyšší specifita ve srovnání s katalytickými testy	Schopnost zesilovat reakce pomocí jiných sloučenin, falešné výsledky reakce, škodlivé účinky pro DNA, tmavé podmínky prostředí a speciální zařízení
Potvrzující testy		
Krystalické testy	Vysoká specifita, citlivost a rychlost	Některé testy jsou citlivé na nedostatečné nebo nadměrné zahřátí; speciální zařízení
Imunochemické testy	Vysoká specifita, citlivost a rychlost	Příliš vysoké koncentrace mohou vyvolávat falešné výsledky

## 1.2.2 Sperma

Tabulka 2 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace spermatu

Test/ skupina testů	Výhody	Nevýhody
Presumptivní testy		
P30 test (PSA)	Specifita, rychlost a citlivost	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách; příliš vysoké koncentrace mohou vyvolávat falešné výsledky
AP test	Specifita, rychlost a citlivost	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách; příliš vysoké koncentrace a neomezená doba detekce mohou vyvolávat falešné výsledky
Krystalické testy	Specifita, rychlost, citlivost, tvorba specifického produktu	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách
Pomocné testy	Specifita, rychlost a citlivost	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách; speciální zařízení
Potvrzující testy		
Christmas Tree Stain	Rozlišení podle specifických struktur, citlivost a rychlost	Falešné výsledky, když se ve vzorku vyskytují struktury, které se barví stejným způsobem (kvasinky)
Semenogelin	Vysoká specifita, citlivost a rychlost	Příliš vysoké koncentrace mohou vyvolávat falešné výsledky

### 1.2.3 Slina

Tabulka 3 Porovnání presumptivních a potvrzujících testů identifikace sliny

Test/ skupina testů	Výhody	Nevýhody
Presumptivní testy		
Enzymatické vyšetření	Specifita, rychlost a citlivost	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách
Pomocné testy	Specifita, rychlost a citlivost	Výskyt látky v jiných tělních tekutinách; speciální zařízení
Potvrzující testy		
RSID Test for Human Saliva	Vysoká specifita, citlivost a rychlost	Příliš vysoké koncentrace mohou vyvolávat falešné výsledky

### 1.3 Možnosti zlepšení současných technik

Při použití metod pro potvrzení přítomnosti biologických materiálů je žádoucí použít jak presumptivní, tak i potvrzující testy pro vyšší kvalitu interpretovaných výsledků. Častou nevýhodou testů je jejich nespecifičnost – schopnost reagovat nejen s analyzovaným materiálem, ale také s vedlejšími produkty. Schopnost zvýšit specifitu reakcí dosažením minimálního počtu materiálů, které by mohly reagovat se specifickým činidlem, zlepšit účinnost metod a minimalizuje výskyt falešně pozitivních/negativních výsledků. V této části bude popsáno několik příkladů vylepšení vybraných metod.

Krev je jedním z materiálů s největším počtem testů pro detekci. Mezi nimi je nejznámější a nejrozšířenější luminol. Jako presumptivní test má řadu nevýhod, které se díky určitým vylepšením však podařilo minimalizovat.

Metoda měření ultra slabé chemiluminiscence (uwCL) umožňuje detekovat extrémně malé množství krve zředěné i 12,5 milionkrát. Ačkoli reakce není vhodná pro terénní výzkum, tato metoda výrazně zvyšuje citlivost metody [28].

Další metodou je vylepšení Weberova protokolu přidáním sloučenin, které můžou zvyšovat intenzitu chemiluminiscence. K tomuto účelu lze použít MCT- $\beta$ -cyklodextrin, který se váže na 3-aminofthalát, čímž zvyšuje intenzitu a dobu trvání emise. K ovlivnění reakce bylo rovněž

navrženo použití 8 M roztoku močoviny, který vede k denaturaci hemu, což následně vede ke zvýšení enzymatické aktivity. Roztok močoviny je také schopen reagovat s chlornanem sodným, složkou přítomnou ve většině čistících prostředků pro domácnost; konečné produkty této reakce nejsou schopny ovlivnit proces luminiscence, čímž se snižuje riziko falešně pozitivních reakcí [8].



Analýza krevních skvrn může být komplikovaná v případě, kdy se krev pachatelé pokusili odstranit pomocí detergentů nebo bělidel. V tomto případě se hodí sloučenina Bluestar na základě luminolu, která má řadu výhod: možnost připravit roztok v terénu, není třeba zcela zatemněné prostředí, u metody lze pozorovat delší dobu chemiluminiscence a silnější intenzitu. Bluestar také nemá tak agresivní účinek na DNA, což teoreticky umožňuje použít vzorky k další analýze [29, 30, 31].

## 2 DNA-FINGERPRINTING

Jedním z nejlepších potvrzujících testů pro identifikaci jedinců je DNA-profiling nebo DNA-fingerprinting. Všechny živočišné buňky, s výjimkou některých buněk s jádrem (například krevní buňky savců), obsahují DNA. V lidském těle je DNA každé buňky identická, v průběhu času se nemění a je pro každého jedince unikátní (s výjimkou jednovaječných dvojčat) díky různému uspořádání čtyř nukleotidů do různých sekvencí, což má významnou roli při forenzní identifikaci. Nejnovější techniky umožňují sekvenovat i celý genom, ale vzhledem k tomu, že rozdíl mezi lidmi umožňují krátké úseky-markery, většina práce se zaměřuje především na oblasti s vysokou mírou variability.

V této části se budeme zabývat metodami analýzy DNA z poskytnutých vzorků, jakož i obtížemi s tím spojenými.

### 2.1 Odběr vzorku a izolace materiálů

Lidé neustále ztrácejí buňky a zanechávají za sebou stopu DNA. Pokud není možné získat materiál DNA přímo, musí vědci shromáždit materiál z míst zločinu, těla oběti nebo lokalit, kde se zločinec mohl pravděpodobně nacházet. V tomto případě existuje riziko kontaminace, což snižuje pravděpodobnost přesné identifikace profilu jedince.

Materiály s nejvyšším obsahem DNA jsou krev, sliny, sperma; k analýze lze použít také tkáň, kosti, nehty a obsah pod nimi a vlasové folikuly [25].

Výchozím materiálem pro genetickou analýzu je obvykle vodný extrakt nukleových kyselin zbavený proteinů. Účelem izolace a extrakce je narušit komplex nukleové kyseliny a bílkoviny. Detergenty (SDS, Triton) a lyzační pufr (TRIS pufr s EDTA, pH 8 – 9) se používají ke zvýšení propustnosti buněčných membrán, v nichž DNA v alkalickém prostředí disociuje. Proteiny se pak enzymaticky štěpí (například enzymem proteinkinázou K). Poté lze použít jednu z možností extrakce, nejčastěji na mikrokolonkách. Nejběžnějšími metodami jsou Chelex, FTA a komerční kity [32].

Vzorky odebrané od konkrétního dárce mají oproti vzorkům zajištěným přímo z místa činu výhodu, protože obsahují dostatečné množství použitelného materiálu, jsou odebrány v relativně čistém a kontrolovaném prostředí, mají nižší riziko degradace a obsahují minimum inhibitorů PCR. Takové vzorky obvykle před analýzou procházejí pouze krokem lýzy [33].

Důležitou roli hraje čistota pomocných materiálů potřebných k odběru vzorků. Sterilizace nezajistí vždy úplnou nepřítomnost nukleových kyselin na povrchu pomůcek. Je známý případ

falešné stopy DNA způsobené kontaminací vatových tyčinek pro odběr vzorků při sterilizaci pomůcek. Proto existuje termín „PCR clean“, což znamená, že vzorek nesmí obsahovat DNÁzu a RNÁzu, musí být zbavený inhibitorů PCR a cizorodé DNA [34].

## **2.2 Markery**

Techniky typizace DNA umožňují porovnávat vzorky od různých osob a zjišťovat jejich podobnosti nebo rozdíly. Tyto metody se široce používají ve forenzních vědách k identifikaci pachatelů trestných činů na základě shromážděného materiálu, který byl buď dobrovolně poskytnut, nebo už byl uložen v databázích. Dva lidé na planetě mají z 99,9 % podobnou DNA. Zbývajících 0,1 % tvoří polymorfni znaky – genetické markery – lokusy na chromozomech, které se používají ve forenzních vědách k identifikaci osob. Může se jednat o krátkou sekvenci se substituovaným nukleotidem na určitém místě nebo i delší sekvenci. Proto mají lidé svůj jedinečný kód a právě rozdíly v 0,1 % materiálu jsou cílem analýzy. Mezi nejčastěji používané druhy markerů patří mikrosatelity, minisatelity (které se souhrnně označují jako markery SSLP) a jednonukleotidový polymorfismus (SNP).

### **2.2.1 Jednonukleotidový polymorfismus**

SNP označují substituci jednoho nukleotidu na určitém místě v genomu nebo jeho inserce/delece. Obecně jsou polymorfismy definovány jako existence dvou nebo více variant, které se v populaci vyskytují s frekvencí  $\geq 0,01$ . Pokud SNP vedou ke změně umístění restrikčního místa, může dojít ke změnám v délce restrikčních fragmentů [35, 36].

### **2.2.2 Krátké tandemové opakování**

Krátké tandemové opakování (STR) nebo mikrosatelity jsou krátké tandemové se opakující sekvence DNA sestávající z opakujících se jednotek o délce 1 – 6 bp, které tvoří řady až 100 nukleotidů. Krátké repetice jsou v lidském genomu běžné, tvoří 3 % celého genomu a z toho pouze 8 % v kódující části. Mají vyšší riziko mutací, což znamená vyšší genetickou variabilitu. Nejčastěji se používají k porovnání vzorku odebraného na místě činu s obětí nebo pachatelem [37 – 40].

### **2.2.3 Variabilní počet tandemových opakování**

Variabilní počet tandemových opakování (VNTR) nebo minisatelity jsou místa v genomu, kde je krátká sekvence nukleotidů uspořádána do tandemových opakování. Může se vyskytovat v důsledku polymorfismů typu inserce/delece. Obvykle představuje rozdíl v počtu kopií repetitivních tandemových jednotek délky sekvence mezi jedinci [41 – 45].

Samostatně lze popsat také Y-analýzu, která se používá k určení markerů STR a VNTR umístěných na Y-chromozomu. Tento typ analýzy je užitečný v případech týkajících se znásilnění [46].

#### **2.2.4 Mikro haplotypy**

Mikrohaplotypy jsou skupiny 2 nebo více SNP, které lze použít k určení původu jedince. Tento typ markerů je jedním z nových forenzních markerů, jejichž použití bylo umožněno rozvojem nových metod sekvenování. Tento typ markerů lze použít k určení příbuznosti (což je informativní v případě poskytnutí biologického materiálu příbuznými potenciálního pachatele) a také k detekci a kvantifikaci tzv. směsí DNA, kdy vzorek obsahuje genetický materiál od více než jedné osoby [47].

#### **2.2.5 Transpozibilní elementy**

Mobilní elementy jsou repetitivní sekvence DNA s unikátní schopností pohybovat se v genomu a samostatně se replikovat. Pro forenzní analýzu jsou nejdůležitějším typem těchto elementů SINEs (short interspersed elements). Jedná se obvykle o krátké (100 – 500 bp) sekvence, které se používají k identifikaci původu jedince. V těchto sekvencích je obzvláště důležitý *Alu* element. Zabírá 10 % celého genomu za přítomnosti milionů kopií krátké sekvence o délce 300 bp. Tyto sekvence hrají důležitou roli při určování pohlaví, například v případech sexuálního násilí, a to díky pevným inzercím – *AluSTXa* a *AluSTYa* na chromozomu X a Y [48].

### **2.3 Metody analýzy materiálů**

Kvalitativní analýza materiálů a identifikace cílových sekvencí je založena především na co nejefektivnějším výběru metod a technologií, které poskytnou co nejpřesnější výsledky. V tomto případě je kvalitním výsledkem analýzy dekodování polymorfního znaku s minimálním počtem chyb, což následně umožňuje identifikaci osoby, která spáchala trestný čin nebo se stala jeho obětí. V této části budou popsány některé technologie nebo jejich kombinace, které se používají pro efektivní detekci markerů; zároveň budou zváženy výhody a nevýhody, příklady zlepšení stávajících metod.

#### **2.2.1 Southern blotting**

Southernův přenos je jednou z hybridizačních technik pro analýzu markerů. Hybridizace v roztoku je obvykle založena na tradičních technikách PCR, PCR v reálném čase nebo sekvenování a bude diskutována v následujících částech práce. Hybridizace na pevném

podkladu používá k analýze fragmentů sondy. Technologii Southern blottingu lze použít při analýzách, jako je RFLP a AFLP [49, 50].

Vzorky DNA se štěpí pomocí restrikčních endonukleáz. RE je typ enzymu, který dokáže rozštěpit dvouřetězec DNA v určitém místě bez poškození dusíkaté báze. Rozštěpené vzorky se rozdělí pomocí gelové elektroforézy v agarózovém gelu. Elektroforéza je jednou z nejběžnějších metod separace materiálu. Fragmenty se oddělují na základě jejich velikosti, protože větší prvky zůstanou blíže k počátku, zatímco menší se budou pohybovat rychleji. Fosfátová skupina nukleotidů nese záporný náboj, takže se fragmenty pohybují směrem ke kladně nabitě anodě. Spolu s analyzovanými vzorky je separován také velikostní marker, tzv. DNA ladder – standardizované fragmenty DNA různých délek pro porovnání s délkami neznámých sekvencí. Po elektroforéze se fragmenty DNA denaturují v 0,5 M roztoku hydroxidu sodného. Poté se na gel položí hybridizační membrána, na které zůstanou makromolekulární fragmenty DNA, strhávané kapilárním nasáváním (blottingem). Membrána se poté inkubuje s hybridizačním pufrům obsahujícím radioaktivně nebo fluorescenčně značenou sondu a identifikuje se signál specifického vlákna DNA přítomného ve vzorku [32].

V metodě RFLP, která je jednou z prvních technik pro analýzu genetických markerů, se tato technologie používala například k detekci VNTR, ke zjištění rozdílů v délce markerů mezi různými jedinci, nebo SNP, ke zjištění substituovaných nukleotidů v sekvenci [50].

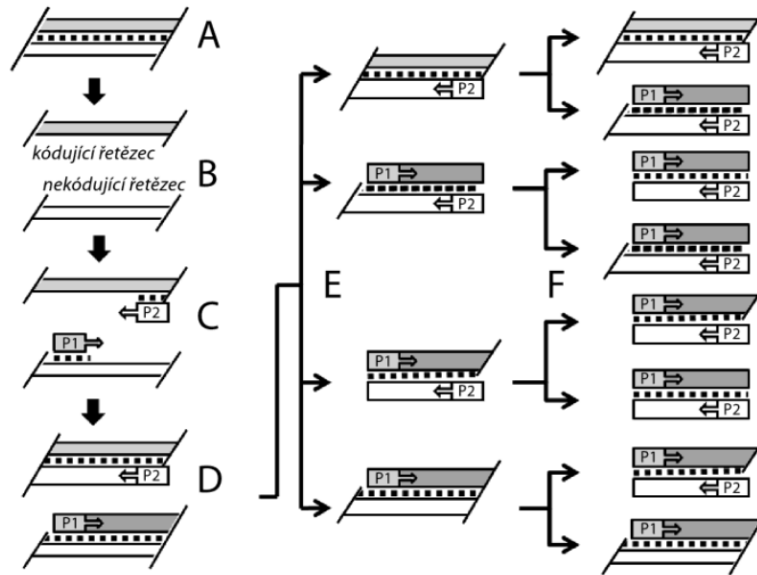
Po určitou dobu se Southern blotting používal také pro analýzu produktů PCR. Metoda AFLP se liší tím, že po štěpení fragmentů pomocí RE projdou vzniklé řetězce procesem amplifikace, fragmenty jsou rovněž odděleny elektroforézou a analyzovány pomocí sondy. Tento typ analýzy však nyní využívá nové PCR metody, které již nevyžadují Southern blotting. Pomocí AFLP lze analyzovat STR markery. V současné době není používání Southernového přenosu tak populární vzhledem k vývoji rychlejších a účinnějších technologií [32, 51].

### **2.2.2 Polymerázová řetězová reakce**

Vývoj technik polymerázové řetězové reakce zahájil novou éru DNA-profilingu. PCR je základní technika amplifikace DNA pomocí enzymatických reakcí. Moderní laboratoře mohou využívat různé způsoby analýzy biologického materiálu pomocí amplifikačních technik. V této části článku budou diskutovány tři různé metodiky PCR: tradiční PCR, qPCR a rychlá PCR (rapid DNA).

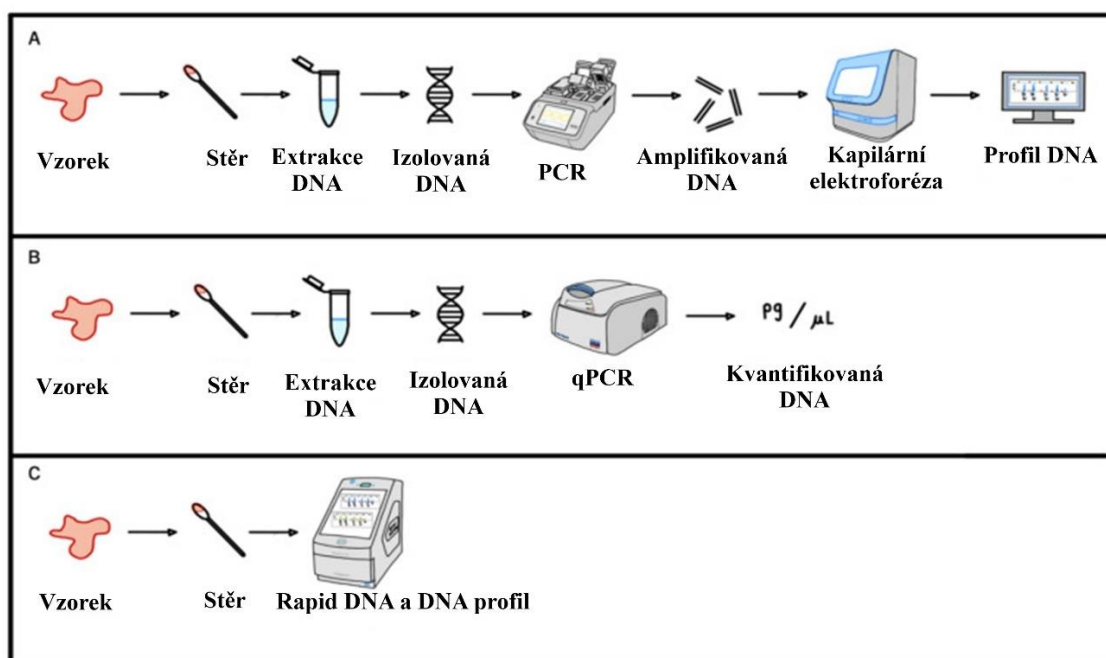
Amplifikace vzorků pomocí PCR vyžaduje 5 klíčových komponent – dNTP, termostabilní DNA polymerázu, templátovou DNA, primery a pufr s obsahem hořčíku a draslíku.

Polymerázová řetězová reakce se skládá ze tří kroků: zahřátí k rozrušení dvouřetězcové nukleové kyseliny, annealing k ukotvení primerů na cílovou sekvenci a elongace, která probíhá při teplotě vyšší než teplota annealingu, která je optimální pro syntézu nové dvouřetězcové molekuly DNA pomocí polymerázy (Obrázek 6). Tyto tři kroky se opakují, dokud nebude syntetizováno požadované množství materiálu [32, 52].



Obrázek 6 Schéma polymerázové řetězové reakce [32]

Jednou z nejpoužívanějších moderních metod typizace DNA je STR PCR. V průběhu reakce se fluorofory připojené k primerům zabudovávají do produktů PCR (amplikonů), které byly syntetizovány během amplifikace templátové DNA. Amplifikovaný produkt se analyzuje pomocí kapilární elektroforézy, při které se detekuje přítomnost zabudovaných fluorescenčních značek [53].



Obrázek 7 Porovnání analýzy tradiční PCR (A), qPCR (B) a rapid DNA (C) [53]

Kvantitativní PCR, real-time PCR nebo qPCR (Obrázek 7) je modifikace standardní polymerázové řetězové reakce, která umožňuje sledování procesu amplifikace v reálném čase a přímou analýzu produktu. Hromadění amplifikovaného materiálu se vizualizuje pomocí fluorescenčních značek a sleduje se po každém cyklu. S každým cyklem se počet produktů PCR zdvojnásobí, což lze sledovat nárůstem fluorescence. Pro PCR v reálném čase se používají dvě metody analýzy: TaqMan Probe nebo SYBR Green [53].

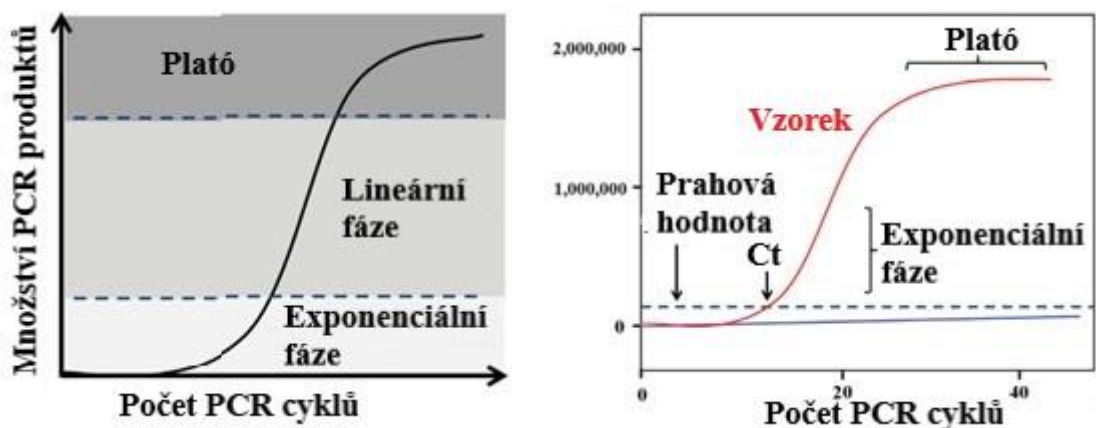
U metody SYBR Green je fluorescenční značkou interkalující barvivo, které se váže na dvouřetězcovou molekulu DNA. Cyklus začíná rozdělením dvouřetězcové molekuly amplikonu. Během denaturace se primery navážou na komplementární části a označí požadovanou sekvenci. Polymeráza syntetizuje komplementární fragment. Na dvouřetězcovou molekulu se naváže barvivo, které umožňuje sledovat fluorescenci po každém cyklu. Výhodou použití této metody je její dostupnost, ale nevýhodou je, že barvivo může být připojeno k jakékoli dvouřetězcové molekule, což znamená, že může analyzovat i nespecifické PCR produkty, například primery [54].

TaqMan Probe je metoda, která používá sondy, které jsou specificky modifikovány tak, aby se vážaly na komplementární sekvenci. Krátké sekvence sond jsou na 5' konci označeny fluorescenční značkou (reporter). Aktivita této značky je potlačena jiným barvivem (quencher) na 3' konci. Po oddělení dvouřetězcové molekuly se sonda připojí ke komplementární sekvenci. Polymeráza má 5' exonukleázní aktivitu a během syntézy komplementárního řetězce štěpí

sondu, což vede k oddělení reporter-barviva od quencher-barviva, což vede k emisi fluorescenčního signálu. Ve srovnání s předchozí metodou je tato metoda dražší, ale má vysokou specifitu, protože se váže pouze na cílovou sekvenci. Tato metoda je také multiplexní, což umožňuje připojení různých primerů a sond s jinými barvivy a díky tomu paralelní dekódování různých fragmentů [54].

Klasická křivka real-time PCR je založena na principu, že nárůst fluorescenčního signálu je přímo úměrný nárůstu amplifikovaného produktu PCR. Amplifikační křivka má tři fáze: exponenciální fázi, lineární a plató. Během první fáze se amplifikace zvyšuje exponenciálně, což znamená, že se produkty během každého cyklu zdvojnásobí. V lineární fázi začne amplifikační výkon klesat a ve fázi plató se sníží na minimum. Amplifikační křivka byla získána detekcí fluorescenčního signálu v každém cyklu (Obrázek 8) [55].

Počet cyklů, po nichž intenzita signálu dosáhne mezní hodnoty, se nazývá Ct. Nízké hodnoty znamenají vysokou koncentraci DNA, zatímco vysoké hodnoty znamenají, že signál je detekován se zpožděním, což svědčí o nízké koncentraci DNA [55, 56].



Obrázek 8 Amplifikační křivka PCR [55]

Další metodou používanou k analýze vzorků je rychlá PCR nebo rapid DNA. Metoda je založena na použití stejných primerů jako u STR PCR, s rozdílem, že se u rychlé PCR používají specializované PCR přístroje a software. Tím, že se vynechává krok kvantifikace DNA, umožňuje tato metoda rychlé vytvoření profilu DNA v krátkém čase pomocí zkrácených programů PCR. Pro efektivní analýzu a generování informativních profilů musí vzorky obsahovat velké množství vysoce kvalitní templátové DNA, která byla získána, například z referenčních vzorků [57].

Jednou z etap vývoje PCR v oblasti forezních věd je přechod od uniplexové metody k multiplexové. Do určitého období bylo možné během jedné reakce amplifikovat pouze jeden

specifický fragment DNA. Při používání forenzních technik je však cílem získat co nejvíce genetického materiálu z místa činu, aby bylo možné shromáždit co nejvíce variabilních fragmentů pro další rozpoznávání a porovnávání vzorků. Multiplexní PCR umožňuje amplifikaci většího množství fragmentů DNA v jedné reakci. Jeho výhodou je snížení množství extraktu DNA potřebného k získání profilu DNA a snížení množství činidel pro PCR. Požadavky na podmínky průběhu multiplexní PCR jsou však náročnější než u uniplexní PCR [53, 57].

### **2.2.3 Sekvenování**

*„Znalost sekvencí by mohla významně přispět k našemu poznání živé hmoty.“* - Frederick Sanger

Sekvence DNA, která se skládá z variací uspořádání 4 nukleotidových bází (A, T, C, G), obsahuje veškeré informace o konkrétním člověku, jako je pohlaví, rasa, barva očí nebo vlasů či sklony k nemocem. Sekvenování neboli soubor biochemických technik zaměřených na určení sekvence nukleotidových bází DNA, je metodou dešifrování genetického kódu, a tedy i profilu analyzovaného jedince.

Během 30 let od objevu dvouvláknové struktury DNA již vědci navrhli první generaci sekvenačních technik a v následujících letech došlo k vylepšení starých metod a vývoji nových. V současné době existují 3 (podle některých zdrojů 4) generace metod pro stanovení sekvence nukleotidů DNA.

#### 1. generace

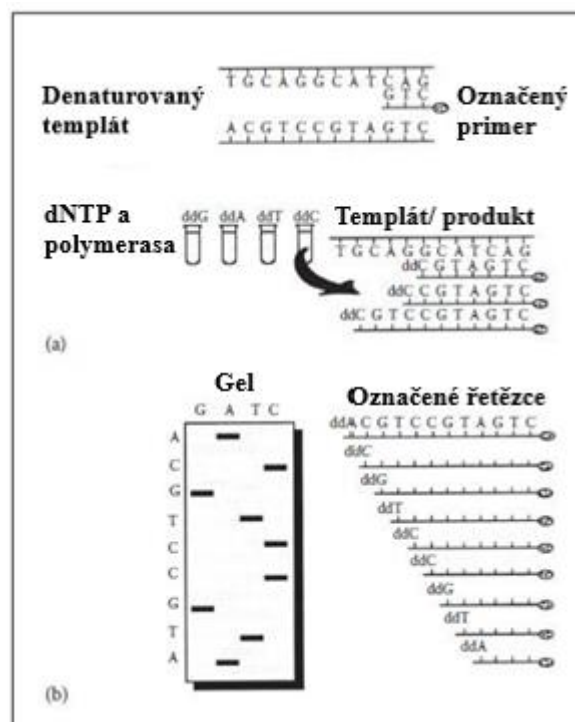
Metody první generace se považují za začátek vývoje technik sekvenování genomu. Tyto metody umožňují určení sekvence klonálních populací DNA. Mezi ně patří Sangerovo a Maxam-Gilbertovo sekvenování, resp. dideoxynukleotidová metoda a metoda „chemického sekvenování“ [58, 59].

#### **Sanger**

U metody sekvenování dle Sangerova (taky metoda sekvenování syntézou nebo dideoxynukleotidová metoda) se používají chemicky modifikované deoxynukleotidy zvané dideoxynukleotidy (ddNTP), označené pro jednotlivé báze jako ddA, ddT, ddC a ddG. Jako templát, který musí být sekvenován, se používá jedno z vláken dvouvláknové DNA.

Dideoxynukleotidy se odlišují od deoxynukleotidů tím, že ddNTP nemají 3'-hydroxylovou skupinu a netvoří vazby s 5'-fosfátem dalšího dNTP. Tímto se ukončuje elongace, protože řetězec se dále neprodlužuje a dochází k terminaci [60, 61].

Pokud se provede inkubace templátu a primeru spolu s DNA polymerasou v přítomnosti směsi dNTP a ddNTP označené  $^{32}\text{P}$ , vzniknou řetězce DNA různé velikosti, což je spojeno s tím, jak ddNTP se začleňují do řetězce a zastavují elongaci. Tento postup se provádí čtyřmi paralelními reakcemi, každá z nich obsahuje jednu ze čtyř bázi ddNTP. Řetězce se potom rozdělí na čtyřech deskách polyakrylamidového gelu, kde výsledné pásy lze vizualizovat pomocí rentgenového nebo UV záření (Obrázek 9) [59 – 61].



Obrázek 9 Schema Sangerova sekvenování [59]

Prvními genomy sekvenovanými tímto způsobem, jsou genom phiX174 (5374 bp) a genom bakteriofága  $\lambda$  (48501 bp).

U Sangerova sekvenování byla provedena řada vylepšení, například nahrazení označení  $^{32}\text{P}$  fluorimetrickou detekcí a zrychlení analýzy pomocí kapilární elektroforézy. Nicméně tato analýza neumožňuje sekvenování složitých genomů a je časově náročná a příliš drahá [59].

## **Maxam-Gilbert**

Maxamova a Gilbertova metoda (taky metoda chemického sekvenování) je založena na principu rozdělení zkoumaného řetězce na označené fragmenty, které lze oddělit pomocí elektroforézy podle jejich velikosti [58].

Čtený fragment DNA se označuje  $^{32}\text{P}$ , který je vložen na 5'konci, a dále se upravuje pomocí různých chemických látek, které odstraňují báze z malých úseků DNA. Během reakcí se úsek rozlomí na jedné nebo dvou ze čtyř nukleotidových bází v každé ze čtyř reakcí (C, T+C, G, A+G). K odstranění báze z purinů (A+G) se používá kyselina mravenčí, kde guanin také podléhá metylaci dimetylsulfátem (adenin bude též ovlivněn, ale v mnohem menší míře); pomocí hydrazinu lze odstranit báze z pyrimidinů (C+T), zatímco v přítomnosti vysokých koncentrací solí (například chlorid sodný) dochází k inhibici reakce thyminu a odstranění báze z cytosinu. V dalším kroku se použije piperidin ke štěpení řetězce a dojde k rozdělení na fragmenty různé velikosti. Fragmenty lze vizualizovat pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu – T a A lze přímo odvodit z pásu v pyrimidinovém, resp. purinovém pruhu, zatímco G a C jsou indikovány přítomností dvojitých pásů v pruzích G a A + G [59, 62].

Nicméně vylepšení a vývoj dideoxynukleotidové metody ji však upřednostnil před metodou chemického sekvenování. Navíc nevýhodou Maxam-Gilbertovy metody je použití toxických a radioaktivních chemikálií, proto je tato metoda považovaná za nebezpečnou [59].

## 2. generace – NGS

Od doby Sangerova sekvenování se vyvinuly nové sekvenační technologie nové nebo také druhé generace, které zlepšily analýzu dat a rozšířily rozsah nových metod. Tyto techniky zrychlily dobu analýzy díky souběžnému provádění velkého počtu reakcí, což rovněž přispělo i k tomu, že metody NGS jsou levnější, než metody 1. generace.

Techniky druhé generace nebo „short read“ jsou zastoupeny nejrozšířenějšími metodami Illumina a Ion Torrent [63, 64].

## **Illumina**

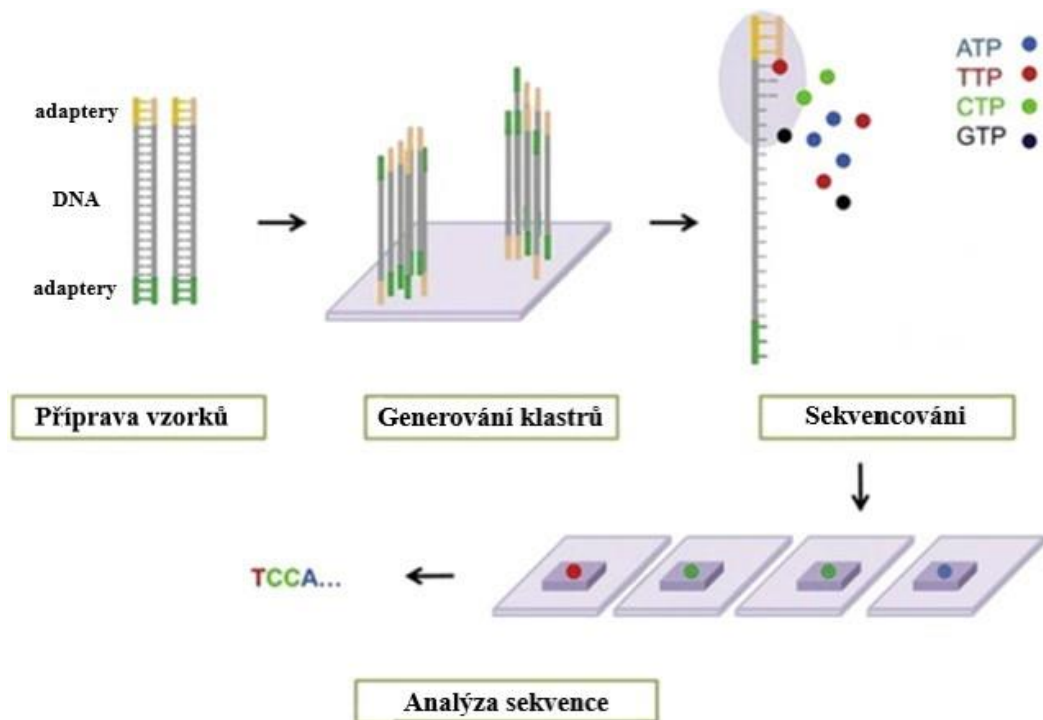
Proces analýzy metodou Illumina se skládá ze 4 fází: příprava vzorku, generování klastrů (soubor sekvencí vytvořených ze stejné původní sekvence), sekvenování a analýza dat.

V prvním kroku se na konce analyzovaných fragmentů připojí adaptéry DNA. Během zkráceného amplifikačního cyklu se k fragmentům přidají další komplementární adaptéry pro další vazbu s oligonukleotidy, navázané na pevné destičce [59, 64].

Druhá fáze zahrnuje proces, při němž se každý fragment molekuly množí při konstantní teplotě. Dva typy oligonukleotidů jsou připevněny ke skleněné destičce s několika dráhami. Každý fragment se připojuje k prvnímu druhu oligonukleotidů pomocí komplementárního adaptéru. Polymeráza vytvoří komplementární fragment k hybridizovanému vláknu. Dvojitě vlákno je denaturováno a pro analýzu zůstane pouze komplementární fragment. Řetězec je klonálně amplifikován pomocí metody „PCR amplifikačního můstku“ (bridge amplification). Fragment je svým druhým koncem vázán adaptérem na druhý typ oligonukleotidu připojeného k destičce. Polymeráza dokončí komplementární řetězec a vytvoří dvouřetězcový můstek. Molekula denaturuje a rozdělí se na dvě komplementární kopie. Tímto způsobem je možné namnožit všechny fragmenty na miliony kopií původního materiálu [59].

Třetím krokem je sekvenování vlákna – po každém cyklu do vlákna se připojí jeden fluorescenčně značený dNTP a výsledný fluorescenční signál je vizualizován. Sekvenování tímto způsobem se nazývá sekvenování pomocí syntézy (sequencing-by-synthesis). Ve velkém počtu paralelních procesů se dekoduje obrovské množství klastrů [59].

Kromě toho jsou platformy Illumina schopny provádět párové sekvenování, což je sekvenování na obou koncích fragmentu DNA, a poskytovat tak vysoce kvalitní sekvenční data.



Obrázek 10 Schéma sekvenování pomocí metody Illumina [59]

Díky technologii společnosti Illumina je tato metoda považována za jednu z nejpřesnějších metod sekvenování. Nevýhodou této metody je však časová náročnost, ale novější modely sekvenátorů umožňují kratší dobu sekvenování při zachování vysoké přesnosti a kvality [59].

### Ion torrent sekvenování

Na rozdíl od předchozí metody nepoužívá Ion Torrent sekvenování pro svou analýzu fluorescenčně značené nukleotidy a nevyžaduje optickou detekci. Ion Torrent sekvenování společnosti Thermo Fisher Scientific je metoda, která spočívá v uvolňování vodíkových iontů během sekvenování a změny pH roztoku, které pomáhají detekovat navázané nukleotidy pomocí změny napětí [59, 65].

Technologie této metody je založena na použití polovodičového čipu, který je pokryt velkým počtem mikrojamek s kuličkami Ion Sphere. Na kuličku se připojí fragment DNA a množí se, dokud jeho kopie nepokryjí celý povrch kuličky. Tento komplex je fixován v emulzi obsahující dNTP, primery a polymerasu. Jakmile se nukleotid naváže na svůj komplementární protějšek, uvolní se vodíkový iont, což vede ke změně pH roztoku. Polovodičový senzor (CMOS) detekuje tuto změnu převodem signálu na napětí. Změna napětí indikuje, že do řetězce byl vložen nový specifický nukleotid. Proces se opakuje každých 15 sekund a indikuje změnu napětí. Pokud se v řetězci nacházejí dva identické nukleotidy, jejich signál se zdvojnásobí, což znamená, že do řetězce byly vloženy dva identické nukleotidy.

Každá jamka funguje jako mikro-PCR reaktor, což umožňuje paralelní sekvenování v každé jamce zvlášť. Sekvenátory Ion Torrent jsou schopny číst sekvence o velikosti 200 bp, 400 bp a 600 bp. Jednou z hlavních výhod této metody je rychlost analýzy, která se pohybuje od 2,5 do 4 hodin. Nevýhodou této metody je však obtížnost sekvenování homopolymerních oblastí (více než 6 bp), protože může dojít ke ztrátě přesnosti interpretace v důsledku nepřesného měření napětového impulsu, což se může projevit v podobě chyb inserce/delece v jednom čtení (~ 1 %) [59].

Charakteristickými výhodami NGS oproti tradičnímu sekvenování první generace jsou výkonnost a multiplexita sekvenování. Multiplexování genů a vzorků výrazně snižuje náklady na jeden vzorek. Na současném trhu sekvenování dominuje sekvenování s krátkými čteními, protože v současné době bylo vyvinuto mnoho výpočetních nástrojů určených k analýze „*short read*“ dat [59].

Rozdíl mezi dvěma generacemi sekvenování je patrný také v dekodování lidského genomu. Lidský genom se skládá z 3 miliard bp a z makromolekul DNA o délce od 33 do ~ 247 milionů bp, které jsou rozmístěny ve 23 chromozomech umístěných v jádře každé lidské buňky. Sekvenování lidského genomu pomocí Sangerovy metody trvalo téměř 15 let, vyžadovalo spolupráci mnoha laboratoří po celém světě a stálo přibližně 100 milionů dolarů, zatímco sekvenování pomocí sekvenátorů NGS trvalo dva měsíce a stálo přibližně setinu nákladů [9]. Nicméně, NGS není schopna přečíst kompletní sekvenci DNA genomu, je omezena na sekvenování malých fragmentů DNA a generuje miliony čtení. Toto omezení zůstává negativním bodem zejména pro projekty sestavování genomu, protože vyžaduje vysoké výpočetní zdroje [59, 65, 66].

### 3. a vyšší generace

Na rozdíl od metod druhé generace umožňují metody třetí generace (nebo technologie „*long read*“) přímé sekvenování jednotlivých molekul DNA a generují sekvence o délce více než 10 bp. Budou popsány dvě hlavní „*long read*“ metody založené na různých technologiích – Pacific Biosciences (PacBio) a Oxford Nanopore Technology (ONT).

#### **Pacific Biosciences SMRT sequencing**

Pacific Biosciences je metoda fluorescenčně značených molekul, která se od předchozích metod liší tím, že umožňuje analýzu v reálném čase [58, 59, 67].

Prvním krokem je vytvoření knihovny SMRTbell®: na dvouřetězcovou molekulu DNA se navážou adaptéry, čímž vznikne kruhový templát, který se následně spojí primerem a polymerázou. Poté se upravený fragment umístí do zařízení sestávajícího z buněk (SMRT®-cell) tvořených velkým počtem mikrojamek ZMW (Zero-Mode Waveguides). Molekula je imobilizována v jamce, kde polymerasa syntetizuje komplementární řetězec pomocí čtyř fluorescenčně značených nukleotidů s individuálním emisním spektrem. Po inkorporaci polymerasou uvolní fluorescenčně značený nukleotid světelný signál, který umožňuje detekci zabudování nukleotidu v reálném čase [34]. Během procesu replikace jsou všechny ZMW v buňce SMRT zaznamenány jako film světelných signálů a impulsy odpovídající každému ZMW jsou dekodovány jako sekvence bází (CLR sekvenování) [59, 67].

Protože buňka SMRT® tvoří uzavřený kruh, po jedné replikaci polymerasou cílového vlákna DNA do molekuly můžou být navázané další báze adaptéru a následně i báze dalšího fragmentu. Tímto způsobem lze obě vlákna sekvenovat několikrát za jedno CLR a celé CLR rozdělit na několik subčtení rozpoznáním a vystřížením adaptérových sekvencí. Řetězec takových subčtení je složen do cyklické sekvence (CCS), která je čtena s vyšší přesností [59, 67].

### **Oxford nanopore sequencing**

Oxford nanopore sequencing je long-read metoda nativního materiálu v reálném čase bez použití kopií nebo templátových řetězců [59, 68].

K dvouřetězcovému fragmentu DNA se připojí adaptér a motorický protein. Sekvenátory (například MinION) obsahují membránu s velkým počtem nanopórů. Nanopóry mohou mít například bílkovinou strukturu stafylokokového  $\alpha$ -hemolyzinu ( $\alpha$ HL). Poté, co je řetězec zachycen nanoporem, motorický fragment na 5' konci adaptéru přesune jeden z fragmentů řetězce pórem, čímž vznikne změna iontového proudu v důsledku rozdílu pohybu nukleotidů, které se nachází v póru. Změny iontového proudu jsou zaznamenány na grafickém modelu a poté dekodovány za účelem určení sekvence nukleotidů. Sekvenování se nejprve provádí na jednom vlákně, čímž se vytvoří templátové čtení, po němž se přečte struktura adaptéru. Dalším krokem je čtení druhého vlákna, které generuje komplementární čtení. Tato čtení se označují jako "1D". Pokud se templátové a komplementární čtení zkombinují, získáme konsenzuální sekvenci, která se nazývá obousměrné čtení nebo "2D". Tato metoda umožňuje rychlost čtení 400 bází za sekundu a trvá přibližně 5 – 10 minut [68].

Obecnými výhodami metod sekvenování třetí generace ve srovnání s NGS jsou rychlost provedení práce, možnost sběru dat v reálném čase a jejich obrovský objem. Při práci se používá

přímo nativní DNA, což pomáhá předcházet chybám při amplifikaci, které se využívá u metod krátkého čtení. Kromě toho jsou konkrétně přístroje ONT levnější a menší než sekvenční platformy druhé generace nebo dokonce i PacBio, takže jsou vhodné pro nízkorozpočtové prostředí nebo pro terénní výzkum [67, 68].

Mezi nevýhody ONT patří přirozeně vyšší počet chyb (12 % – 3 % neshod, 4 % inzercí a 5 % delecí) ve srovnání s metodami druhé generace. V současné době technologie PacBio používají čtení HIFI (highly accurate long sequencing reads), využívající vícenásobné sekvenování dlouhých molekul, čímž se minimalizuje počet chyb. ONT zase dosahují tohoto výsledku úpravou proteinu nanoporů, která zajišťuje pomalejší průchod nukleotidů. Nicméně chyby ONT jsou většinou systematické a jejich odstranění je obtížnější než odstranění náhodných chyb [59, 68].

## 2.4 Porovnání

### 2.4.1 Metody

Tabulka 4 Porovnání metod typizace DNA

Metoda	Výhody	Nevýhody
Southern blotting	Nízká cena	V současné době metoda není populární díky vývoji nových technik
PCR		
Tradiční	Princip metody se používá u dalších druhů amplifikace; nižší cena	Má nižší přesnost ve srovnání s dalšími metodami
qPCR	Metoda je multiplexní a zajišťuje vyšší přesnost	Metoda je dražší
Rapid DNA	Metoda umožňuje analýzu nativního materiálu, je rychlejší a levnější ve srovnání s dalšími metodami	Vzorky musí obsahovat velké množství vysoce kvalitní templátové DNA; speciální zařízení

Tabulka 5 Porovnání metod typizace DNA – pokračování

Metoda	Výhody	Nevýhody
Sekvenování první generace		
Sangerovo sekvenování	Princip metody se používá u dalších generací sekvenování	Metoda je časově náročná a příliš drahá; umožňuje čtení pouze krátkých úseků DNA
Maxam-Gilbertovo sekvenování	Princip metody umožnil rozvíjet nové techniky	Metoda je časově náročná, příliš drahá a považovaná za toxickou; umožňuje čtení pouze krátkých úseků DNA
Sekvenování druhé generace		
Illumina	Metoda je rychlejší ve srovnání s metodami první generace; multiplexování	Umožňuje čtení pouze krátkých úseků DNA
Ion Torrent	Rychlost analýzy; multiplexování	Výskyt chyb během analýzy; umožňuje čtení pouze krátkých úseků DNA
Sekvenování třetí generace		
Pacific Biosciences	Analýza v reálném čase, rychlost, vysoká přesnost, sekvenování dlouhých úseků DNA; umožňuje čtení nativního materiálu	Metoda potřebuje speciální zařízení, protože v dnešní době jsou používanější nástroje pro „short read“ analýzy
Oxford Nanopore	Analýza v reálném čase, rychlost, sekvenování dlouhých úseků DNA; umožňuje čtení nativního materiálu	Vysoký počet chyb; metoda potřebuje speciální zařízení, protože v dnešní době jsou používanější nástroje pro „short read“ analýzy

## 2.5 Možnosti zlepšení současných technik

S každou novou generací technik dekodování DNA metody jsou rychlejší, dostupnější, přesnější a poskytují více analyzovatelného materiálu. Hlavními problémy těchto metod zůstávají směsi DNA, které mohou obsahovat vzorky DNA od různých jedinců, enzymy podporující degradaci nukleových kyselin, inhibitory PCR, náhodná kontaminace nebo chyby při analýze. Příklady uvedené v textu zdůrazňují následující způsoby, jak se těmto komplikacím vyhnout: k analýze směsí DNA lze použít konzervativní mobilní elementy nebo mikrohaplotypy; metody, které umožňují analyzovat přímo nativní vzorek, zabraňují chybám při amplifikaci. Analýzu inhibovaných nebo degradovaných vzorků lze zlepšit použitím PCR pufrů, které zajišťují stabilní pH amplifikační reakce v přítomnosti draselných ( $K^+$ ) a amonných ( $NH_4^+$ ) iontů. Výkonnost testu lze rovněž zlepšit použitím polymeras, které jsou odolné vůči inhibitorům PCR [69].

V textu byla představena jedna z možností zlepšení metod dlouhého čtení – HIFI – technologie pro opakované čtení krátkých úseků dlouhých řetězců, které pomáhají zabraňovat chybám, které jsou vlastní metodám analýzy dlouhých sekvencí [58, 59].

Technologie ONT využívají nové typy sekvenátorů, jako jsou PromethION, BoardION, GridION X5 nebo SmidgION X5, které ve srovnání s MinION poskytují ještě vyšší rychlost sekvenování a větší objem analyzovaných dat. Použití jiných proteinů nanopórů může umožnit pomalejší čtení nukleotidů s přesnějšími výsledky [59, 70].

## **3 DNA DATABÁZE**

Rychlé změny a vývoj metod dekodování profilů DNA vedly k vytvoření standardizovaných a spolehlivých systémů pro uchovávání analyzovaných materiálů. První národní databáze vznikly ve Spojeném království, Evropě a USA.

Databáze DNA jsou sbírky profilů DNA, které byly získány z materiálu osob, jež byly podezřelé ze spáchání trestného činu, přímo se na něm podílely nebo jako neznámé vzorky ze soudních případů. Používají se k identifikaci jedinců na základě profilů DNA získaných z fyzických důkazů jejich porovnáním s existujícími profily v databázi. Databáze poskytují systematizaci shromážděného materiálu a rychlý přístup k potřebným informacím.

V tomto oddíle se budeme zabývat metodami identifikace profilu DNA v případě nepřítomnosti referenčního vzorku. Současně budou diskutovány obtíže spojené s těmito metodami.

### **3.1 Metody identifikace**

Databáze vyžadují sadu standardních genetických STR markerů, které se nejčastěji používají pro typizaci vzorků a které musí být použité všemi zúčastněnými laboratořemi při porovnání vzorků. Kombinovaný indexový systém DNA CODIS v současné době používá 20 autozomálních lokusů STR (A-STR). Profil se nahraje do místní, státní nebo národní sítě, kde se hledá shoda. Navzdory velkému počtu dostupných nahraných profilů v NDIS – National DNA Index System (přibližně 18 milionů) stále existuje velké množství nevyřešených případů vzhledem k poměrně nízkému počtu shod vzorků přímo v databázích (30 – 50 %) [71].

Pro zvýšení pravděpodobnosti identifikace biologického vzorku lze použít profily osob příbuzných ke zkoumanému jedinci, pokud jsou již k dispozici v databázích DNA. K tomuto účelu lze použít metody, jako je analýza DNA v rodině, Y-STR a genetická genealogie (IGG). Vyhledávání lze provádět prostřednictvím databází spravovaných vládou (NDIS), místními (LDIS) nebo soukromými laboratořemi [71, 72].

#### **3.1.1 Analýza DNA v rodině**

Princip této metody spočívá v tom, že příbuzní jedinci, jako jsou rodiče nebo sourozenci, budou mít vyšší počet alel ve zkoumaném lokusu než nepříbuzné osoby. Tato metoda se používá v případech, že neexistuje referenční vzorek, s nímž by bylo možné porovnat studovaný profil – v případech, kdy podezřelý není k dispozici pro porovnání a jeho profil ještě není v databázích. Účelem této metody je tedy najít osobu, která je s pachatelem příbuzná. Použití této analýzy

umožňuje také skutečnost, že většina odsouzených pachatelů trestné činnosti měla příbuzné, kteří se podíleli na trestné činnosti [73].

Analýza DNA rodiny však není hlavní metodou vyhledávání shod. Po získání částečné shody se na jejich základě provádí také analýza Y-haplotypů. Důležité je také vyšetřit příbuzné analyzované osoby, aby se zajistilo, že se jejich DNA nenachází na místě činu [74].

Při tomto typu analýzy se obvykle používá seznam profilů STR doporučený systémem CODIS (20 lokusů) nebo European Standard Set – ESS (16 lokusů) [71].

### **3.1.2 Krátké tandemové opakování Y-chromozomu**

Pokud v databázích neexistují shodné profily, použije se analýza podobných profilů podle stupně příbuznosti. Kandidáti mužského pohlaví s nejpravděpodobnější shodou jsou podrobena testování Y-chromozomu STR (Y-STR) a jejich profily jsou dále prověřovány s ohledem na negenetické informace (například věk). Tato metoda rovněž umožňuje shodu nejen s příbuznými prvního stupně, ale i se vzdálenějšími příbuznými. Kandidáti, kteří nemají podobný profil Y-STR, jsou vyřazeni, čímž se minimalizuje zásah do soukromí. Vzhledem k tomu, že s tímto typem analýzy jsou spojeny etické otázky, měl by být proces přísně regulován a měl by mít přísné požadavky na známost a souhlasná prohlášení účastníků, kteří nejsou zapojeni do trestného činu [73, 74].

### **3.1.3 Genetická genealogie**

Tato metoda se obvykle používá při hledání biologických pozůstatků nebo při řešení tzv. odložených případů. Bohužel STR nemůžou mít vždy dostatečnou vypovídací hodnotu, pokud jde o shody mezi vzorky. K identifikaci vzdálenějších příbuzných nebo například sourozenců, kteří náhodou nesdílejí přibližně 50 % alel, je zapotřebí více markerů. Konzervativní profily SNP se používají k vyhledávání shod na základě ukazatelů, jako je celková délka společných úseků DNA analyzovaných profilů. Tato metoda umožňuje určit příbuznost třetího a vyššího stupně s větší přesností ve srovnání s výše uvedenými metodami [71, 72].

Pro tento typ analýzy existuje několik databází se seznamem profilů SNP, například GEDMatch, Ancestry DNA nebo 23andMe [73].

## **3.2 Komplikace při detekci**

Navzdory výhodám používání databází je s používáním těchto metod spojena řada problémů. Analýza může vést k falešné shodě, protože proces je založen na identifikaci částečných shod.

Akutní je také otázka bezpečnosti a ochrany profilů DNA u případu, kdy neexistuje politika vkládání vzorků do databáze a jejich další analýzy. Používání příbuzenského vyhledávání zvýšilo riziko šíření informací o profilu DNA dané osoby, protože vzorek se může porovnávat i mezi různými databázemi. O etice používání soukromých informací někoho jiného k porovnávání a zjišťování rodinných vazeb se stále aktivně diskutuje. Kromě toho jsou takové výzkumné metody finančně velmi náročné [71, 72].

## ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce byl stručný přehled a porovnání metod analýzy biologických materiálů s použitím biochemických reakcí. Nejprve byly ve studii identifikovány tři hlavní typy biologických tekutin: krev, sperma a sliny. Techniky jejich analýzy byly rozděleny do dvou skupin – presumptivní a potvrzující testy. Větší počet metod umožňuje přesnější analýzu v případech, pro toto téma specifických – odběr materiálů za nestandardizovaných podmínek, jejich malé množství, vliv vnějších faktorů atd. Současně byly navrženy stávající metody, které by dále minimalizovaly nebo odstranily nevýhody spojené se specifikou používání metod.

Velká pozornost byla věnována důležité součásti konfirmačního testování – DNA typizace. V současné době je obtížné nabídnout přesnější metodu identifikace osoby než její vlastní genetický kód. Seznam markerů DNA, podle kterých profil člověka je unikátním a jedinečným, spolu s rychlým tempem objevování a zdokonalování metod jejich dekódování a rozlišování umožnil několikanásobně zkrátit dobu potřebnou k objasnění trestných činů.

Vývoj analytických metod slouží k tomu, aby se do jisté míry předcházelo dalším možným trestným činům. Se zavedením standardizovaného uchovávání profilů DNA za účelem jejich porovnávání se stalo reálnějším identifikovat neznámé lidské ostatky, najít pohřešované osoby nebo vyřešit případy staré mnoho let.

Blahobyt člověka může často záviset na jednání lidí kolem něj. Přestože je velmi nepravděpodobné, že by se podařilo stoprocentně zabránit kriminalitě, došlo v této oblasti k určitému zlepšení ve srovnání s obdobím, například před 30 lety. Neméně důležitá je skutečnost, že v případě spáchání trestného činu příbuzné oběti usilují o spravedlnost a spravedlivý přístup. Existence stávajících metod umožnila snížit počet odložených případů, které nebyly zodpovězeny po celá léta. Pozornost a práce na dalším vývoji technik s biochemickou složkou tak budou mít pozitivní dopad na další snižování kriminality.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. AN, Ja-Hyun; SHIN, Kyoung-Jin; YANG, Woo-Ick a LEE, Hwan-Young, 2012. Body fluid identification in forensics. Online. *BMB Reports*. Roč. 45, č. 10, s. 545-553. ISSN 1976-6696.
2. GAENSSLEN, Robert E. (ed.), 1983. In: Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry: Unit II, Identification of blood. U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, s. 103-105.
3. JAREMKO, Kara L.; PITTS, Abigail; HASCALL, Alexandra; BRISKIE, Alison; REDMOND, Brenna a kol., 2023. Detection of sensitivity and vestigiality of presumptive tests for swabbed blood stains. Online. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. ISSN 1556-2891.
4. VENNEMANN, Marielle; SCOTT, Georgina; CURRAN, Lynn; BITTNER, Felix a TOBE, Shanan S., 2014. Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. Online. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. Roč. 10, č. 1, s. 69-75. ISSN 1547-769X.
5. SLOOTS, James; LALONDE, Wendy; REID, Barbara a MILLMAN, Jonathan, 2017. Kastle–Meyer blood test reagents are deleterious to DNA. Online. *Forensic Science International*. Roč. 281, s. 141-146. ISSN 03790738.
6. MATHESON, Carney D. a VEALL, Margaret-Ashley, 2014. Presumptive blood test using Hemastix® with EDTA in archaeology. Online. *Journal of Archaeological Science*. Roč. 41, s. 230-241. ISSN 03054403.
7. LALONDE, Wendy; MILLMAN, Jonathan S.; BUKOLA, Adams Tajudeen; IMOSE, Omusi Precious; ESEWI, Ayevbomwan Davidson a kol., 2019. Case study: Loss of Kastle-Meyer test specificity on jeans. Online. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Roč. 59, č. 3, s. 359-361. ISBN 1-59259-867-6. ISSN 13550306.
8. STOICA, Bogdan A.; BUNESCU, Sabina; NEAMTU, Andrei; BULGARU-ILIESCU, Diana; FOIA, Liliana a kol., 2016. Improving Luminol Blood Detection in Forensics. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 61, č. 5, s. 1331-1336. ISSN 0022-1198.
9. EKUNDINA, Victor O; OMON, Emmanuel a EJELUE, Chiamaka, 2023. Rape: The Role of Histocytopathologist in Nigeria. Online. *Alq J Med App Sci*. Roč. 6, č. 1, s. 113-126. ISSN 2707-7179.

10. HORJAN, Ivana; BARBARIC, Lucija a MRSIC, Gordan, 2016. Applicability of three commercially available kits for forensic identification of blood stains. Online. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Roč. 38, s. 101-105. ISSN 1752928X.
11. INDEPENDENT FORENSICS, 2016. *Rapid Stain Identification Of Human Blood (RSID™-Blood)*. Online.
12. MAGUIRE, Christopher (ed.), 2013. *FBS03 – ABACard® HemaTrace® Test for the Identification of Human Blood*. Online, PDF. District of Columbia Department of Forensic Sciences.
13. *SERATEC® HemDirect Hemoglobin Assay*, 2009. Online, PDF.
14. GAENSSLEN, Robert E. (ed.), 1983. In: *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry: Unit IX, Translation of Selected Contributions to the Original Literature of Medicolegal Examinations of Blood and Body Fluids*. U.S. Department of Justice, National Institute of Justice, s. 101.
15. MAGUIRE, Christopher (ed.), 2013. *FBS06 – P30 Antigen Test for the Presence of Semen*. Online, PDF. District of Columbia Department of Forensic Sciences.
16. LAUX, Dale L.; TAMBASCO, Anthony J. a BENZINGER, Elizabeth A., 2007. Forensic Detection of Semen II. Comparison of the Abacus Diagnostics OneStep ABACard p30 Test and the Seratec PSA Semiquant Kit for the Determination of the Presence of Semen in Forensic Cases. PDF.
17. SUTTIPASIT, Papanu a WONGWITTAYAPANICH, Surachet, 2018. Detection of prostate specific antigen and semenogelin in specimens from female rape victims. Online. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Roč. 54, s. 102-108. ISSN 1752928X.
18. MAGUIRE, Christopher (ed.), 2013. *FBS05 – Acid Phosphatase Presumptive Chemical Test for the Presence of Semen*. Online, PDF. District of Columbia Department of Forensic Sciences.
19. RESHEF, A.; BARASH, M.; GALLILI, N.; MICHAEL, A. a BRAUNER, P., 2005. The use of acid phosphatase test papers for DNA profiling. Online. Roč. 45, č. 2, s. 97-102. ISSN 13550306.
20. HARDINGE, Patrick; ALLARD, Julie; WAIN, Adrian a WATSON, Stephanie, 2013. Optimisation of choline testing using Florence Iodine reagent, including comparative sensitivity and specificity with PSA and AP tests. Online. Roč. 53, č. 1, s. 34-40. ISSN 13550306.

21. WAWRYK, Jacob a ODELL, Morris, 2005. Fluorescent identification of biological and other stains on skin by the use of alternative light sources. Online. *Journal of Clinical Forensic Medicine*. Roč. 12, č. 6, s. 296-301. ISSN 13531131.
22. ZEFFER, Jennifer Zeffer (ed.), 2014. *FBS07 – Microscopic Examination of Spermatozoa by Christmas Tree Stain*. Online, PDF. District of Columbia Department of Forensic Sciences.
23. OLD, Jennifer; SCHWEERS, Brett A.; BOONLAYANGOOR, Pravat W.; FISCHER, Brian; MILLER, Kevin W. P. a kol., 2012. Developmental Validation of RSID™-Semen: A Lateral Flow Immunochromatographic Strip Test for the Forensic Detection of Human Semen. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 57, č. 2, s. 489-499. ISSN 0022-1198.
24. NEWTON, David E., 2007. *Forensic Chemistry*. Infobase Publishing. Facts on File science library. ISBN 1438109768.
25. GUNN, Alan, 2019. *Essential Forensic Biology*. Online. 3. John Wiley. ISBN 978-1-119-14140-2.
26. NANDA, KanwarDeep Singh; RANGANATHAN, K; UMADEVI, KM a JOSHUA, Elizabeth, 2011. A rapid and noninvasive method to detect dried saliva stains from human skin using fluorescent spectroscopy. Online. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. Roč. 15, č. 1. ISSN 0973-029X.
27. CASEY, David G. a PRICE, Judy, 2010. The sensitivity and specificity of the RSID™-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland. Online. *Forensic Science International*. Roč. 194, č. 1-3, s. 67-71. ISSN 03790738.
28. SAITO, Koichi; SONODA, Akihiro; ITO, Rie a AKIYAMA, Hiroshi, 2023. Development of the ultra-weak chemiluminescence method based on luminol reaction for use in the detection of ultra-trace levels of blood. Online. *Analytical Sciences*. Roč. 39, č. 2, s. 163-168. ISSN 0910-6340.
29. DICARLO, Alicia a JASRA, Shashi, 2016. A qualitative evaluation of the effect cleaning products have on the Bluestar test for latent blood. *Journal of Emerging Forensic Sciences Research*. Online.
30. DILBECK, Lisa, 2006. Use of Bluestar forensic in lieu of luminol at crime scenes. *Journal of Forensic Identification*. Roč. 56, č. 5, s. 706-720.
31. ADAMS, Joshua L.; RANCOURT, Emily D. a CHRISTENSEN, Angi M., 2019. The Effect of Household Oxidizing Cleaners on Chemiluminescence of Blood Using Bluestar ®. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 64, č. 3, s. 869-872. ISSN 0022-1198.

32. BERÁNEK, Martin, 2016. Molekulární genetiky pro bioanalytiku. Praha: Karolinum. ISBN 978-802-4632-247.
33. LEE, Steven B. a SHEWALE, Jaiprakash G., 2017. Encyclopedia of Analytical Chemistry: DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. Online. S. 1-11. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1104m>
34. KAMPMANN, Marie-Louise; Tfelt-Hansen, Jacob a Børsting, Claus, 2024. Cleaning protocols in forensic genetic laboratories. Online. *International Journal of Legal Medicine*. ISSN 0937-9827.
35. Sobrino, Beatriz; Carracedo, Angel; Reid, Barbara; Millman, Jonathan; López-Guerrero, José Antonio a kol., 2004. SNP Typing in Forensic Genetics: A Review. Online. *Forensic DNA Typing Protocols*. Roč. 281, č. 6, s. 107-126. ISBN 1-59259-867-6. ISSN 03790738.
36. Sobrino, Beatriz; Brión, María a Carracedo, Angel, 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Online. *Forensic Science International*. Roč. 154, č. 2-3, s. 181-194. ISSN 03790738.
37. Fan, Hao a Chu, Jia-You, 2007. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. Online. Roč. 5, č. 1, s. 7-14. ISSN 1672-0229.
38. Udogadi, Nwawuba Stanley; AbdullaHI, Mohammed Khadija; Bukola, Adams Tajudeen; Imose, Omusi Precious; ESEWI, Ayeubumwan Davidson a kol., 2020. Forensic DNA Profiling: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation. Online. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. Roč. 27, č. 4, s. 22-35. ISBN 1-59259-867-6. ISSN 1394195X.
39. Walsh, Simon J; AbdullaHI, Mohammed Khadija; Bukola, Adams Tajudeen; Imose, Omusi Precious; ESEWI, Ayeubumwan Davidson a kol., 2014. Recent advances in forensic genetics: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation. Online. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Roč. 4, č. 1, s. 31-40. ISBN 1-59259-867-6. ISSN 1473-7159.
40. Jeffreys, Alec J.; Wilson, Victoria; Neumann, Rita a Keyte, John, 1988. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. Online. *Nucleic Acids Research*. Roč. 16, č. 23, s. 10953-10971. ISSN 0305-1048.
41. Benecke, Mark; Hackman, Lucina a Haddrill, Penelope R., 1997. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. Online. *Naturwissenschaften*. Roč. 84, č. 5, s. 181-188. ISSN 0028-1042.

42. BRIGHT, Jo-Anne; KELLY, Hannah; KERR, Zane; MCGOVERN, Catherine; TAYLOR, Duncan a kol., 2020. The interpretation of forensic DNA profiles: an historical perspective. Online. *Journal of the Royal Society of New Zealand*. Roč. 50, č. 2, s. 211-225. ISSN 0303-6758.
43. SCHNEIDER, Peter M, 1997. Basic issues in forensic DNA typing. Online. *Forensic Science International*. Roč. 88, č. 1, s. 17-22. ISSN 03790738.
44. DAEID, Niamh Nic; HACKMAN, Lucina a HADDRILL, Penelope R., 2021. Developments in forensic DNA analysis. Online. *Emerging Topics in Life Sciences*. Roč. 5, č. 3, s. 381-393. ISSN 2397-8554.
45. TAMAKI, Keiji; JEFFREYS, Alec J. a HADDRILL, Penelope R., 2005. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing: a current survey. Online. *Legal Medicine*. Roč. 7, č. 4, s. 244-250. ISSN 13446223.
46. DAEID, Niamh Nic; HACKMAN, Lucina a SYNDERCOMBE COURT, Denise, 2021. The Y chromosome and its use in forensic DNA analysis. Online. *Emerging Topics in Life Sciences*. Roč. 5, č. 3, s. 427-441. ISSN 2397-8554.
47. KIDD, K.K.; PAKSTIS, A.J.; SPEED, W.C.; LAGACE, R.; CHANG, J. A kol., 2013. Microhaplotype loci are a powerful new type of forensic marker. Online. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Roč. 4, č. 1, s. e123-e124. ISSN 18751768.
48. RAY, David A.; WALKER, Jerilyn A. a BATZER, Mark A., 2007. Mobile element-based forensic genomics. Online. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Roč. 616, č. 1-2, s. 24-33. ISSN 00275107.
49. PANNEERCHELVAM, S. a NORAZMI, M. N., 2003. Forensic DNA Profiling and Database. Online. *The Malaysian journal of medical sciences*. Roč. 10, č. 2, s. 20-26.
50. KEERTI, Akshunna; NINAVE, Sudhir; WU, Qiushuo; ZHENG, Yazhi; LIU, Guihong a kol., 2024. DNA Fingerprinting: Use of Autosomal Short Tandem Repeats in Forensic DNA Typing. Online. *Cureus*. Roč. 71. ISSN 2168-8184.
51. PAUN, Ovidiu a SCHÖNSWETTER, Peter, 2012. Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. Online. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding. Methods in Molecular Biology*. S. 75-87. ISBN 978-1-61779-608-1.
52. The Polymerase Chain Reaction: An Overview and Development of Diagnostic PCR Protocols at the LCDC, 1991. Online. *Canadian Journal of Infectious Diseases*. Roč. 2, č. 2, s. 89-91. ISSN 1180-2332.

53. MCDONALD, Caitlin; TAYLOR, Duncan; LINACRE, Adrian; PARVEEN, Rukhsana a HUSSAIN, Manzoor, 2024. PCR in Forensic Science: A Critical Review. Online. *Genes*. Roč. 15, č. 4. ISSN 2073-4425.
54. ARTIKA, I Made; DEWI, Yora Permata; NAINGGOLAN, Ita Margaretha; SIREGAR, Josephine Elizabeth a ANTONJAYA, Ungke, 2022. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. Online. *Genes*. Roč. 13, č. 12. ISSN 2073-4425.
55. NASSIRI, Mohammadreza; ELAHI TORSHIZI, Mahdi; GHOVVATI, Shahrokh a DOOSTI, Mohammad, 2018. Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in silico approach for analysis of real-time PCR data. Online. *Journal of Applied Statistics*. Roč. 45, č. 2, s. 306-319. ISSN 0266-4763.
56. VRANEŠ, Miroslav; SCHERER, Mario a ELLIOTT, Keith, 2017. Development and validation of the Investigator® Quantiplex Pro Kit for qPCR-based examination of the quantity and quality of human DNA in forensic samples. Online. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Roč. 6, s. e518-e519. ISSN 18751768.
57. HARREL, Michelle a HOLMES, Amy S., 2022. Review of direct PCR and Rapid DNA approaches to streamline sexual assault kit testing. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 67, č. 4, s. 1336-1347. ISSN 0022-1198.
58. HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin a KIRK, Paul L., 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. Online. *Genomics*. Roč. 107, č. 1, s. 1-8. ISSN 08887543.
59. KCHOUK, Mehdi; GIBRAT, Jean Francois a ELLOUMI, Mourad, 2017. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. Online. *Biology and Medicine*. Roč. 09, č. 03. ISSN 09748369.
60. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R.; ZHENG, Yazi; LIU, Guihong a kol., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors: Use of Autosomal Short Tandem Repeats in Forensic DNA Typing. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 74, č. 12, s. 5463-5467. ISSN 0027-8424.
61. SANGER, F.; COULSON, A.R.; WU, Qiushuo; ZHENG, Yazi; LIU, Guihong a kol., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase: Use of Autosomal Short Tandem Repeats in Forensic DNA Typing. Online. *Journal of Molecular Biology*. Roč. 94, č. 3, s. 441-448. ISSN 00222836.

62. MAXAM, A M a GILBERT, W, 1977. A new method for sequencing DNA. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 74, č. 2, s. 560-564. ISSN 0027-8424.
63. ANDERSON, Matthew W. a SCHRIJVER, Iris, 2010. Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine. Online. *Genes*. Roč. 1, č. 1, s. 38-69. ISSN 2073-4425.
64. PAREEK, Chandra Shekhar; SMOCZYNSKI, Rafal a TRETYN, Andrzej, 2011. Sequencing technologies and genome sequencing. Online. *Journal of Applied Genetics*. Roč. 52, č. 4, s. 413-435. ISSN 1234-1983.
65. GUPTA, Nidhi a VERMA, Vijay K., 2019. Next-Generation Sequencing and Its Application: Empowering in Public Health Beyond Reality. Online. *Microbial Technology for the Welfare of Society. Microorganisms for Sustainability*. S. 313-341. ISBN 978-981-13-8843-9.
66. VOELKERDING, Karl V; DAMES, Shale A a DURTSCHI, Jacob D, 2019. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. Online. *Clinical Chemistry. Microorganisms for Sustainability*. Roč. 55, č. 4, s. 641-658. ISBN 978-981-13-8843-9. ISSN 0009-9147.
67. RHOADS, Anthony a AU, Kin Fai, 2015. PacBio Sequencing and its Applications. Online. Roč. 13, č. 5, s. 278-289. ISSN 1672-0229.
68. SAPAN, Veysel; SIMSEK, Sumeyye Zulal; FILOĞLU, Gonul a BULBUL, Ozlem, 2024. Forensic DNA phenotyping using Oxford Nanopore Sequencing system. Online. *ELECTROPHORESIS*. ISSN 0173-0835.
69. MULERO, Julio J.; CHANG, Chien Wei; LAGACÉ, Robert E.; WANG, Dennis Y.; BAS, Jennifer L. a kol., 2008. Development and Validation of the AmpF $\ell$ STR $\text{®}$  MiniFiler $\text{TM}$  PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 53, č. 4, s. 838-852. ISSN 0022-1198.
70. BRUNO, Aimeric; AURY, Jean-Marc a ENGELLEN, Stefan, 2021. BoardION: real-time monitoring of Oxford Nanopore sequencing instruments. Online. *BMC Bioinformatics*. Roč. 22, č. 1. ISSN 1471-2105.
71. GE, Jianye a BUDOWLE, Bruce, 2021. Forensic investigation approaches of searching relatives in DNA databases. Online. *Journal of Forensic Sciences*. Roč. 66, č. 2, s. 430-443. ISSN 0022-1198.
72. GARCÍA, Óscar; CRESPILO, Manuel a YURREBASO, Iñaki, 2017. Suspects identification through “familial searching” in DNA databases of criminal interest. Social,

ethical and scientific implications. Online. *Spanish Journal of Legal Medicine*. Roč. 43, č. 1, s. 26-34. ISSN 24454249.

73. MATEEN, Rana Muhammad; SABAR, Muhammad Farooq; HUSSAIN, Safdar; PARVEEN, Rukhsana a HUSSAIN, Manzoor, 2021. Familial DNA analysis and criminal investigation: Usage, downsides and privacy concerns. Online. *Forensic Science International*. Roč. 318. ISSN 03790738.
74. KAYSER, Manfred, 2017. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. Online. *Human Genetics*. Roč. 136, č. 5, s. 621-635. ISSN 0340-6717.