

Jiří Drábek, ed.



Vydavatelství
Univerzity
Palackého

VYBRANÉ METODY FORENZNÍ GENETIKY



Univerzita Palackého v Olomouci

VYBRANÉ METODY FORENZNÍ GENETIKY

Jiří Drábek, ed.

Olomouc 2022

Recenzenti:

kpt. Mgr. Barbora Křenková (ORCID 0000-0002-2318-6587)

kpt. Mgr. Pavel Tomek, PhD.

Autoři:

Alena Jurčeková, Jana Nováčková, Jana Stránská, Jana Vrbková,

Jiří Drábek, Karolína Bartáková, Lucie Kotková, Markéta Dajbychová,

Rastislav Slavkovský, Tomáš Pexa, Vlastimil Stenzl

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

1. vydání

Editor © Jiří Drábek (ORCID 0000-0002-5747-6478), 2022

Autoři © Alena Jurčeková, Jana Nováčková, Jana Stránská

(ORCID 0000-0003-2777-1262), Jana Vrbková (ORCID 0000-0002-7830-3058),

Jiří Drábek (ORCID 0000-0002-5747-6478), Karolína Bartáková

(ORCID 0000-0002-1489-6966), Lucie Kotková (ORCID 0000-0001-7228-7512),

Markéta Dajbychová (ORCID 0000-0001-5344-5263), Rastislav Slavkovský

(ORCID 0000-0001-9600-0627), Tomáš Pexa, Vlastimil Stenzl

(ORCID 0000-0001-5711-4859), 2022

Ilustrace diagramů © Jana Stránská

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2022

DOI: 10.5507/lf.22.24461779

ISBN 978-80-244-6177-9 (online: ipdf)

Obsah

Kapitola 1:

DNA ve srovnání s jinými forenzními markanty	5
JIŘÍ DRÁBEK	

Kapitola 2:

Sestavení profilů DNA analýzou STR lokusů – jejich využití pro identifikaci osob nebo určování příbuzenských vztahů	37
TOMÁŠ PEXA, JIŘÍ DRÁBEK	

Kapitola 3:

Identifikace neznámého zvířecího druhu	52
MARKÉTA DAJBYCHOVÁ	

Kapitola 4:

Analýza kontrolní oblasti mtDNA využitím masivně paralelního sekvenování	68
JANA NOVÁČKOVÁ, VLASTIMIL STENZL, ALENA JURČEKOVÁ	

Kapitola 5:

Detekce metylace pyrosekvenováním pro stanovení biologického věku	85
---	----

JANA STRÁNSKÁ, KAROLÍNA BARTÁKOVÁ

Kapitola 6:

Fenotypování DNA a predikce věku z krve	106
---	-----

LUCIE KOTKOVÁ, RASTISLAV SLAVKOVSKÝ, JANA VRBKOVÁ, JIŘÍ DRÁBEK

Resumé	132
--------	-----

Summary	133
---------	-----

Seznam literatury	134
-------------------	-----

Seznam obrázků	145
----------------	-----

Seznam tabulek	147
----------------	-----

Kapitola 1:

DNA ve srovnání s jinými forenzními markanty

Jiří Drábek

Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc
Československá společnost pro forenzní genetiku, z. s., Olomouc
4BIN, Olomouc

Vývoj metod přímého testování DNA za účelem forenzní identifikace začal v roce 1984, kdy si prof. Alec Jeffreys uvědomil možnosti využití specifického typu polymorfismu v lidském genomu – variabilního počtu tandemových repetitiv (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR, minisatelity) – k identifikaci osob. V anglickém hrabství Leicestershire byly v letech 1983 a 1986 znásilněny a zavražděny dvě dívky. Jeffreys zanalyzoval VNTR ze stop z místa činu a VNTR u slaboduchého muže, který se k jedné z vražd doznal. Restrikčním štěpením DNA na několika polymorfních lokusech zároveň, elektroforetickou separací a radioaktivní detekcí (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) dosáhl výsledku, který vedl k vyvinění tohoto muže. Následovalo slepé testování všech potenciálně podezřelých mužů z okolí zločinu (genetický zátah, anglicky DNA dragnet). RFLP technikou byl nakonec

identifikován skutečný pachatel Colin Pitchfork, který na sebe upoutal pozornost tím, že za sebe na testy poslal svého kamaráda. Kamarád však nedokázal držet jazyk za zuby a v hospodě se svým záskokem pochlubil. Genotypizační metody tím vstoupily na scénu forenzních technik (1–3). Pro svou vysokou diskriminační sílu, srovnatelnou jen s daktyloskopií, dostaly přirovnání „DNA otisky prstů“ (anglicky DNA fingerprinting). Toto mediální přirovnání je však v některých ohledech zavádějící, a proto se přešlo k přesnějšímu názvu „profilování DNA, anglicky DNA profiling“. DNA má oproti jiným markantům kromě vysoké diskriminační síly několik dalších výhod:

- ▶ je přítomna (s výjimkou červených krvinek a krevních destiček) v každé lidské buňce,
- ▶ v průběhu života se nemění,
- ▶ umožňuje určit příbuznost,
- ▶ dá se zjistit i z mikrostop a stop latentních,
- ▶ falšování profilu DNA vyžaduje expertní znalosti a vybavení¹,
- ▶ má dobře propracované pravděpodobnostní modely k logickému vyhodnocení síly důkazu,
- ▶ existují sdílené databáze DNA profilů zločinců.

Ze všech těchto důvodů se stala pilířem současné kriminalistické praxe nejen u závažných trestných činů.

Za třicet let používání došlo v genotypizačních technikách k vývoji. Nejprve byla RFLP metoda nahrazena technikami rozlišujícími délkové polymorfismy typu krátkých tandemových repetit, Short Tandem Repeats (STR), které nevyžadují tak velké množství nedegradované vstupní DNA a jsou lépe standardizovatelné. V současné době probíhá postupný přechod na metody masivně paralelního sekvenování, o čemž bude napsáno více v kapitole 4 a 6 této knihy (4, 5). Zároveň byly poznány limity genotypizačních metod a stanoveny požadavky pro zacházení

¹ Nesmíme však zapomenout, že ani DNA není úplně rezistentní vůči klasickým snahám o znehodnocení důkazů, jako je podvržení vzorku, sanace místa činu prostředkem ničícím veškerou DNA, zpochybnění neporušenosti důkazního řetězce (*chain of custody*).

s genetickými stopami na místě činu i v laboratoři, aby síla důkazu byla maximalizována.

Důkazy DNA obecně mohou pomoci:

1. **určit pohlaví** původce stopy, kdy se využívá rozdílů mezi chromozómem X a Y,
2. **zjistit příbuznost** mezi osobami, což nemusí být omezeno jen na tu nejčastější forenzně testovanou příbuznost – vyšetření otcovství, ale vztahuje se například i na identifikaci obětí hromadných katastrof nebo forenzní genealogii, kdy se genomicky otypovaná DNA přiřadí konkrétní osobě za využití tradičního sestavování rodokmenu (6–8),
3. **prokázat, že dva vzorky pocházejí ze stejného zdroje** – ze stejného genetického individua. Srovnání DNA vzorku z místa činu a vzorku kontrolního, referenčního, porovnávacího (nebo vzorků ze dvou různých míst trestného činu) může sloužit jako silný důkaz, že se daná osoba vyskytovala na daném místě, nebo že daná osoba manipulovala s předmětem,
4. **odhalit** další trestný čin **recidivisty**, pokud se jeho profil DNA dostal do kriminalistické DNA databáze (někdy nazývané nepřesně Národní DNA databáze). Včasné odhalení zločince a jeho odsouzení vede k znemožnění dalšího páchání trestné činnosti.

Genetické zákony jsou univerzální (9), proto lze profilovat také DNA **rostlin** (10), když je nutné identifikovat konkrétní rostlinu, případně kultivar. Profilováním lze určit sukcesi nekrofágního **hmyzu** (11) a tak pomoci vymezit okamžik smrti člověka rychleji než tradičními entomologickými postupy (entomolog musí čekat až se vajíčko nebo larva vyvine do stadia dospělce, kdežto PCR nemusí čekat na nic). Lze profilováním určit druh a napomoci identifikovat konkrétního živočicha, který při pokousání člověka zanechal v ráně své sliny, nebo **mikroorganismus**, u kterého lze za využití evolučních principů vysledovat vzorec epidemického šíření a najít primární zdroj nákazy. Profil DNA mikroorganismů může také charakterizovat místo činu (12) nebo, možná překvapivě a ne při standardním vyšetření, napomoci rozlišit jedno- a dvojčata (13). Výčet situací, kdy je profilování DNA aplikováno

na ne-lidskou DNA se stále rozšiřuje. Z dalších častých aplikací zmiňme například detekci DNA ve výrobcích ze slonoviny, která se nesmí komerčně zpracovávat, DNA chráněných papoušků v pašovaných vajících (14), DNA chráněných druhů zvěře na jídelníčku restaurací (15) nebo DNA jiker chráněných ryb v kaviáru (16). Zvířecí forenzní genetika přejímá standardy lidské forenzní genetiky a následuje doporučení International Society for Forensic Genetics (ISFG) a International Society for Animal Genetics (ISAG) (17).

Genotyp (zde ve významu: soubor veškerých genetických informací, týkající se zkoumaného znaku či znaků) do určité míry předurčuje **fenotyp**, vyjádření genetické informace na viditelné úrovni (vnější znaky, Externally Visible Characteristics). Začínají se objevovat komerčně nabízené typizační soupravy, které podle genotypu dokáží odhadnout pravorukost/levorukost, předčasnou ztrátu vlasové pokrývky hlavy, barvu očí (18), vlasů (19), kůže nebo biogeografický původ, popřípadě etnikum (20). Genetická fenotypizace se neomezuje jen na lidi. Na DNA úrovni lze odhadnout například i psí fenotyp, co se týče barvy a typu srsti, velikosti těla, tvaru ucha a tvaru ocasu (21).

U různých geneticky podmíněných znaků je různá úroveň mezigenové interakce a environmentálních vlivů (jako je výživa matky v těhotenství, vystavení se radioaktivnímu a slunečnímu záření, prodělaná očkování, historie mikrobiologické zátěže) a vliv náhody. Obecně však platí, že síla fenotypizačního DNA důkazu je mnohem nižší než síla DNA genotypizačního důkazu a přínos tohoto typu vyšetření ke kriminalistické praxi je spíše **v operativní** fázi vyšetřování a ne ve fázi **usvědčování**. Navíc, je liché očekávání, že genetika odhalí predispozici osoby stát se zločincem nebo obětí.

Profilování **RNA**, testování meziprojektu přenosu genetické informace z DNA do proteinu, může přinést informaci o typu tkáně, ze které pochází biologický materiál (22) (ovšem najít například dobrý biomarker pro vaginální sekret, který by nereagoval zkříženě jako biomarker krve, je velmi obtížné), o denní době v okamžiku zanechání stopy (testuje se aktuální exprese genetické informace, například cirkadiální biomarkery melatonin a kortizol pro den a noc) nebo o prodlení od za-

necháání stopy po okamžik jejího zajištění podle diferenciální degradace jednotlivých mRNA. Je potřeba neustále myslet na to, že RNA degraduje rychleji než DNA, protože RNázy jsou všudypřítomné. Výjimkou je třída krátkých RNA s regulační funkcí – mikroRNA, která má ve forenzní praxi potenciál pro určení typu tělní tekutiny nebo tkáně, protože je velmi stabilní (23).

Epigenetika je studium vratných dědičných změn vyjádření genetické informace beze změny DNA sekvence, jen metylační změnou cytosinů v DNA nebo metylací, acetylací a deacetylací histonů. Týká se například inaktivace jednoho z X chromozomů ženy v každé buňce (lyonizace) nebo iniciace nádorového bujení. **Epigenetické profilování** se zaměřuje na testování metylace cytosinů v ostrůvcích bohatých na cytosin a guanin a může podobně jako profilování RNA přinášet dynamickou informaci o aktivních částech genomu. Forenzní využití se prozatím soustřeďuje na identifikaci tkáně (24) a odhad věku (25, 26), jak je popsáno v posledních dvou kapitolách této knihy, ale potenciál je širší (27).

Na genetické úrovni jsou mezi jednotlivými nepříbuznými osobami jen drobné rozdíly v posloupnosti nukleotidů. Tyto rozdíly jsou dvou hlavních typů.

Zprv se jedná o **bodový polymorfismus** (SNP, anglicky Single Nucleotide Polymorphism nebo SNV, Single Nucleotide Variant), kdy jediný nukleotid může na daném místě genomu nabývat dvou, tří nebo až čtyř forem (A, C, T, G). Nemusí jít o změnu jen jediného nukleotidu – kupříkladu v extrémně variabilní oblasti na šestém chromozomu, v oblasti hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, Major Histocompatibility Complex, u člověka zvaného HLA, Human Leukocyte Antigens) se jednotlivé alely navzájem liší v celých dlouhých segmentech DNA.

Bodový polymorfismus se vyskytuje na autozomech (nepohlavních chromozomech 1 až 22), gonozomech (pohlavních chromozomech X a Y) i v mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA (mtDNA) patří spolu s STR markery na chromozómu Y k rodovým markerům, které mají ve forenzní genetice nezastupitelnou úlohu (sekvenování mtDNA

u silně degradovaných vzorků, profilování DNA mikrosatelitů na chromozómu Y u znásilnění s nadbytkem ženského materiálu ve vzorku) (28). Zde jen zmíním, že mtDNA se vyskytuje v mnoha kopiích v organelách s energetickou funkcí, zvaných mitochondrie. Samotných mitochondrií jsou v každé buňce obvykle stovky až tisíce kopií (v lidském oocytu 100 000, ve spermiu jen 60, ve svazech se počet liší podle trénovanosti a aktuální potřeby energie). V každé mitochondrii je 1 až 10 kopií mtDNA, takže vyšetření mtDNA může poskytnout informaci i v těch případech, kde vyšetření znaků na autozomech a gonozomech selhalo (například pro vysoký stupeň degradace materiálu). Frekvence mutací je u mitochondrií 10–20× vyšší než u jaderné DNA, takže se často setkáváme s jevem zvaným **heteroplazmie**, kdy se v tkáni nebo v jednotlivé buňce vyskytuje smíšená populace variant mtDNA. O vyšetření mtDNA pojednávají kapitoly 3 a 4 této knihy.

Zadruhé se jedná o **délkový polymorfismus**, kdy se lidé mezi sebou liší v délce fragmentu DNA vymezené zleva i zprava nějakou konstantní sekvencí. Délkový polymorfismus je způsoben přítomností delece, inserce nebo variability v počtu repetice. Repetice lze rozlišit podle prostorového uspořádání na tandemové a roztroušené. Podle délky opakující se jednotky je rozlišujeme na mikrosatelity (2 až 10 nukleotidů, forenzně nejpoužívanější jsou tetranukleotidové; například *CSFIPO*), minisatelity (10 až 1000 nukleotidů, používal je Jeffreys (2, 3); například *DIS80*, *D2S90*), satelity (1000 až 5000 nukleotidů, forenzně se nepoužívají, protože jejich analýza vyžaduje intaktní DNA; například retropoziční virové sekvence SINE, LINE, LTR), CNV – anglicky Copy Number Variations (5 000 až 10 000 000 nukleotidů, zatím forenzně nevyužité; užívány klinicky, například se testuje amplifikace genu *EGFR* u nemalobuněčného nádoru plic pro nastavení biologické léčby).

Nejpopulárnějším polymorfismem ve forenzní praxi jsou zatím mikrosatelity.

Mikrosatelity

Mikrosatelity, krátké tandemové repetice (STR, Short Tandem Repeats, zvané též Simple Sequence Repeats /SSR/), mají vysokou diskriminační sílu, lze je kombinovat v jediné zkumavce do multiplexní reakce, jsou celosvětově standardizované a databázované. Pokud je vstupní materiál analyzovatelný a vyšetření provedeno odpovídajícím způsobem, poskytují STR výsledek s minimalizovanou možností subjektivity při interpretaci (což je výhodou ve srovnání s VNTR).

Přes veškeré výhody při použití mikrosatelitů zůstávají určitá omezení genotypizace: profilováním DNA nedokážeme od sebe rozlišit jednovaječná dvojčata², určit stáří vzorku nebo stáří organismu. Pokud je vzorek nedostačující, degradovaný nebo smíšený (směsný), může se stát, že STR poskytne slabý soudní důkaz nebo neposkytne relevantní důkaz vůbec.

Příkladem mikrosatelitu je dinukleotidová repetice CTCTCTCTCTCT, která může být zkráceně zapsána jako (CT)₆, nebo tetranukleotidová repetice ACTCACTCACTCACTC, zapsaná jako (ACTC)₄. Pro současnou forenzní praxi byly vybrány takové mikrosatelity, jejichž alely nejsou natolik dlouhé, aby jejich typizace byla ohrožena u degradovaných vzorků, mají vysokou úroveň heterozygoty, nejsou navzájem ve vazbě, chovají se způsobně v multiplexu, mají nízkou úroveň zadržování neboli stutteru (viz níže) a nízkou frekvenci mutací. Vybrané mikrosatelity nejsou přítomny v kódující sekvenci a byly pro forenzní účely vybrány tak, aby nebyly ve vazbě s nemocemi, tedy aby kromě individualizačních údajů neodhalovaly zároveň i další citlivé zdravotní informace. Forenzní profilování DNA tvoří do určité míry výjimku z citlivých dat dle pohledu Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/679 ze dne 27. dubna 2016 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů a o zrušení směrnice 95/46/ES (Obecné nařízení o ochraně osobních údajů), zkráceně General

² I když možnosti lze jsou – *de novo* SNP, retrotranspozice a CNV, epigenetické rozdíly, rozdíly v přeskupení VDJC subgenů u buněk imunitního systému, nebo přítomnost virových parazitů.

Data Protection Regulation, GDPR. Většina evropských zemí má specifický zákon o kriminalistické databázi DNA, kde je nastaveno, jaké profily DNA do databáze patří, jaké fenotypové osobní charakteristiky lze testovat, kdy je povoleno vyhledávání příbuzných v databázi (*familial search*), jak se uchovávají a skartují profily DNA a jak se archivují a ničí vzorky DNA. V České republice takový speciální zákon nemáme a vše je řízeno pokyny policejního prezidenta nebo obecnějšími zákony, týkajícími se DNA.

Existují také mikrosatelity, které jsou pro forenzní účely méně vhodné, neboť:

1. v případě nádorového onemocnění nesplňují podmínku neměnnosti v průběhu života – dochází u nich ke ztrátě jedné z alel (ke ztrátě heterozygosity, anglicky LOH, Loss of Heterozygosity) nebo ke změně alely zadržáváním, tedy mutačním procesem spočívajícím v prokluzu polymerázy (viz níže),
2. jsou ve vazbě s geny zodpovědnými za dědičná onemocnění,
3. generují ve velké míře elektroforetické artefakty,
4. nejsou dostatečně variabilní.

Obecně se mikrosatelity kromě forenzních aplikací a vazebních studií používají pro studie evoluční a konzervační (konzervace ve smyslu uchování genetického dědictví). Jejich relativně vysoká mutační rychlost v průběhu evoluce člověka umožňuje testováním populací nalézt informaci o substruktuře populace, genetickém driftu, populačním efektu hrdla láhve, o nejbližším společném předkovi nebo o možnostech záchrany vymírajícího druhu.

Konkrétní formy mikrosatelitů, alely, se liší počtem opakování základního motivu. Genotyp, zapsaný podle genetické nomenklatury jako *D5S818**7/8, *D5S818* 7, 8, *D5S818* 7, 8, popisuje osobu, která zdělila po svých rodičích na lokusu *D5S818* alelu o délce 7 repetice a alelu o délce 8 repetice. Z genotypu nelze poznat, která alela pochází od otce, a která od matky. Mikrosatelit se určuje dle kódujícího řetězce první sekvence daného lokusu, umístěné do databáze GenBank. První výskyt opakování motivu při čtení zleva doprava se započítává jako první repetice.

„D“ v názvu mikrosatelitu odpovídá DNA, 5 odpovídá 5. chromozómu, S odpovídá unikátní sekvenci v celém genomu a číslo 818 registraci segmentu v International Genome Database (GDB), což odkazuje na pořadí na chromozomu, měřeno od centromery. Mikrosatelity, které se používaly před zavedením nomenklatury (29, 30), si zachovaly svůj původní název – například *TH01* je mikrosatelit v intronové sekvenci genu pro tyrosin hydroxylázu.

Neúplné repetiční motivy, mikrovariantní alely neboli mikrovarianty, se nazývají dle počtu úplných repetit, následovaných tečkou a počtem nukleotidů neúplné repetice. Například *TH01* alela 9.3 má devět repetit AATG a jednu neúplnou repetici ATG (31). Vyšetření profilu DNA pomocí PCR a kapilární elektroforézy odhaluje jen délku repetice. Sekvenování nebo analýza pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOFF) může odhalit další úroveň polymorfismu – konkrétní nukleotidové složení repetit při jejich stejném počtu (32).

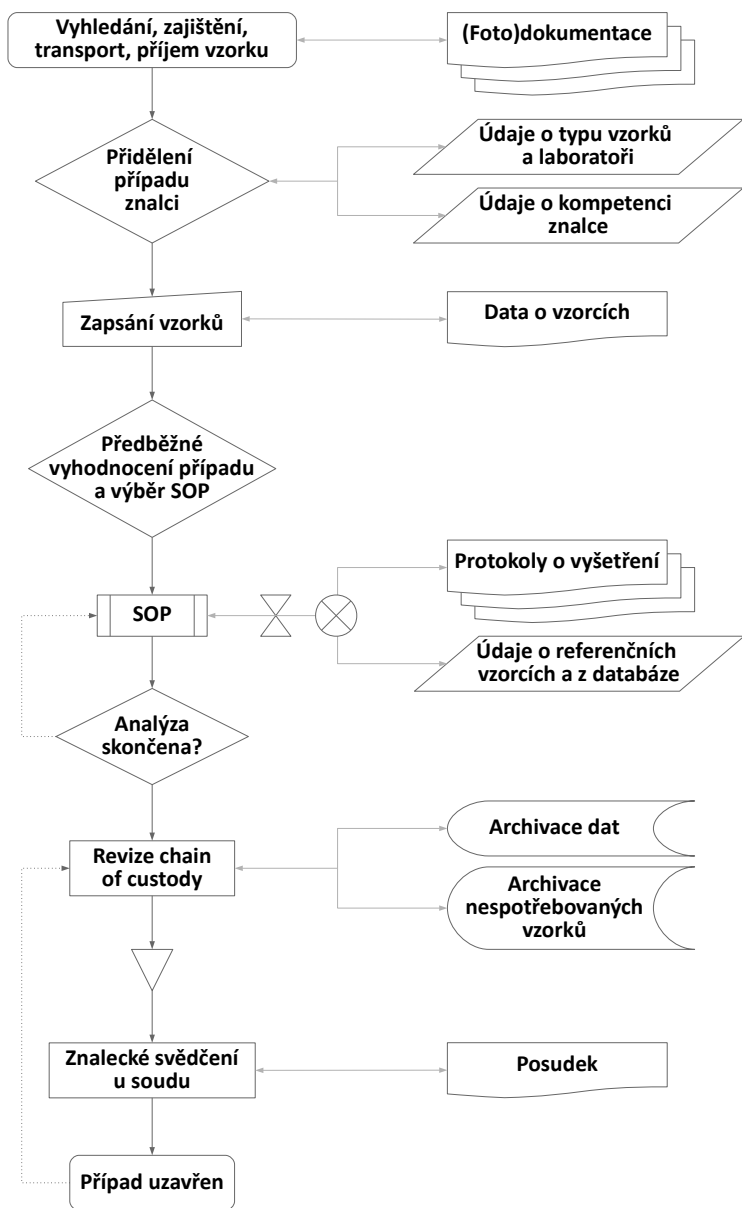
Jak probíhá vyšetření profilováním DNA

Každý krok důkazního řetězce je stejně důležitý, protože řetězec je tak silný, jako je jeho nejslabší článek (► **obr. 1**). Například útoky na důkazy DNA ze strany obhajoby v americké soudní praxi jsou v současné době cílené zejména na procesní zacházení s důkazní položkou a doprovázející dokumentaci, protože biologickou podstatu síly důkazů DNA (za splnění určitých podmínek) už nikdo nezpochybňuje.

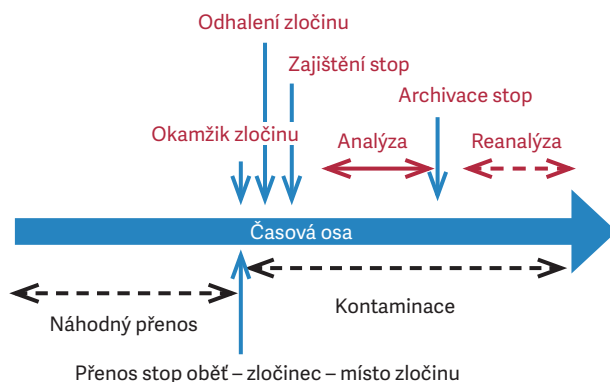
Získání a skladování vzorku

Každá jaderná buňka obsahuje DNA, takže jakýkoliv biologický materiál na místě činu je potenciálním zdrojem profilu DNA. Podle Locarda každý kontakt zanechává stopu, takže šance nalézt na místě činu biologický materiál pachatele nikdy není nulová (► **obr. 2**).

Nejčastěji na místě závažného trestného činu činu nacházíme krev (ve které jsou bílé krvinky s jadernou DNA) a sperma (kde je jaderná DNA lokalizována v hlavičce spermií). Na místech nenásilných trestných činů se mnohdy musíme spokojit s vlasy a chlupy (DNA ve fo-



Obř. 1 Procesní kroky při analýze DNA z místa činu



Obr. 2 Schematické umístění zásadních procesů
ohledně zkoumání místa činu na časovou osu

likulech), buňkami kožního nebo endotelového epitelu (které mohou být nalezeny v lupech, slinách, moči, exkrementech, zvracích), apoptotickými buňkami z potu nebo zrohovatělé kůže (33). Srovnávací vzorek od podezřelé osoby se získává bukláním stěrem nebo sběrem slin s uvolněnými buňkami endotelu, raději než invazivním odběrem periferní krve nebo stříháním nehtů.

Vysoká citlivost analýzy DNA je dvojsečná zbraň – nese s sebou reálné riziko kontaminace stopy jiným zdrojem biologického materiálu, možnost sekundárního i terciárního přenosu (34). Proto je nutné zachovat integritu místa činu tím, že se kriminalističtí technici chrání jednorázovým celotělovým oblekem, návleky na obuv, dvojími rukavicemi a rouškou, pro každou důkazní položku používají separátní prodyšný obal a mění svrchní rukavice po zajištění každé důkazní položky³. Jakékoliv další pomůcky (peán, pinzeta, kopíčko, nůžky, sběrný

³ Pokud předpisově nepostupují, mohou se dočkat úplného znehodnocení důkazního potenciálu stopy, jak se tomu stalo například v italském případě, kde Amanda Knox a její přítel Raffaele Sollecito byli obviněni z vraždy Meredith Kercher na základě dvou důkazů: stopy Amandy na střence nože a stopy Raffaela na přezce Meredithiny podprsenky. Ukázalo se, že si kriminalističtí technici neměnili rukavice mezi jednotlivými důkazními položkami, podprsenkovou přezku zajistili až po 46 dnech od vraždy, a přitom zajištění

kartáček, tampónek, lepicí páska) jsou opět nejlépe jednorázové, ale hlavně ověřené bez DNA a bez DNáz. Dlužno podotknout, že sterilizace sebere život mikroorganismům, ale nemusí zaručit nepřítomnost lidské profilovatelné DNA, a proto je ve forenzní genetice sterilizace nedostatečným dekontaminačním opatřením.

Důkazní položky (stopy) je možno vysušit nebo zamrazit, ale nesmí být vystaveny působení vyšší teploty a vlhkosti, která podporuje růst bakterií a plísní, které dokáží přítomnou DNA spotřebovat (35). Při následném ohledání položky v laboratoři platí stejně přísná kritéria – jednorázové pomůcky a vyloučení možnosti kontaminace fyzickou separací přetlakových prePCR a podtlakových post-PCR pracovních míst, řízeným pohybem osob, pomůcek a materiálu, dekontaminací po zpracování každého důkazu (ultrafialovým zářením, gama zářením (36, 37), etylenoxidem (38) nebo lépe mytím povrchů chlorečnany nebo fosforečnany), použitím špiček s filtrem nebo s jednorázovým pístem při pipetování. Dodavatelé jednorázových pomůcek musí vhodnost pro forenzní analýzy dokumentovat (certifikátem ISO13485). Pro srovnání finanční náročnosti: certifikovaný kartáček nestojí 18 centů, ale 2,7 EUR, ale nahánění „fantoma z Heilbronn“ – neexistujícího zločince s DNA profilem kontaminující motačky vatových tyčinek – stálo 10 000 000 EUR.⁴

těchto nejdůležitějších důkazů proti Knox a Sollecito nenahrávali na video, přestože u jiných důkazů postupovali podle standardního operačního protokolu (SOP). Amanda i Raffaele byli po mnoha soudních peripetiích omilostněni v celém rozsahu obžaloby.

⁴ Profil DNA ženy byl nalezen na 40 místech trestných činů v Rakousku, Francii a Německu mezi lety 1993 a 2009. V Německu byl profil nalezen na místech činu ve všech spolkových zemích kromě Bavorska a vyskytoval se u tzv. kebabových vražd, vražd přistěhovalců – majitelů stánků s rychlým občerstvením (8 Turků a jeden Řek). Na žádném místě činu nebyl popisován pohyb ženy v době zločinu. Mezi zavražděnými byla i policistka Michéle Kiesewetter, zabitá v německém Heilbronn 25. 4. 2007 (odtud jméno „fantóma“).

V březnu 2009 byl stejný ženský Profil DNA zajištěn z těla uhořelého muže-žadatele o azyl ve Francii, což vedlo ke konečnému odhalení, že fantóm neexistuje, a že DNA byla přítomná na sterilních bavlněných sběrných štětečkách firmy Greiner Bio už z výroby (tyto štětečky v Německu neodebíralo jen Bavorsko). Jako vrazi Michéle Kiesewetter a dalších obětí kebabových vražd byli identifikováni 4. 11. 2011 po neúspěšném přepadení banky v Eisenachu členové neonacistické teroristické buňky.

Jako kontrola účinnosti těchto opatření musí každý set zpracovávaných vzorků doprovázet blank – negativní kontrola. Negativních kontrol bývá více, pokud lze jednoznačně odlišit procesní kroky jako potenciální zdroje kontaminace (negativní kontrola okolí stopy na místě činu, negativní kontrola DNA izolace, negativní kontrola míchání PCR kvantifikační reakční směsi a PCR profilovací reakční směsi). Jako další kontrola slouží eliminační databáze – povinné zavedení profilu DNA všech osob, které se pohybují v nejužším kordonu – „na dokýchnutí“ – kolem důkazního materiálu, a všech osob přicházejících do styku se stopou v průběhu transportu do laboratoře a analýzy. Pokud by přece jen ke kontaminaci ze strany vyšetřovatelů došlo, srovnání profilu s databází zastaví sledování falešné stopy. Nicméně veškeré kontroly účinnosti protikontaminačních opatření mají jen určitou pravděpodobnost odhalení kontaminačního šumu, proto musí být opatření systémová, předcházející vzniku kontaminačních událostí. Tato opatření je nejlépe přijímat na bázi osvědčených mezinárodních standardů (ISO13485 ve výrobě, ISO17025 v laboratoři).

Jako součást „*chain of custody*“, průvodního listu vzorku, se ke každé položce zaznamenává spolu s podpisem kdo, kdy a proč s položkou zacházel.

Před samotnou izolací DNA je vhodné zjistit biologický charakter vzorku orientační zkouškou (screeningovým testem). Tento krok může být důležitý například při rozlišení krevní skvrny od jiných skvrn, rozlišení inkriminujících spermií od irelevantních kožních šupinek u známého oběti, obviněného ze znásilnění, nebo pomůže odhalit snahu o podstrčení stopy – preamplifikované DNA na místo činu (39).

Platí, že každá relevantní stopa na místě činu se musí získat jako potenciální důkazní materiál. Nicméně množství stop k analýze DNA velice rychle narazí na finanční a logistický strop, proto je nutno provést výběr jak při sběru stop, tak při rozhodnutí, ze které stopy se má získat profil DNA. Tato činnost není úplně standardizovatelná, protože každé místo činu je jiné. Pokud při „domácí zabíjačce“ bude pět set krevních skvrn na podlaze a po stěnách místností z kuchyně až do druhého patra, nebude nutno provádět pět set profilování (z každé skvrny jedno).

Je vysoce pravděpodobné, že takový případ se obejde úplně bez důkazů DNA, protože by nic relevantního nepřinesly.

Teorie „nového“ důkazu (propagovaného například Lausannskou školou) (40), přichází s trendem „case preassessment“, rozvahy, kdy je specifikován poměr cena : výkon, potenciální výsledek a jeho důkazní síla před samotným provedením laboratorní metody (41). Vede to k zefektivnění a zlevnění analýz. Pokud je předem jasné, že strana obhajoby má relevantní alternativní hypotézu, kdy pravděpodobnost důkazu za hypotézy obžaloby je stejná jako pravděpodobnost důkazu za hypotézy obhajoby, je zbytečné pouštět se do zdlouhavé a drahé analýzy. Tento důkaz bude irelevantní.

Kriminalistický technik prochází výcvikem a při sběru stop dodržuje požadavky na bezpečnost a zákonnost. Při tom všem na místě činu vykonává tvořivou práci, do určité míry podobnou práci inspektora, proto se na jeho činnost v německých zemích aplikuje mezinárodní inspekční standard (ISO17020). Při sběru stopy technik vybírá takovou stopu, která může přidat na misku vah viny/neviny, která vzbuzuje předpoklad, že poskytne profil DNA a umožní archivaci, a která je vhodná s ohledem na předchozí sebrané stopy.

Izolace DNA

Přestože existují speciální polymerázy a PCR směsi, které umožňují amplifikovat DNA ve vzorku bez předchozí extrakce DNA, standardně se před profilováním DNA v biologickém vzorku zbavíme všech složek, které nás nezajímají – proteinů, tuků, cukrů, metabolitů, solí, inhibitorů PCR. Prvním krokem izolace je lýza buněk, pak enzymatické naštěpení proteinů proteinázou K a oddělení DNA od zbytku obsahu buněk a podkladového materiálu. Dnes už se prakticky nepoužívá klasická fenol-chloroformová extrakce ani Chelex, preference má spíše extrakce na pevné vrstvě, převážně na křemičitanu ve formě paramagnetických částic nebo filtrační kolonky. Použití extrakční metody může záviset na osobní laboratorní validační zkušenosti, protože na výběr je toho mnoho: FTA karta, alkalická lýza, vychytávání triplexem. Pro určité

buňky a tkáně je nutno postup modifikovat: jednotlivé buňky lze izolovat záchytnou laserovou mikrodisekcí nebo mikropinzetou (42), kost je nutno nadrtit a dekalcifikovat v EDTA, k vlasům se přidává dithiothreitol pro rozbití disulfidických můstků, spermie jsou rezistentnější než poševní epitelové buňky, proto lze diferenciální extrakcí rozlišit mužskou a ženskou frakci směsi.

Zatímco nelze ovlivnit degradaci DNA na místě činu před sebráním stopy, lze jí zabránit správným balením stopy (jednotlivě do prodyšných papírových sáčků), udržováním při nízké teplotě při převozu do laboratoře a stabilizací vzorku v laboratoři (pomocí přídatku jako je RNAlater, zamražením nebo lýzou). Do velké míry se lze vypořádat s inhibicí PCR (odstraněním inhibitorů v průběhu izolace DNA, použitím rezistentnější DNA polymerázy v průběhu PCR) a vyhnout se kontaminaci v průběhu všech dalších kroků zpracování vzorku (použitím DNA-free plastů a reagensií, dodržováním protikontaminačních a dekontaminačních opatření, jak je stanoveno v SOP, standardním operačním protokolu).

Po extrakci je DNA rozpuštěna v deionizované vodě nebo v 10 mM TrisCl (s přídatkem EDTA do koncentrace 0,1 mM, aby neinterferovala s funkcí polymerázy). Dlouhodobě se DNA uchovává v (hluboko)zamraženém stavu anebo se může vysušit na FTA kartě nebo po přidavku trehalózy uchovávat na suchém tmavém místě při pokojové teplotě (43).

Kvantifikace DNA

PCR pro profilování DNA vyžaduje vstupní množství DNA v určitém rozmezí (většinou 0,1 ng až 1 ng na reakci): pokud je DNA méně, mohou alely přítomné ve vzorku chybět ve výsledném elektroforetogramu (dojde k alelickému nebo lokusovému drop-outu, viz níže). Pokud je DNA více, dochází v PCR k preferenční amplifikaci krátkých fragmentů a v elektroforéze k navýšení šumu a přetečení fluorescence (overscale) nad hodnoty, kdy je možný odečet délky alely a kvantifikace. Toto přetečení se může projevit i v jiných barevných kanálech, než kde je přítomna alela, jako průsak, bleedthrough. Proto je americkým DNA poradním orgánem (TWGDAM), anglickou zprávou Caddy report (44)

i výrobci typizačních souprav doporučeno měřit před samotnou analýzou množství DNA.

Metody kvantifikace DNA se postupně vyvíjely od takových, které měří veškerou DNA (spektrofotometrie, fluorimetrie), přes ty, které měří veškerou lidskou DNA (hybridizace s chemiluminiscenčně značenou sondou) až po ty dnešní, které pomocí qPCR měří množství amplifikovatelné lidské DNA, nejlépe v multiplexu, kde je rozlišena délka amplifikovatelné DNA, templát chromozomu X, templát autozomů a templát mitochondriální DNA. Pro vytvoření kalibrační křivky se používá referenční DNA standard (45).

PCR – vytvoření DNA fragmentů

Pokud máme zjištěnou koncentraci DNA, přidáme do komerční PCR reakce požadované množství DNA, uzavřeme zkumavky, přeneseme ve stojánku do postPCR areálu, vložíme do termocykléru a necháme běžet teplotní cykly polymerázové řetězové reakce.

V druhé kapitole této knihy je popsán konkrétní postup pro typizační soupravu Investigator ESSplex SE QS Kit (Qiagen). Obecně vždy po prvotní aktivaci polymerázy denaturační teplotou následují opakované cykly denaturace/hybridizace primerů s templátem/extenze primerů (někdy může být pro hybridizaci a extenzi jen jeden krok, jedna teplota) a pak finální extenzní krok, kdy se ke všem namnoženým molekulám DNA přidá beztemplátový adenin.

Typizační směs je multiplexní – obsahuje větší množství primerových párů, kdy každý pár umožní amplifikaci jedné cílové sekvence. Kromě mikrosatelitových lokusů jsou v každé směsi i primery pro specifický lokus v intronu genu pro amelogenin na gonozomech, ve kterém se nachází délkový polymorfismus nemikrosatelitového typu. Delece u chromozómu X rozlišuje mužské a ženské pohlaví. Složení firemního PCR koktejlu je natolik optimalizované, že nemá smysl přidávat další PCR enhancery.

Použité stojánky se musí dekontaminovat předtím, než jsou znovu použity – než se navrátí do pre-PCR areálu. Pipety nebo další laboratorní nástroje se z místnosti do místnosti nepřenáší.

Elektroforetická separace – rozdělení DNA fragmentů

K rozlišení produktů PCR amplifikace, amplikonů, se využívá fluorescenční značení jednoho z primerů v každém primerovém páru a kapilární elektroforéza. Fluorescenční značení může být čtyřbarevné až osmibarevné, záleží na možnostech detekčních kanálů přístroje pro kapilární elektroforézu, který dokáže jednotlivé fluorescenční barvy opticky a softwarově rozlišit. Amplikony se spolu s vnitřním délkovým standardem nanesou do denaturujícího formamidu a elektrokinetickou injekcí vstupují do kapiláry, kde se od sebe elektroforeticky oddělují. Velikost náboje je úměrná délce fragmentu, protože každý nukleotid nese záporně nabitý zbytek kyseliny fosforečné. Obecně je mobilita fragmentu daná jeho délkou, sekundární strukturou, nábojem, teplotou při separaci a je konstantní při definovaných podmínkách (proud, napětí, iontová síla, pH, viskozita, velikost pórů elektroforetického média). Fluorescenčně zbarvený amplikon emituje světelný signál při průchodu místem, kde chybí vnější obal kapiláry a kam je zároveň namířen paprsek excitačního laseru. Spektrální charakteristika a intenzita signálu je po průchodu záření optickým hranolem a multiplikátorem měřena CCD detektorem.

Identifikace píků

Rozlišení píku alely od šumu a píku arteficiálního je prováděno pomocí softwaru na základě předem definovaných parametrů. Děje se vztažením k validovaným hodnotám analytické a stochastické prahové hodnoty a vzhledem ke kalibrační délkové křivce, vytvořené na základě detekce fluorescenčně zbarvených standardů uvnitř každé zkumavky a vzhledem k signálu firemně dodávané směsi amplikonů, tzv. alelického žebříčku. V současné době probíhají snahy vyhnout se nastavování prahových hodnot tím, že necháme píky identifikovat umělou inteligenci (46). Rozeznaný pík se pak převede na název alely podle délky amplikonu v párech bází.

- Limit detekce (**analytická prahová hodnota**) – signál nad limitem detekce je reálným signálem a ne šumem; počítá se jako průměr signálu šumu plus tři směrodatné odchylky;

- ▶ Limit kvantifikace (**stochastická prahová hodnota**) – jediný signál nad limitem kvantifikace na jednom lokusu je reálný homozygot; počítá se jako průměr signálu šumu plus deset směrodatných odchylek;
- ▶ Arteficiální píky mohou nabývat podob označovaných jako stutter, bleedthrough, minus A, dye blob, spike, drop-in. Arteficiální absence píku je null allele nebo drop-out;
- ▶ **Zadrhlé alely (stutter)** – artefakt činnosti polymerázy, kdy se rostoucí řetězec na moment odpojí od svého templatového řetězce anebo se templát vyduje a polymeráza nasedne posunutá o jednu repetici (výjimečně více), obdobně, jako když přeskočí řetěz na kole;
- ▶ Přetečení signálu mezi kanály (**bleedthrough, pull up**) – při velkém množství elektroforeticky separovaného amplifikátu signál v jedné fluorescenční barvě může být přečten jako signál v dalších fluorescenčních barvách;
- ▶ **Beztemplátová adenylace (minus A)** – polymeráza přidává, v závislosti na konci templatové sekvence, ještě jeden adenin, který nemá k sobě templatový tymin. Komerční soupravy podporují tuto adenylaci tak, aby k ní docházelo vždy (modifikací 5' konce primeru a prodloužením finální doby extenze v PCR programu). Pokud není dodržen amplifikační protokol (zejména závěrečná adenylační fáze – 30 min/60 °C) nebo jsou amplifikáty uloženy po nějakou dobu v teplotách pod bodem mrazu (např. přes noc), dojde k jevu zvanému upadání adenosinu, což se projeví jako přítomnost „minus A“ píku, a to buď tzv. split-peak (rozdvojený pík), nebo shoulder-peak (šikmý pík s pozvolným náběhem zleva);
- ▶ **Kaňka (dye blob)** – fluorescenční značka uvolněná ze značeného primeru je nabitá a může elektroforeticky putovat a napodobovat reálný pík; kaňkový pík má však širší základnu;
- ▶ **Bodec (spike)** – přítomnost krystalu soli nebo jiné nečistoty (nejčastěji močoviny) při průchodu detekčním okénkem může vést k odrazu laserového paprsku, což způsobí silný signál ve tvaru úzkého píku ve všech fluorescenčních barvách;

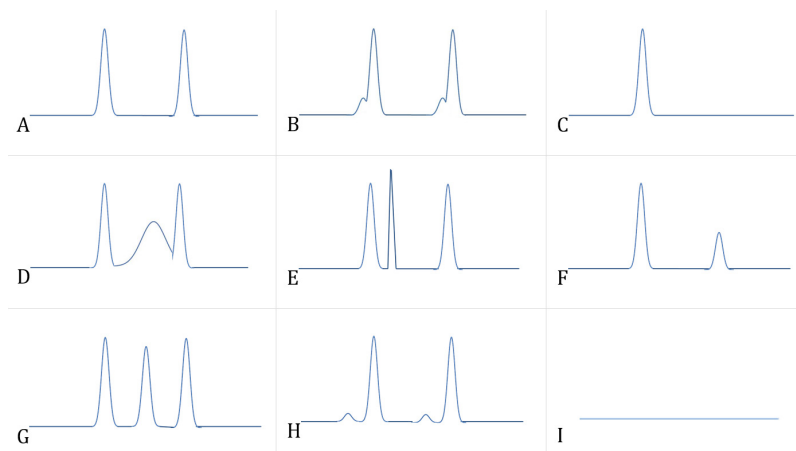
- ▶ **Pík navíc (drop-in)** – signál pocházející z druhého vzorku, projevu-
jící se ve více lokusech (kontaminace) nebo signál z minoritní kon-
taminace, projevující se třeba jen na jednom lokuse;
- ▶ **Nulová, tichá alela (null allele)** – alela, která je přítomna, ale není
identifikována naším typizačním systémem, kterému vadí mutace
v místě vazby 3' konce primeru na templát. Nulovou alelu může
odhalit srovnání výsledků, dosažených za použití rozdílných typi-
začních souprav anebo sekvenováním oblasti, pokrývající vazebná
místa primerů. Například u některých starších typizačních souprav
(PowerPlex 16HS, PowerPlex ES117, PowerPlex ESX17, Identifiler) je
relativně často pozorován jev, kdy je v elektroforetogramu přítomen
pouze signál pro chromozom X, ale přesto se jedná o muže, jak je
možno ověřit testováním Y haplotypu. Z toho důvodu mají novější
soupravy (PowerPlex Fusion 6C Promega, 26plex Qiagen) v multi-
plexu navíc i lokus na chromozomu Y;
- ▶ **Drop-out** – alelický: alela, která je přítomna, není identifikována při
profilování kvůli degradaci DNA a stochastickým efektům; lokuso-
vý: žádná ze dvou alel heterozygotního lokusu není identifikována
kvůli degradaci DNA a stochastickým efektům. Degradovaná DNA
poskytuje charakteristický profil s klesajícím signálem a výskytem
drop-out směrem k větším délkám DNA fragmentů (**ski slope**, sešup,
sjezdovka).

Odečtení profilu DNA

Pokud je při nastavení analytické a stochastické prahové hodnoty profil
vyhodnocen s jednou nebo dvěma alelami na všech testovaných loku-
sech, jedná se o *profil úplný* (▶ obr. 4).

Pokud na některých lokusech není žádný pík nebo jen jeden pík pod
stochastickým limitem, jedná se o *profil neúplný*.

Pokud u nejméně dvou lokusů jsou nejméně tři píky, jedná se o *profil
smíšený (směsný)*. U směsných profilů dvou osob můžeme někdy rozli-
šit majoritní a minoritní složku. Některé směsné profily jsou tak kom-
plikované (drop-in + drop-out + ski slope + šum + inhibice), že analýza



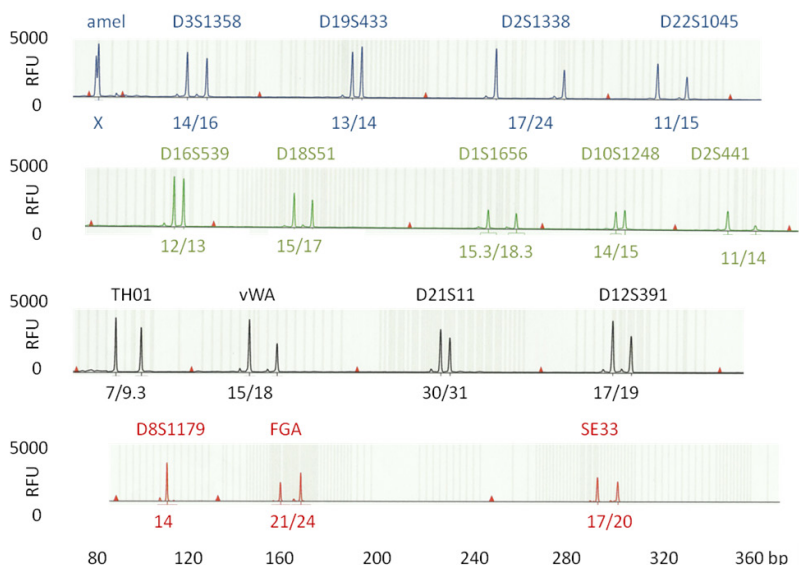
Obr. 3 Schématické znázornění heterozygotních píků a artefaktů, které se mohou při analýze stejného lokusu objevit

Legenda: **A** – dva vyvážené signály na lokusu; **B** – dva vyvážené signály na lokusu s viditelnými nedoadenylovanými píky; **C** – alelický drop-out u delší alely (extrémní nevyvážení píků) nebo nulová alela; **D** – dva vyvážené signály na lokusu a kaňka; **E** – dva vyvážené signály na lokusu a elektrický výboj; **F** – dva nevyvážené signály na lokusu; **G** – tři vyvážené signály na lokusu: přetečení z jiné barvy, tříalelický lokus, kontaminace, směsný vzorek nebo drop-in; **H** – signál zadržlého amplikonu u kratší alely (zadržlý amplikon u delší alely je překryt signálem kratší alely); **I** – lokusový drop-out nebo negativní kontrola

není možná (nebo je možná jen s vyšším stupněm nejistoty, za použití software /47/).

Interpretace

Interpretace je vyvozování racionálních a vyvážených závěrů z pozorování, výsledků testů a měření. Co to znamená v případě profilování DNA (48)? Pokud jsme již jako výsledek genotypizační analýzy získali profil DNA, můžeme zodpovědět otázku, co nalezení tohoto profilu znamená v kontextu vyšetřování nebo soudního procesu (28). Analýza DNA má oproti jiným forenzním důkazům tu výhodu, že výstup kapilární



Obr. 4 Úplný profil DNA

Legenda: Vzorový úplný profil DNA, získaný použitím typizační soupravy PowerPlex ESII7 (upraveno pro zvýšení čitelnosti). Na ose x je uvedena délka DNA fragmentů v párech bází, na ose y je uvedena výše signálu v relativních fluorescenčních jednotkách; modré, zelené, černé a červené popisky odpovídají názvům lokusů a konkrétním alelám na lokuse. Nemikrosatelitový lokus pro gen amelogenin dává signál jen pro chromozóm X, takže se jedná o ženu.

elektroforézy – píky na elektroforetogramu – lze celkem snadno převést do digitální podoby, databázovat a podrobiť inferenční analýze.

Analýza DNA byla v devadesátých letech použita v několika mediálně výživných, vysokoprofilových kriminálních případech, kde se ti nejlepší právníci snažili její výsledky zpochybnit (viz případ O. J. Simpson /49/). To vedlo k „vychytání“ procesních chyb profilování DNA a etablování bayesovské školy interpretace důkazu ve forenzním kontextu, která je koherentní, nezkrslující, logická, čitelná a robustní. Co je podstatou tohoto způsobu interpretace?

V první řadě poznání vyplývající z hlubších filozofických náhledů, že úplná objektivita poznání a znaleckého zkoumání není možná. Subjektivní, personální (ale ne nedeterminovaný, emočně podložený nebo náhodný) pohled znalce může být však maximálně objektivizován. Určitý děj se buď stoprocentně stal nebo stoprocentně nestal. Ale do našeho poznání o činu v minulosti vstupuje nedokonalý lidský faktor a s ním nejistota, takže stoprocentní pravděpodobnost je z principu nedosažitelná. Kompetentní znalec však dokáže nejistotu svých závěrů pro každý zkoumaný příklad kvantifikovat. Přiznáním nejistoty roste hodnota znalce a hodnota znaleckého posudku – předstírání vševědoucnosti je nesprávný a nebezpečný postup. Vlivem televizních seriálů mohou někteří laici podléhat tzv. CSI (Crime Scene Investigation) efektu – zaslepení nezpochybnitelnou auroou znaleckého zkoumání, a zvláště profilování DNA. Nicméně důkaz DNA se nikdy nesmí hodnotit osamoceně, ale vždy společně s ostatními důkazy, a to úpravou apriorní pravděpodobnosti na pravděpodobnost aposteriorní (jak bude ukázáno níže). Tím se eliminuje nebezpečí CSI efektu při náhodné shodě s profilem v databázi, tj. při zásahu naslepo, „cold hit“. Není nutno se obávat, že náhodné shody bez souvislosti s případem vyskakují z databáze jako králíci z klobouku. V českém prostředí je referování shody stanoveno pokynem policejního prezidenta. Nicméně v zahraniční literatuře jsou případy falešného zásahu naslepo popsány (50).

Prvním krokem analýzy je zarámování případu do kontextu daného kriminálního případu. Do tohoto „zarámování“ patří určení apriorní pravděpodobnosti viny obžalovaného (úkon prováděný soudcem, ne znalcem) a zjištění informací, které zásadním způsobem ovlivňují výpočet síly důkazu. Výpočet síly důkazu je například ovlivňován faktem, zda biologická stopa podezřelého byla nalezena na místě činu nebo stopa oběti byla nalezena na oblečení podezřelého. Stejně tak výpočet síly důkazu ovlivňují další informace o případu. Do tohoto zarámování však nepatří znalost profilu DNA ze srovnávacího vzorku žalovaného – naopak, tuto informaci nesmí mít znalec před analýzou stopy z místa činu k dispozici, aby nevědomě nepodlehli „pozorovatelskému“ zkreslení při vyhodnocování jednotlivých píků elektroforetogramu.

Pak následuje formulace nejméně dvou hypotéz, o které při soudu jde – většinou se jedná o jednu hypotézu obžaloby a jednu hypotézu obhajoby, ale obhajoba může navrhnout více hypotéz, které se pro účely vážení důkazu sloučí do jedné. Hypotézy (tvrzení, scénáře, verze, varianty, teze) mohou být formulovány pro různé hierarchické úrovně (51): na nejnižší úrovni, na úrovni *zdroje* stopy, se můžeme například ptát: „z koho pochází tato krevní skvrna?“⁵. Odpovídající hypotézy na této úrovni jsou pak:

H1: krevní skvrna na místě činu pochází z podezřelého

H2: krevní skvrna na místě činu pochází z neznámé osoby

Jiné hypotézy (u jiného případu) na stejné hierarchické úrovni mohou být:

H1: semeno pochází od podezřelého muže

H2: semeno pochází od neznámé osoby, která není příbuzná podezřelému

Na vyšší úrovni, na úrovni *činnosti, konání*, odpovídáme například na otázku: „souložila slečna A s chlapcem B?“. Hypotézami na této úrovni budou například:

H1: slečna A souložila s nezletilým B, jak je popsáno v obžalobě

H2: slečna A poslední měsíc neměla pohlavní styk,

nebo u jiného případu:

H1: došlo k pohlavnímu styku mezi panem B a slečnou C, jak popisuje slečna C

H2: k pohlavnímu styku došlo mezi slečnou C a neznámým mužem

⁵ Kvůli profilování DNA se někdy zavádí ještě „sub-source level“, úroveň zdrojové částice, partikule, mrtě, kdy nevíme, o jakou tkáň se jedná. Hypotézami pak může být H1: profil DNA získaný ze směsného vzorku pochází od pana Rambouska a paní Rambouskové; H2: profil DNA získaný ze směsného vzorku pochází od neznámého nepřibuzného muže a paní Rambouskové.

Třetí, nejvyšší hierarchická úroveň, *úroveň přestoupení zákona*, zodpovídá například na otázku: „došlo ke znásilnění?“. Hypotézami mohou být:

H1: k sexuálnímu styku došlo při zneužití bezbrannosti oběti, po donucení násilím nebo pohrůzkou násilí nebo pohrůzkou jiné těžké újmy

H2: sexuální styk byl konsenzuální.

Není třeba vysvětlovat, že s přestoupením z úrovně zdroje na úrovně vyšší s sebou nese nárůst potřeby dalších informací (negenetických, včetně právnických) a nárůst požadavků na znalce, což způsobuje zvýšení náročnosti výpočtu a nárůst nejistoty. Třetí hierarchická úroveň je už hájemstvím soudu, ve kterém ani soudní znalec nemá slovo. Vhodným prostředkem pro zhodnocení síly důkazu pak mohou být bayesovské sítě (52), které kombinují teorii grafů s bayesovým teorémem. Bayesovské sítě dokáží zpracovat všechny typy důkazů pro pravděpodobnostní ohodnocení kladné odpovědi na otázku, zdali se trestný čin stal podle tvrzení obžaloby, tak, že se dosadí dílčí pravděpodobnosti do uzlů grafu, spojených směrovými hranami.

Pokud jsou již dvě hypotézy jasně stanoveny, tak samotné zhodnocení síly důkazu se provádí pomocí výpočtu věrohodnostního poměru, likelihood ratio, LR. Věrohodnostní poměr je zlomek, kdy v čitateli je pravděpodobnost (přesněji věrohodnost) důkazních profilů DNA za předpokladu, že platí hypotéza obžaloby a ve jmenovateli pravděpodobnost důkazních profilů DNA za předpokladu, že platí hypotéza obhajoby. Věrohodnostní poměr je jediné číslo, kterým se shrne veškerý výsledek analýzy DNA (nebo veškerý výsledek jakéhokoliv jiného znaleckého vyšetření) (53).

Pokud použijeme značení:

H hypotéza

E důkaz (evidence)

I souhrn dalších (nevědeckých) důkazů

| vertikální čára znázorňující podmínku „za předpokladu, že“, tak

$$LR = \frac{P(E|H1,I)}{P(E|H2,I)}.$$

Zde je nutno zdůraznit, že výsledkem znalcového zkoumání je *pravděpodobnost důkazu* za předpokladu platnosti dvou rozdílných hypotéz. Je chybou, pokud znalec referuje nebo soudce po znalci vyžaduje pravděpodobnost hypotézy a ne pravděpodobnost důkazu. Tato chyba je tak častá, že má dokonce několik názvů: „*transposing the conditional*“, záměna podmínky (předpokladu) a vyvození (tvrzení), klam obousměrnosti nebo „*prosecutor's fallacy*“, klam žalující strany.

Pokud pravděpodobnost vyjádříme jako šanci (například pokud pravděpodobnost jedné čtvrtiny vyjádříme jako šanci jedna ku třem), pak proces zavzetí znaleckého výsledku do rozhodování soudu je popsán šancovou formou Bayesova vzorce⁶:

Aposteriorní podíl šancí = apriorní podíl šancí × LR, formálně:

$$\frac{P(H1|E, I)}{P(H2|E, I)} = \frac{P(H1|I)}{P(H2|I)} \times \frac{P(E|H1, I)}{P(E|H2, I)}$$

Soudce stanovuje apriorní podíl šancí, pomáhá specifikovat hypotézu obžaloby a obhajoby a stanovuje hraniční hodnotu aposteriorního podílu šancí, kdy padne verdikt: „vinen“. Zkušený soudce může všechny tyto procesy zvládat podvědomě, ale i takovému zkušenému soudci pomůže, pokud si tyto své podvědomé kroky převede do racionální úrovně. Bude se pak lépe moci vyhnout klamu při skládání mozaiky viny a nevinu v soudním případě.

Zpátky ke zmíněné subjektivitě: znalec musí odhalit (a být schopen zdůvodnit), jaký model (jaký souhrn předpokladů o platnosti určitých předpokladů pro popis přírodních dějů) použil pro analýzu. Do modelu může patřit podmínka Hardy-Weinbergovy rovnováhy v populaci versus subpopulační efekty, nepřítomnost vazby mezi markery versus vazba a vazebná nerovnováha, použití detekčního a stochastického prahu versus kontinuální rozeznávání piků, způsob vypořádání se s pří-

⁶ Zpětné převedení podílů šancí na pravděpodobnost se provádí podle vzorce: pravděpodobnost = šance / (šance + 1).

tomností nulových alel a s přítomností alel, které nejsou v databázi, započtení plochy či výšky píku nebo pravděpodobnosti drop-in/drop-out při analýze směsí. Použití jiného modelu může za určitých podmínek vést k diametrálně odlišnému výsledku – jiný znalec může bez porušení zásad logiky a odbornosti dojít k věrohodnostnímu poměru, lišícím se v rozsahu několika řádů. Pro svůj výsledek by však znalec měl provést citlivostní analýzu, která odhalí podmínky, při jejichž porušení se model rozsype. Opět na soudci zůstává rozhodnutí, zda závěry jsou natolik robustní, aby prahová hodnota pro verdikt viny byla dosažena za použití jakéhokoliv modelu.

Nyní můžeme přistoupit k uvedení konkrétních příkladů výpočtu na soudních případech:

Případ 1:

V případě pěstního souboje končícího smrtí jednoho z bojujících byly z pěstních kloubů oběti analyzovány krevní šmouhy. Podařilo se získat úplný profil DNA. Byl vytipován europoidní podezřelý na základě svědectví číšníka z restaurace o tom, kteří dva muži se pohádali, a dle jeho zlomeného nosu. Profil DNA podezřelého se shoduje s profilem DNA, zajištěným na oběti. Podezřelý tvrdí, že v inkriminovanou dobu v restauraci nebyl a už vůbec se s nikým nebral. Jaký je věrohodnostní poměr?

H1: DNA pochází od podezřelého

H2: DNA pochází od neznámého nepříbuzného muže

$P(E|H1,I)$ nabývá konkrétní hodnoty pravděpodobnosti profilu DNA na místě činu za předpokladu, že DNA pochází od podezřelého. Pokud by podezřelý byl vrahem, tak by pravděpodobnost shody jeho profilu a profilu na místě činu byla rovna jedné, $P(E|H1,I) = 1$.⁷

$P(E|H2,I)$ nabývá konkrétní hodnoty pravděpodobnosti profilu DNA na místě činu za předpokladu, že DNA nepochází od podezřelého a přitom podezřelý má stejný profil DNA. Pokud profil DNA od podezřelého nepochází, tak profil DNA na místě činu a profil DNA podezřelého jsou

⁷ Zde pomínám možnost chyby.

na sobě nezávislé. Profil DNA na místě činu závisí pak jen na frekvenci tohoto profilu v populaci. O jakou populaci se jedná? Není to populace/etnikum podezřelého, ale populace, ze které by pocházel vrah, kdyby jím nebyl náš podezřelý. V případě, jako je tento, by šlo o europoidní populaci. $P(E|H_2, I) = f$,

$$LR = \frac{1}{f}.$$

Slovní vyjádření: Důkazy jsou $1/f$ krát pravděpodobnější, pokud platí hypotéza obžaloby, než pokud platí hypotéza obhajoby.

Příklad 2:

V případě znásilnění a vraždy byly zpod nehtů ženské oběti (z hyponychia) získány buňky s mužským profilem DNA. Vyšetřovatelé nemají žádné indicie, pomocí kterých by si vytipovali podezřelého. Po zaslání profilu DNA k porovnání do kriminalistické DNA databáze byla nalezena osoba se shodným profilem DNA. Tato osoba tvrdí, že se na místě nevyskytovala. Jaký je věrohodnostní poměr?

Pokud

H1 zdroj profilu DNA z hyponychia má profil DNA v databázi

H2 zdroj profilu DNA z hyponychia nemá profil DNA v databázi

$P(H1)$ je n/N (apriorní pravděpodobnost, že náhodná osoba z populace má svůj profil DNA v databázi, je rovna podílu velikosti databáze a velikosti populace)

n je počet osob v databázi

N je počet osob v populaci

f frekvence výskytu profilu DNA v dané populaci, pak

$$LR = \left(1 + \frac{n-1}{N-n}\right) \frac{1}{f} \quad (54)$$

a

$$P(H1|data) = \frac{1}{1 + (N-n) \times f}$$

Slovní vyjádření: Důkazy jsou $\left(1 + \frac{n-1}{N-n}\right) \frac{1}{f}$ krát pravděpodobnější, pokud platí hypotéza obžaloby, než pokud platí hypotéza obhajoby.

Příklad 3:

Při vyšetření otcovství máme k dispozici buklíční stěr matky, dítěte a možného otce. Ze spisu je zřejmé, že někdo z účastníků sporu lže: matka dítěte tvrdí, že v době rozhodné souložila jen s žalovaným, žalovaný tvrdí, že matku dítěte nezná a nikdy s ní pohlavní styk neměl.

H1 žalovaný je otcem dítěte

H2 neznámý nepříbuzný muž je otcem dítěte

Apriorní pravděpodobnost otcovství v takovém případě může být nastavena tak, jako bychom o případu neměli žádnou znalost: jako padesátiprocentní. Pokud pomineme možnost nulových alel, mutací a subpopulačních efektů (55), pak je LR (u vyšetření zvané také jako index paternity, anglicky *paternity index*, PI) pro jednotlivé kombinace genotypů matky, dítěte a nařčeného rovno (► tab. 1).

Dílčí indexy paternity pro jednotlivé lokusy se násobí pro získání celkového indexu paternity.

Slovní vyjádření: důkazy DNA jsou PI krát pravděpodobnější za předpokladu, že žalovaný je otcem dítěte, než že někdo jiný je otcem dítěte. U vyšetření otcovství se vžilo uvádění pravděpodobnosti otcovství v posudku. Musím připomenout, že výpočet pravděpodobnosti otcovství by měl znalec provádět se znalostí apriorní pravděpodobnosti otcovství, určené soudem. Pokud v usnesení tato apriorní pravděpodobnost otcovství není stanovena, měl by znalec provést výpočet nejen pro hodnotu apriorní pravděpodobnosti rovnou 50 %, ⁸ ale i pro další apriorní pravděpodobnosti otcovství, ze kterých si soud může dle vlastního uvážení vybrat.

⁸ To se pak vzorec pro posteriorní pravděpodobnost otcovství zjednoduší na

$$PO = \frac{LR}{LR + 1}.$$

Tab. 1: Hodnoty PI pro kombinace profilů DNA matky, dítěte a žalovaného

Matka	Dítě	Žalovaný	PI
AA	AA	AA	$\frac{1}{p_A}$
AA	AA	AB	$\frac{1}{2p_A}$
AA	AB	AB	$\frac{1}{2p_B}$
AA	AB	BC	$\frac{1}{2p_B}$
AB	AA	AA	$\frac{1}{p_A}$
AB	AA	AB	$\frac{1}{2p_A}$
AB	AA	AC	$\frac{1}{2p_A}$
AB	AB	AA	$\frac{1}{p_A + p_B}$
AB	AB	AB	$\frac{1}{p_A + p_B}$
AB	AB	AC	$\frac{1}{2(p_A + p_B)}$
BB	AB	AA	$\frac{1}{p_A}$
BC	AB	AA	$\frac{1}{p_A}$
BC	AB	AB	$\frac{1}{2p_A}$
BC	AB	AC	$\frac{1}{2p_A}$
BD	AB	AC	$\frac{1}{2p_A}$

Další příklady výpočtu věrohodnostního poměru zde uvádět nebudu, protože interpretace složitějších případů (jako je analýza směsí, kde záleží na počtu přispěvatelů do směsi, počtu známých přispěvatelů do směsi a použitém modelu analýzy), by si vyžádala dedikovanou publikaci (více například na stránce <http://www.isfg.org/Software>).

Stejně tak nebudu uvádět způsoby uvádění výsledků pomocí pravděpodobnosti vyloučení nebo pravděpodobnosti náhodné shody – tyto způsoby vyjádření jsou v určitých případech úplně nevhodné a v jiných případech méně vhodné, než vyjádření pomocí LR a jako takové by měly být kanalizovány do propadliště dějin.

Tuto část úvodní kapitoly, která zkráceně popisuje všechny hlavní kroky procesu analýzy DNA, završím opětovnou zmínkou o kontrole kvality vyšetření. Špatně provedené nebo špatně vyhodnocené profilování DNA může vést k justičnímu omylu. Důkazy DNA bývají oprávněně považovány za důkazy stěžejní. Chyba se však může stát v každém kroku analýzy a jen přísné dodržování nejlepší laboratorní praxe může vést k minimalizaci chyb. 100% jistota je principiálně nedosažitelná, i pokud se jedná o vyloučení možnosti chyby. Kontrola kvality musí být provedena nezávisle, nestranně, pravidelně, standardně a systematicky – podle mezinárodních norem. Na forenzně genetickou laboratoř se vztahuje norma ČSN EN ISO IEC 17025 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří – a všechny evropské forenzně genetické laboratoře musely pro tuto normu získat akreditaci do roku 2013. Dá se říct, že udělení akreditace má zaručit, že vyšetření forenzně genetického vzorku nestranně provádí proškolená a interně i externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu, ve vhodné laboratoři, za použití kalibrovaných přístrojů a validovaných metod; výsledky interpretuje dle odborných doporučení a jakoukoliv neshodu (odchylku od normy, od interní řízené dokumentace nebo od očekávání klienta) zkoumá tak, aby byla nalezena příčina neshody, aby došlo k nápravě a byly podniknuty preventivní opatření.

Co lze očekávat v budoucnosti?

Testování mikrosatelitů zůstane po několik následujících let jako základní profilovací vyšetření v DNA oblasti s ohledem na kompatibilitu s existujícími databázemi, přestože se ve stále větší míře bude používat pro získání STR dat masivně paralelní sekvenování. Pro specifické případy, jako je identifikace obětí hromadných neštěstí nebo genetickou fenotypizaci, se budou ve vyšší míře využívat vysokoobrátkové metody, odhalující SNP.

Ohledně další predikce vývoje profilování DNA ve forenzním kontextu je ve hře několik faktorů:

- ▶ Překotný vývoj metod genotypizace směrem ke zmenšení reakčního objemu a automatizaci celého procesu,
- ▶ Metody umělé inteligence, které jako expertní systém zautomatizují odečítací a interpretační fázi vyšetření,
- ▶ Vývoj metod zaměřených na fenotypové znaky (změny v genové expresi a epigenetické změny, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA),
- ▶ Snižování ceny masivně paralelního sekvenování a jeho aplikovatelnost na smíšené, degradované vzorky s malým množstvím templátu, stejně jako jeho aplikovatelnost na určování příbuznosti, kde je benefitem informace o (mikro)haplotypech,
- ▶ Zrychlení vyšetření (56), provedení vyšetření na místě činu, „*point of crime testing*“ jako obdoba podobného trendu v medicíně, vyšetření u lůžka, „*point of care testing*“,
- ▶ Ochrana soukromí versus možnosti „vyčíst“ z DNA i fenotypové informace,
- ▶ Standardizace dle mezinárodních norem, včetně porovnatelnosti záznamů v databázích,
- ▶ Spolupráce se soudy na přijetí bayesovského přístupu jako univerzálního nástroje pro hodnocení důkazů.

Očividně se jedná o problematiku, přesahující rámec této publikace.

Co lze očekávat v této knize?

Tato kniha si neklade za cíl být všeobjímajícím slabikářem forenzně genetických metod na úrovni *state of the art* v době svého sepsání. Cíleně vybírá jen několik ověřených metod (a ověřených autorů kapitol), týkajících se, jmenovitě:

- ▶ Sestavení mikrosatelitového profilu DNA u lidí,
- ▶ Identifikace druhů zvířat,
- ▶ Masivně paralelního sekvenování mitochondriální DNA,
- ▶ Epigenetického určování věku pomocí pyrosekvenování,
- ▶ Epigenetického určování věku pomocí masivně paralelního sekvenování.

Pokud pomůže začínající forenzní genetičce (začínajícímu forenznímu genetikovi) vyhnout se začátečnickým chybám nebo, dokonce, pokud u nich vzbudí zájem o možnosti posunout možnosti forenzní genetiky dalším výzkumem podle rozšířeného olympijského hesla *Citius, Altius, Fortius – Communiter*, budou autoři vrnět blahem.

Poděkování

Kapitola byla vypracována za přispění grantových projektů
VI20202022123, LM2018133, LM2018125, LM2018132,
CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448,
EF16_013/0001674, LX22NPO5102, IGA LF UP 2022_012.

Kapitola 2:

Sestavení profilů DNA analýzou STR lokusů – jejich využití pro identifikaci osob nebo určování příbuzenských vztahů

Tomáš Pexa^{1,3}, Jiří Drábek^{2,3,4}

¹AeskuLab, k. s., Brno

²Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc

³Československá společnost pro forenzní genetiku, z. s., Olomouc

⁴4BIN, Olomouc

Úvod

Analýza vysoce polymorfních oblastí genomové DNA obsahujících úseky krátkých tandemových repeticí (STR, *Short Tandem Repeats*, mikrosatelity) patří dnes ke stěžejním metodickým postupům forenzní genetiky. Jde nejčastěji o tetranukleotidové repetitivní sekvence, přičemž jednotlivé varianty/alely se liší počtem opakování základního motivu a tím také celkovou délkou (57). Právě tohoto faktu využívá analýza založená na amplifikaci STR úseku a následném odlišení délkových variant elektroforézou. Oproti tomu analýza založená na sekvenování (dnes převážně již na masivně paralelním sekvenování) odhalí i další úroveň rozdílnosti – mikrovarianty, kdy se alely neliší délkou, ale nukleotidovou změnou v konkrétní jednotce repeticity. Nejčastěji využí-

vanými jsou STR oblasti umístěné na autozomálních chromozómech, ale i analýza STR oblastí na pohlavních chromozómech má své místo. Analýza STR na chromozomu Y, STR-Y, se používá při určování otcovství při nedostupném nařčeném a při jiných neúplných rodokmenech, kdy lze sledovat nepřerušenu linii po meči. Své nezastupitelné místo má při analýze směsi mužského a ženského materiálu (typicky po znásilnění), kdy umožní provést virtuálně diferenciální extrakci tak, že signál dává jen muž (58). Analýza STR na chromozomu X, STR-X, se používá při vyšetření příbuznosti v rodokmenech s ženskou linií a v rodokmenech, kdy se v generacích střídá muž a žena (59). Může sloužit i k rozpoznání Klinefelterova syndromu (60).

Cílem analýzy STR je sestavení genetického profilu nebo profilu DNA, který je charakteristický pro každého jednotlivce. Při použití v současné době standardního počtu testovaných STR oblastí (> 15 lokusů) a následném porovnání sestavených profilů DNA pak nenajdeme dva jedince s identickým DNA profilem, pokud se nejedná o jednovaječná dvojčata. V praxi se však můžeme setkat se situacemi, kdy počet vyšetřených lokusů je z důvodu degradace DNA nižší než standard nebo kdy je stopa smíšená, takže síla důkazu DNA nemusí být dostatečná pro jednoznačnou identifikaci. Stejně tak je vždy nutné myslet na pozici v hierarchii důkazů – zdali se otázka soudu týká přítomnosti biologického materiálu určité osoby na místě činu, zdali se týká konkrétní činnosti pachatele v průběhu páčání trestného činu nebo až té nejvyšší hierarchické úrovně, úrovně překročení zákona. Proto je vždy nutné sílu důkazu kvantifikovat bayesovským způsobem, pomocí věrohodnostního poměru pro konkrétní srovnávané hypotézy/scénáře (obžaloby a obhajoby). Bylo by chybou (a projevem CSI efektu) přijmout premisu, že DNA shoda znamená jednoznačné usvědčení ze zločinu.

Výpočet věrohodnostního poměru je univerzální přístup hodnocení důkazu DNA, využitelný jak pro individuální identifikaci osob, tak pro určování biologické příbuznosti osob (48, 61). Je natolik univerzálním, že může být použit pro všechna znalecká hodnocení (53, 62).

Příbuzenská analýza

Nejčastější příbuzenskou analýzou jsou testy otcovství (paternitní testy), kdy ve většině případů testujeme matku, dítě a potenciálního otce. Čili nejčastější srovnávané hypotézy jsou, že biologickým otcem dítěte je konkrétní testovaný muž nebo neznámý nepříbuzný muž z populace. Existuje ale nespočet dalších variací paternitních testů ve chvíli, kdy vzorek potenciálního otce není dostupný, ale jsou dostupné vzorky příjmenším jednoho jeho biologicky příbuzného.

Maternitní testy přicházejí v úvahu především v případech nálezů těla novorozence, kterého se žena po utajovaném porodu zbaví. Testování rodičovství vůči nalezenému novorozenci se někdy nazývá reverzní. Paternitní, maternitní i širší příbuzenské testy se využívají také v případech identifikací neznámých těl, pokud není k dispozici informace nebo materiál pro přímé porovnání (8).

Přímá identifikace

Přímá identifikace neznámého těla se provádí přímým porovnáním dvou profilů DNA, jedním sestaveným z biologického materiálu odebraného z těla a druhým sestaveným ze srovnávacího materiálu. Obdobně identifikace pachatele se provádí porovnáním profilů sestavených ze stop biologického původu s profilem ze srovnávacího materiálu.

Tato kapitola se zabývá postupem analýzy STR, vedoucím k sestavení profilu DNA. V současnosti existuje značné množství komerčně dostupných kitů pro analýzu STR oblastí, převážně od tří hlavních výrobců – Applied Biosystems, Promega a Qiagen. Kity se liší zastoupením STR oblastí, délkou amplikonů, použitím fluorescenčních značek, postupem vlastní analýzy. Ve všech případech jsou k dispozici podrobné manuály výrobce ke každému dodávanému kitu; s jejich použitím je možné analýzu úspěšně provést.

V našem případě projdeme postup analýzy na příkladu kitu Investigator ESSplex SE QS Kit firmy Qiagen. Analyzujeme celkem 17 STR oblastí, z toho 16 na autozomálních chromozómech a gen pro amelogenin pro identifikaci biologického pohlaví. Analýza probíhá ve dvou základ-

ních krocích – amplifikace a následně fragmentační analýza. Součástí PCR reakce je u tohoto kitu také systém vnitřních kontrol kvality amplifikace, který umožňuje v případě neúspěšné amplifikace přímo odhalit pravděpodobný důvod neúspěchu.

Přístroje, reagentie, software

Přístroje

NanoDrop One (ThermoFisher)
Laminární box Biohazard Faster BH-EN 2004-S (Faster)
Centrifuga Hettich Universal 32R (Hettich)
PCR Box ESCO PCR Cabinet (ESCO)
Suchý blok Dry Bath Incubator (Major Science)
Termocyklér Biometra TRIO (Jena analytik)
3100 Avant Genetic Analyzer (ABI)

Reagentie

Hi-Di Formamide (4311320, ThermoFisher)
10x pufr s EDTA (402824, Applied Biosystems)
POP-7 polymer pro 3100 (4363785, Applied Biosystems)⁹
Matrix Standard BT5 multi-cap (386125, Qiagen)
DNA Size Standard 550 (BTO) (386015, Qiagen)
Investigator ESSplex SE QS Kit (381575, Qiagen)

Verze software

DataCollection, version 2.0
GeneMapper ID, version 3.2.1
Familias, version 3.3

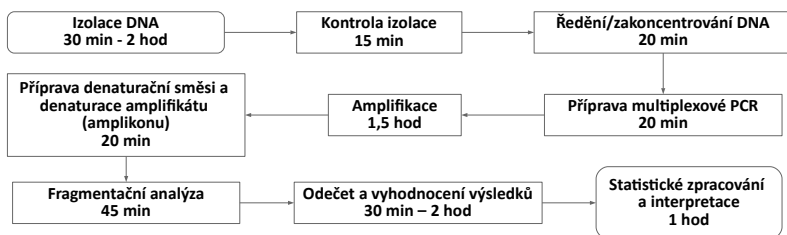
⁹ POP-7 je sice univerzálnější, ale pro fragmentační analýzu se ve větší míře používá POP-4 s kratší (36 cm) kapilárou.

Protokol

Procesní diagram

Nejčastějším zdrojem DNA pro analýzu příbuzenských vztahů nebo jako srovnávací materiál při identifikaci neznámého těla je stěr z bukalní sliznice. V praxi se dále používají různé typy tkání zajištěné při pitvě neznámého těla, případně biologické stopy zajištěné Policií ČR (63).

Izolace DNA z různých typů biologického materiálu a stop biologického původu, s použitím různých postupů a jejich variací, je pro rozsah této kapitoly příliš obsáhlé téma. Za vstupní materiál pro analýzu STR oblastí a sestavení profilu DNA proto považujeme izolovanou DNA se stanovenou koncentrací. Měření koncentrace DNA se standardně provádí pomocí qPCR s fluorescenčním měřením v reálném čase, ale jako rychlý odhad může sloužit spektrofotometrie na NanoDrop One. V případě podezření na degradaci DNA můžeme nasadit kontrolní elektroforézu, kde se degradace DNA projeví jako šmouha (smear).



Obr. 5 Procesní kroky při profilování DNA

Multiplexová PCR

Izolace DNA a stanovení množství izolované DNA pomocí qPCR (64) nebude zde popsána. Vycházíme z bodu, kdy nám kvantifikace DNA pomocí qPCR přinesla informaci o množství DNA, (ne)přítomnosti inhibitorů, přítomnosti mužské DNA a zhodnocení degradace DNA pomocí poměru dlouhých a krátkých amplikonů, popřípadě pomocí poměru signálu jednokopiových a vícekopiových cílových sekvencí.

Ředění DNA

Optimální koncentrace templátové DNA je daná manuálem výrobce; u naší typizační soupravy je stanovena na hodnotu 0,1 ng/μl. Citlivost multiplexové PCR reakce však umožňuje úspěšně analyzovat DNA o koncentraci o jeden řád nižší. Při vyšší koncentraci je možné DNA jednoduše ředit s použitím vody pro PCR. V případě příliš nízké koncentrace je možné využít různé postupy pro zakonzentrování izolátu. Přijatelných výsledků můžeme dosáhnout jednoduchým použitím centrifugačních filtrů Ultracel YM-100 (Microcon) anebo lépe použitím vakuové odparky, případně lyofilizátoru. Podmínkou je mít čisté izoláty DNA bez inhibitorů (nesmí se pro izolaci použít metody jako je QuickExtract, Chelex).

Příprava multiplexové PCR

PCR reakci provádíme v jednotlivých 0,2 mL mikrozkušavkách (můžeme použít také proužky – stripy nebo 96jamkové PCR destičky), které připravíme pro konečný počet reakcí, podle počtu testovaných vzorků včetně pozitivní kontroly, negativní kontroly.

Po rozmražení reagensů připravíme premix pro potřebný počet vzorků, včetně kontrol. Oproti firemnímu manuálu je možné podle naší zkušenosti provádět PCR v polovičním objemu (► tab. 2). Tento postup je však nutné validovat. Pokud chceme započítat ztráty při rozpipetování, je možno použít tzv. „bulharskou konstantu“, v tomto případě násobitel o velikosti 1,17 pro každou položku reakční směsi.

Tab. 2: Objemy premixů v mikrolitrech (μl) pro různé počty reakcí

Počet zkumavek	1	3	4	5	6	7	8	9	10
Nuclease free water (H ₂ O pro PCR)	5	15	20	25	30	35	40	45	50
Fast reaction Mix 2.0	3,75	11,25	15,0	18,75	22,5	26,25	30,0	33,75	37,5
Primer Mix	1,25	3,75	5,0	6,25	7,5	8,75	10,0	11,25	12,5

Premix rozpipetujeme do připravených 0,2 mL zkumavek po 10 µl. Do každé zkumavky s premixem přidáme 2,5 µl testované DNA (0,25 až 0,5 ng DNA), pozitivní kontroly (kontrolní DNA o koncentraci 0,1 ng/µl je součástí kitu) a negativní kontroly (NTC, H₂O pro PCR). Každá reakce obsahuje 12,5 µl reakční směsi, včetně DNA. V případě nízké koncentrace izolované DNA můžeme využít celou kapacitu reakce přidáním až 7,5 µl izolátu (místo vody). S tímto je ale třeba počítat už při přípravě premixu.

Všechny zkumavky důkladně promícháme na vortexu a umístíme do termocykléru. Utáhneme vyhřívané víko (u jiných cyklérů víko dolehne automaticky) a spustíme příslušný program (► tab. 3).

Tab. 3: Amplifikační program ESSplex SE QS

PCR cyklus	Teplota	Čas	Cykly
Denaturace	98 °C	30 s	3 cykly
Annealing (hybridizace)	64 °C	55 s	
Extenze	72 °C	5 s	
Denaturace	96 °C	10 s	27 cyklů
Annealing	61 °C	55 s	
Extenze	72 °C	5 s	
Finální extenze	68 °C	2 min.	
Finální extenze	60 °C	2 min.	
Chlazení	10 °C	∞	

Délka trvání PCR reakce závisí na parametrech použitého termocykléru (na rychlosti změny teploty) a na případných modifikacích programu. V případě použití termocykléru Biometra TRIO a při dodržení programu doporučeného manuálem je to 60 minut.

Amplifikáty je možné do fragmentační analýzy krátkodobě uchovávat v lednici při 6 °C až 8 °C (maximálně 3 dny). Pokud je nutná dlouhodobější archivace při –18 °C až –20 °C, musíme se připravit na možnost odpadávaní adeninu (minus A píky).

Fragmentační analýza

Denaturace amplifikátu

1. Vyjmeme z mrazničky Hi-Di™ Formamide, alelický žebřík (Allelic ladder ESSplex SE QS, je součástí kitu) a DNA size standard 550 (BTO) (je součástí kitu, ale při amplifikaci v polovičním objemu je nutné dokoupit zvlášť), necháme rozmraznout při laboratorní teplotě. Lehce vortexujeme a krátce stočíme před otevřením zkumavek.
2. Připravíme denaturační roztok pro potřebný počet amplifikátů + 1 (Allelic Ladder) (► tab. 4). Při počtu vzorků blížícím se naplnění 96jamkové destičky použijeme více žebříků.

Tab. 4: Objemy denaturačního roztoku v mikrolitech (μl) pro různé počty vzorků

Počet vzorků	1	4	5	6	7	8	9	10
DNA size standard 550 (BTO)	0,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Hi-Di™ Formamide	12	48	60	72	84	96	108	120

3. Denaturační roztok rozpipetujeme do označených 0,2 mL mikrozkušavek (alternativně do stripů nebo 96jamkové PCR destičky)
4. Přidáme 1 μl amplifikátu – každá reakce obsahuje 12,5 μl denaturačního premixu + 1 μl amplifikátu (nebo alelického žebříku AL)
5. Provedeme denaturaci při 95 °C / 3 min. v suchém bloku (alternativně v termocykléru), následně ochladíme v chladicím stojánku 0 °C / > 3 min

Kapilární elektroforéza

Před první analýzou amplifikátů kitu Investigator ESSplex SE QS na přístroji Avant 3100 Genetic Analyzer je nutné provést spektrální kalibraci s použitím matrice Matrix Standard BT5 multi-cap (Qiagen). Správný postup pro spektrální kalibraci najdeme v technickém manuálu k přístroji. Dále potřebujeme provést instalaci souborů obsahujících DNA Size Standard, panel, biny pro identifikaci alel – soubory poskytně

dodavatel kitu a aplikační specialista firmy ochotně pomůže s instalací a nastavením analyzátoru.

V nabídce Modul Manager sestavíme Run Modul, který určuje parametry elektroforézy (mimo jiné podle délky použité kapiláry a typu polymeru).

V nabídce Protokol Manager kombinujeme zvolený Run Modul a příslušný Dye Set obsahující příslušnou barevnou matici (Matrix Standard). Tím vytvoříme Instrument Protokol.

Výše uvedené kroky provedeme pouze jednou a pokud není potřeba modifikovat podmínky elektroforézy nebo analýzy, jsou parametry nastaveny pro opakované použití při fragmentační analýze amplifikátů příslušného kitu.

Postup při obsluze Přístroje Avant 3100 Genetic Analyzer

1. Vytvoření plánu analýzy: spustíme ovládací PC a počkáme na úplné naběhnutí systému, včetně zálohování dat → spustíme analyzátor, počkáme až svítí zelená → spustíme SW DataCollection.
2. Z nabídky v levé záložce rozklikneme postupně GA Instruments → ga3100-Avant → z nabídky zvolíme Plate Manager → v dolní části políčko New – doplníme název (např. RR-MM-DD-ESSplex-operátor), aplikaci (GeneMapper-GX270ABI3100), jméno zadavatele a jméno operátora → OK.
3. Objeví se tabulka PlateEditor: Podle pozice vyplníme název vzorku, typ vzorku (Sample, Positive Control, Negative Control, Allelic ladder), velikostní standard (SST-BTO-60-550 bp), panel (ESSplex_SE_QS_v2), metodu analýzy (ESS_Qiagen), Results Group (zvolený adresář pro ukládání hrubých dat z analýzy), Instrument Protocol → OK.
4. Z nabídky v levé záložce rozklikneme postupně GA Instruments → ga3100-Avant → ABI 3100 Avant → Run Scheduler → zvolíme Plate View → v hlavní části obrazovky najdeme vytvořený plán destičky (Find Plate Matching ...) zvolíme Type of Search (Advanced) → Plate ID – Start with – začátek názvu ID destičky (doporučuje se využít značení, založené na datumu, viz níže) → Search → vybrat Plate

- Name → označit kliknutím → přenést kliknutím do žlutého platíčka → plato zezelená.
5. Zvolíme Spectral Viewer → zvolíme příslušný Dye Set a zkontrolujeme aktivní kalibraci – Matrix Standard BT5 multi-cap (Qiagen).
 6. Spustíme analýzu (zelenou šipkou vlevo nahoře).

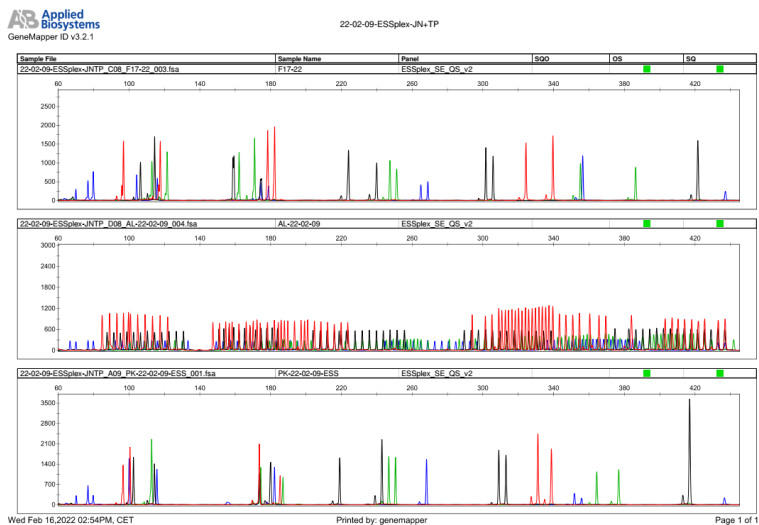
Doba trvání jednoho běhu (runu) v případě použití 50cm kapiláry a polymeru POP-7 je asi 50 min. V případě výrobcem doporučeného polymeru POP-4 a 36cm kapiláry bude běh rychlejší.

Vyhodnocení výsledků

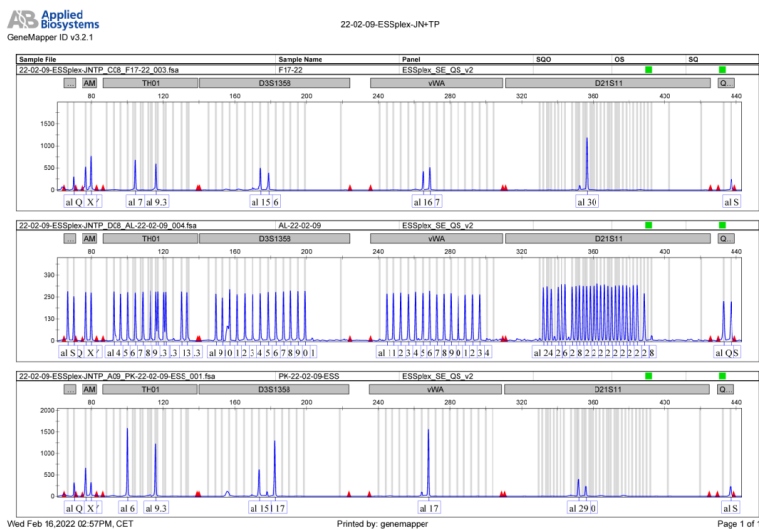
Hodnocení výsledků je prováděno v programu GeneMapper ID, ve kterém se pro každé hodnocení vytvoří samostatný Projekt (je dobré používat jednotný systém pro tvorbu názvu Projektu, třeba RRMM-DD-název kitu-operátor, například 22-02-15-ESSplex-TP). Do projektu vložíme hrubá data z fragmentační analýzy vzorků, pozitivní a negativní kontroly a Alelického ladderu, potom spustíme analýzu. Pokud proběhne úspěšně, program identifikuje všechny píky a přidělí jim označení jednotlivých alel ve všech lokusech (► **obr. 6–10**).

Pro odečet a zápis je možné zvolit manuální postup, nebo export výsledků ve zvoleném formátu tabulky (► **obr. 11**). V každém případě je nutná fyzická kontrola výsledků analýzy operátorem/expertem.

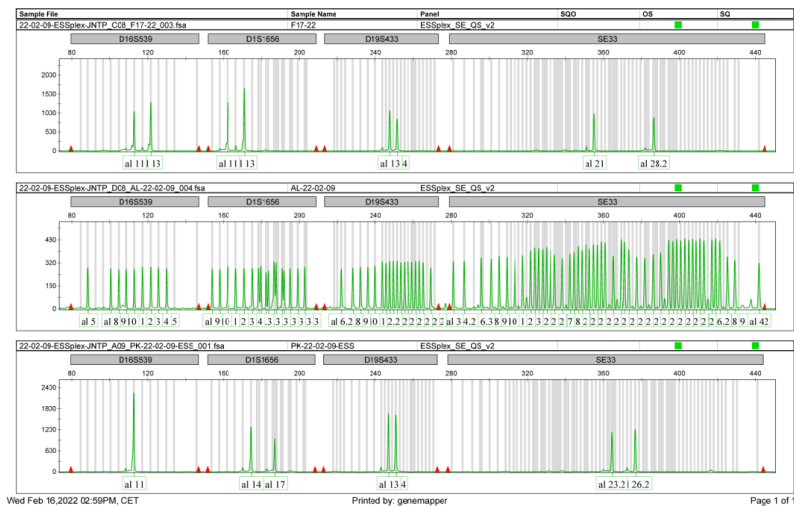
Vzorový výsledek



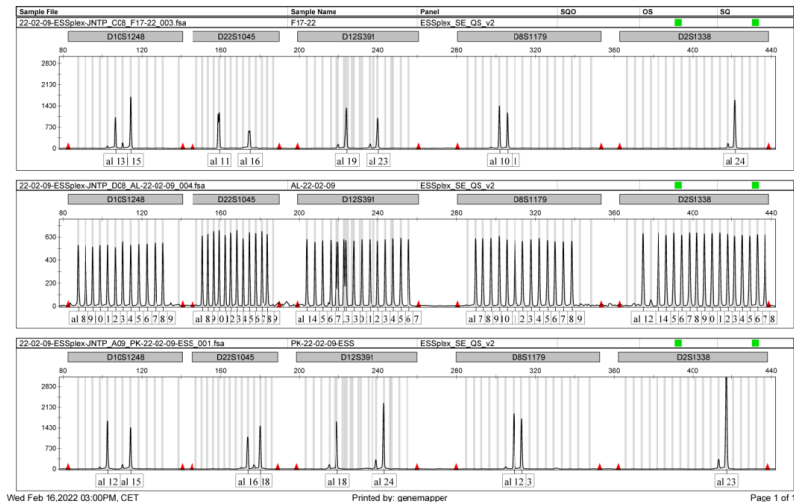
Obr. 6 Výsledek analýzy jednoho vzorku, Allelic Ladder (AL),
Pozitivní kontrola (PK) – všechny barvy



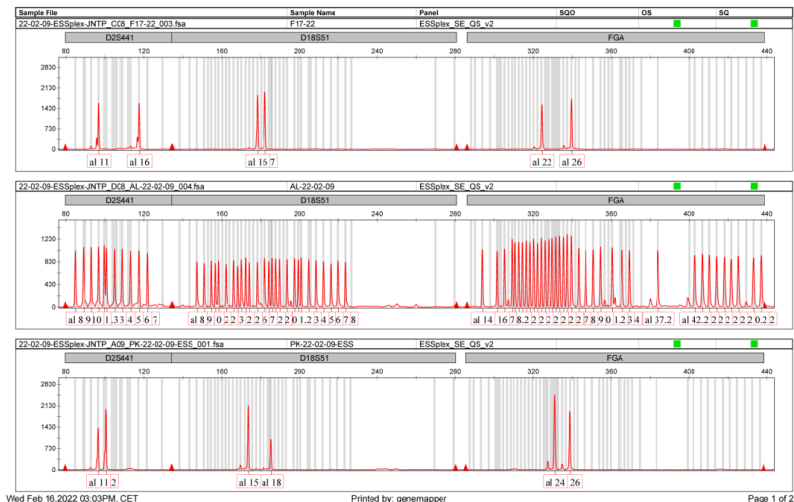
Obr. 7 Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK modrý fluorescenční kanál



Obr. 8 Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK zelený fluorescenční kanál



Obr. 9 Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK žlutý fluorescenční kanál (zobrazený černě)



Obr. 10 Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK červený fluorescenční kanál

Sample Name	Run Name	Panel	Marker	Allele 1	Allele 2	Allele 3	Allele 4	Allele 5
1 F17-22	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	D2S441	11	16			
2 F17-22	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	D18S51	16	17			
3 F17-22	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	FGA	22	26			
4 AL-22-02-09	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	D2S441	8	9	10	11	11.3
5 AL-22-02-09	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	D18S51	8	9	10	10.2	11
6 AL-22-02-09	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3889	ESSplex_SE_QS_v2	FGA	14	16	17	18	18.2
7 PK-22-02-09-ESS	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3891	ESSplex_SE_QS_v2	D2S441	11	12			
8 PK-22-02-09-ESS	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3891	ESSplex_SE_QS_v2	D18S51	15	18			
9 PK-22-02-09-ESS	Run_ABI3100Avant_2022-02-09_11-57_3891	ESSplex_SE_QS_v2	FGA	24	26			

Wed Feb 16, 2022 03:03PM, CET | Printed by: genemapper | Page 2 of 2

Obr. 11 Export výsledků v podobě tabulky

Komentář a řešení problémů

V ideálním případě by měl být získaný profil DNA úplný, s balan-
ovaným signálem na úrovni lokusu a na úrovni fluorescenční značky,
s pěkným tvarem píku a s optimální výškou každého píku. Ideální svět
a 100% jistota neexistuje, takže se můžeme setkat s těmito problémy:

Problém	Příčina a řešení
✓ qPCR kvantifikace ukazuje nulu	✓ Nebyla přidána DNA do reakce. Opakovat a ten- tokrát už pořádně. Pokud opakování přinese opět nulu: s tímto vzorkem neztrácíme čas. Kde nic není, ani STR nebere.
✓ Vnitřní kontroly QS1 a QS2 dávají signál, ale signál alel není přítomen	✓ Nebyla přidána DNA do reakce. Opakovat a tento- krát už pořádně.
✓ Vnitřní kontroly QS1 a QS2, stejně jako signál alel chybí	✓ Úplné selhání PCR. Nebyl přidán reakční koktejl, špatně zavřená zkumavka se vypařila. Opakovat.
✓ Vnitřní kontrola QS1 v pořádku, QS2 má snížený signál, u alel se projevuje efekt lyžařské sjezdovky (ski slope effect)	✓ V reakci jsou přítomny inhibitory. DNA přečistíme nebo 10× naředíme. Vybíráme metodu izolace DNA, která se zbavuje inhibitorů na první dobrou.
✓ Vysoký stutter, rozkmitaná základní linie (baseline), bleedthrough, -A artefakty	✓ V reakci je příliš mnoho templátu. Kvantifikujeme DNA pomocí qPCR.
✓ Nízký signál amelogeninu, přičemž zbytek profilu je v pořádku.	✓ Nedostatečně odbařený etanol v posledních kro- cích izolace DNA. Nezkracujeme krok pro odba- ření DNA (zároveň DNA nepřesuší).
✓ Špatné vyvážení signálu mezi lokusy.	✓ Primerové páry nedostatečně promíchány. Vortex- ujeme 15 sekund. ✓ Nepřesné pipetování. Viskózní roztok pipetujeme pomalu. Pro správné pipetování viz https://www.youtube.com/ watch?v=QGx490kuKjg .
✓ Špatné vyvážení signálu mezi fluo- rescenčními kanály	✓ Použijeme správný balík barev (dye set).
✓ N + 1 artefakty u alel	✓ Použití nesprávného POP polymeru anebo ne- správně dlouhé kapiláry. Použijeme doporučené.
✓ Degradace vnitřního standardu nebo pozitivní kontroly	✓ Příprava standardu nebo kontroly s příliš velkým časovým předstihem. Ředíme a připravujeme těsně před použitím.
✓ Alelický žebřík s ramenem doprava, špatně odměřený	✓ Špatná kapilára. Vyměníme kapiláru.
✓ Artefakty v negativní kontrole	✓ Dlouhodobé skladování PCR mixu při pokojové teplotě. Ředíme a připravujeme těsně před použitím.
✓ Špatné vyvážení signálu mezi lokusy, mezi fluorescenčními kanály a mezi alelami na lokuse.	✓ Eluční pufr s vysokým obsahem EDTA, který vychytává hořčíkové kationty, potřebné pro poly- merázu. Používáme eluční pufr s EDTA s maximál- ní koncentrací 0,1 mM.

Problém	Příčina a řešení
✓ Výsledek na STR elektroforetogramu je s nízkým signálem, neodpovídá výsledku qPCR kvantifikace	✓ Špatné PCR destičky, netěsnící adhezivní filmy nebo víčka PCR zkumavek a destiček způsobující odpar reakční směsi, špatná kalibrace fluorescenčních spekter, špatný tepelný přenos kvůli použití jiného cykléru, hliníkového PCR bloku nebo neoriginálních PCR zkumavek/destiček. U cyklérů je možno nastavit rychlost změny teploty (ramp rate).
✓ Vnitřní kontroly QS1 i QS2 v pořádku, u alel se projevuje efekt lyžařské sjezdovky	✓ DNA je degradovaná. Je možno zkusit delší nástřik, do PCR dát více templátu nebo lépe profilovat DNA pomocí miniSTR (STR s krátkými amplikony).
✓ Příliš vysoké (široké a nahoře uřízlé), případně rozdvojené píky, vysoké pozadí	✓ Příliš mnoho templátové DNA. Je nutno více ředit DNA.
✓ U alel se projevuje efekt <i>Golden Gate</i> (doslovný překlad je Zlatá brána, což u nás může evokovat dětské říkadlo, přičemž originální název evokuje investiční firmu, která se zabývá zlatem a stříbrem. Navrhují český termín „efekt U-rampy“, abychom se drželi lyžařské terminologie).	✓ Lokusy se střední délkou amplikonů mají nižší signál než krátké a dlouhé lokusy. Formamid je hygroskopický a vychytal vodu ze vzduchu, což způsobilo jeho rozklad na kyselinu mravenčí a čpavek. Pokud má formamid konduktivitu větší než 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, soutěží s fragmenty DNA při vstupu do kapiláry. Použijeme alikvoty deionizovaného formamidu, po rozmražení spotřebujeme.
✓ Malé nebo žádné píky, delší lokusy neúspěšně amplifikovány	✓ Malé množství DNA – upravíme ředění DNA, zvýšíme množství izolátu do PCR. ✓ Inhibice – ředění izolátu, opakovaná izolace.
✓ Blíže nespecifikované nebo kombinované problémy elektroforetogramu	✓ Zanedbaná údržba sekvencéru. Dodržujeme servisní plán. ✓ Koextrakce detergentu, krystalizace močoviny, solí, kovových iontů nebo jiných inhibitorů. DNA přechistíme kolonkou. Dodržujeme technologickou kázeň.

Poděkování

Kapitola byla vypracována za přispění grantových projektů VI20202022123, LM2018133, LM2018125, LM2018132, CZ.02.1.01/0.0/0.0/0.0/16_019/0000868, CZ.02.1.01/0.0/0.0/0.0/16_026/0008448, EF16_013/0001674, IGA LF UP 2022_012.

Kapitola 3:

Identifikace neznámého zvířecího druhu

Markéta Dajbychová

Genomia, s.r.o., Plzeň

Úvod

Ve forenzní praxi se setkáváme také s potřebou analyzovat zvířecí genom. Zvíře se ve forenzním případě může vyskytovat v roli oběti, v roli svědka nebo v roli pachatele. Někdy je zřejmé, o jaký zvířecí druh se v případě jedná a je možné přistoupit k identifikaci zvířecího jedince stanovením STR nebo SNP identifikačního profilu, jindy je potřeba nejprve zjistit, z jakého zvířecího druhu nalezená forenzní stopa pochází. Přístupů k druhové identifikaci zvířat existuje několik – analyzují se mitochondriální geny (např. části cytochrom c oxidázy I, podjednotky rRNA) i jaderné geny a pseudogeny (např. *ITSL*, *EEF1A*).

Pro forenzní aplikace je výhodná analýza mitochondriálních genů, neboť mitochondriální DNA (mtDNA) je hojně přítomna i u více degra-dovaných vzorků, mtDNA je haploidní a je přítomna v buňce v mnoha kopiích. Mitochondriální DNA obecně nese větší množství mezidruhových rozdílů než jaderná DNA, protože její mutační rychlost je asi

20× vyšší než u jaderné DNA. Na druhou stranu v mitochondriích jsou zapsány evolučně velmi konzervované geny, které mají úseky mezidruhově shodné (místa vhodná pro nasednutí cílených primerů) a zároveň tato místa obsahují druhově specifické sekvence. Toho využívá fylogenetická technika zvaná DNA barcoding, která získala status globálního standardu pro druhovou identifikaci (*The Barcode of Life Initiative*, BOLI). Univerzálním párem primerů je možné amplifikovat úsek, který nese naprosto specifické sekvence pro různé prokaryotní, houbové, živočišné i rostlinné druhy. Získané sekvence lze pak porovnat s referenčními genovými knihovnami, například bioinformatickým nástrojem BLAST (*the Basic Local Alignment Search Tool*), a vyhledat druh vykazující nejlepší shodu.

Markery používané pro DNA barcoding u různých skupin organismů:

- ▶ prokaryota: *ITS* (65), *COI* (66), *rbcL* (67), *18S* (68), *28S* (67), *23S* (69), z toho bakterie: *COI* (70), *rpoB* (71), *16S* (72), *cpn60* (73), *tuf* (74), *RIF* (75), *gnd* (76),
- ▶ houby: *ITS* (77), *TEF1α* (78), podjednotky RNA polymerázy II, *18S* (79), *28S* (80),
- ▶ rostliny: *matK* (81), *rbcL* (82), *psbA-trnH* (83), *ITS* (84),
- ▶ živočichové: *COI* (85), *Cytb* (86), *12S* (87), *16S* (88).

Primery pro amplifikaci uvedených specifických markerů lze vyhledávat ve webové databázi BOLD (*Barcode of Life Data System*) http://v4.boldsystems.org/index.php/Public_Primer_PrimerSearch.

V následujících odstavcích se zaměřím na druhovou identifikaci čtyř živočišných vzorků, pocházejících z různých forenzních případů, analýzou úseku jejich *16S* rRNA metodou přímého DNA sekvenování. Izolovaná DNA se používá jako templát do PCR reakce s primery specificky se vážícími do mitochondriálního genu pro *16S* rRNA. Dále se provádí kontrola správné amplifikace vizualizací PCR produktu na agaróзовém gelu. Následně se PCR produkt enzymaticky přečišťuje soupravou ExoSAP-IT, která hydrolyzuje nespotřebované primery a nukleotidy. Přečištěný PCR produkt slouží jako templát v cyklické sekvenační re-

akci s fluorescenčně značenými dideoxynukleotidy (ddNTP), které fungují jako terminátory polymerázové reakce. Při dostatečném množství kroků polymerázové reakce vzniknou různé dlouhé fragmenty, končící dideoxynukleotidem, označeným specifickou fluorescenční značkou.

Souprava BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit obsahuje následující fluorescenční značení dideoxynukleotidů: ROX, TAMRA™, Rhodamine 110, Rhodamine 6G. Množství templátu přidávaného do sekvenační reakce se upravuje na základě fluorometricky zjištěné koncentrace PCR produktu soupravou Qubit IX dsDNA HS Assay Kit. Produkt sekvenační reakce se přečišťuje soupravou BigDye X Terminator Purification Kit, která pomocí mikrokuliček s aktivním povrchem vyváže ze sekvenačního produktu přebytečné soli, nespotřebované nukleotidy a dideoxynukleotidy. Posledním krokem analýzy je přímé sekvenování DNA kapilární elektroforézou v genetickém analyzátoru ABI3130/3130XL. Produkty cycklé sekvenační reakce se při kapilární elektroforéze seřadí podle délky a postupným snímáním fluorescence koncového nukleotidu se odečítá výsledná sekvence. Získaná hrubá data se převádějí na sekvenci, která se porovnává s genovou databází s cílem najít organizmy s největší shodou v sekvenci.

Přístroje, reagentie, software

Laboratorní přístroje a vybavení

MagCore HF16 Plus; katalogové číslo: MCA1603;

výrobce: RBC Bioscience; dodavatel: KRD

Biometra TProfessional Basic; katalogové číslo: 846-070-601;

výrobce: Analytik Jena; dodavatel: Biotech

MS 300V Power Supply for Electrophoresis; katalogové číslo:

MS-MP-300V; výrobce: Major Science; dodavatel: Biotech

OWL D2; katalogové číslo: D2; výrobce: Owl; dodavatel: Biotech

T100 Thermal Cycler; katalogové číslo: T100; výrobce: Biorad;

dodavatel: Biotech

Qubit Fluorometer Q 32857; katalogové číslo: Q32857;

výrobce: Invitrogen; dodavatel: Thermo Fisher Scientific

pipetovací špičky pro 1–200 µl Bevelled, wide bore (1,5 mm);
katalogové číslo: 613-1297; výrobce: Axygen; dodavatel: VWR

IKA MS 3 Basic; katalogové číslo: 6450-0210; výrobce: IKA;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific

Centrifuge Galaxy 16DH; katalogové číslo: 521-2839; výrobce: VWR;
dodavatel: VWR

ABI3130 Genetic Analyzer; katalogové číslo: 313001R;
výrobce: Applied Biosystems™; dodavatel: Thermo Fisher Scientific

MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical 96-Well Clear Reaction Plate,
katalogové číslo: A36924; výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific

Software

Sequencing Analysis 5.2 (výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific)

BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) – webový software
dostupný na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Clustal Omega – webový software dostupný
na <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Reagencie

MagCore Genomic DNA tissue kit
(MGT-02 401; výrobce: RBC Bioscience; dodavatel: KRD)

MagCore Forensic DNA Direct Kit
(MFC-03 406; výrobce: RBC Bioscience; dodavatel: KRD)

Taq DNA polymerase 1.1 (koncentrace 1 U/µl), PCR Blue buffer w/o
Mg²⁺ (10X koncentrovaný); (T114; výrobce a dodavatel: Top-Bio)

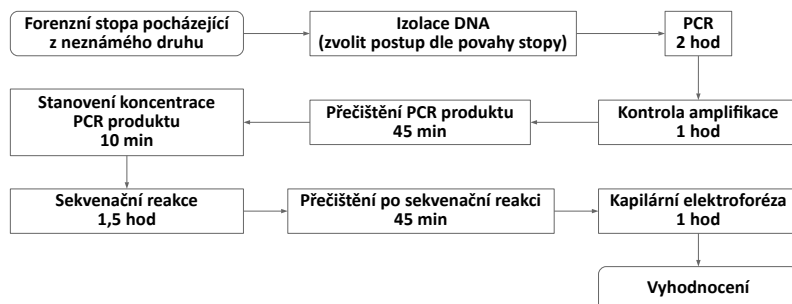
25 mmol/L MgCl₂ (T059; výrobce a dodavatel: Top-Bio)

Deoxynucleotide Mix, 10 mM
(D7295; výrobce: Sigma-Aldrich; dodavatel: Merck)

Water, PCR Grade (PCRH20-RO; výrobce: Roche; dodavatel: Merck)
primery zakázkově připravované (Merck)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use
(SM0243; výrobce: UAB Fermentas; dodavatel: Biogen)
Ethidium bromide solution
(E1385; výrobce: Sigma-Aldrich; dodavatel: Merck)
Tris-Borate-EDTA buffer 5X
(T6400; výrobce: Sigma-Aldrich; dodavatel: Merck)
Agarose (A9539; výrobce: Sigma-Aldrich; dodavatel: Merck)
ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup Reagent
(75001.1.EA; výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific)
Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit (Q33230;
výrobce: Invitrogen; dodavatel: Thermo Fisher Scientific)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
(4337458; výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific)
BigDye X Terminator Purification Kit
(4376487; výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific)
POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers
(4363785; výrobce: Applied Biosystems™;
dodavatel: Thermo Fisher Scientific)

Protokol

Procesní diagram



Obr. 12 Procesní kroky při identifikaci neznámého druhu Sangerovým sekvenováním

Příprava vzorku a PCR

Cílem postupu je amplifikace fragmentu mitochondriálního genu pro 16S rRNA (► **obr. 12**). Tento fragment je obsažen v genomech napříč živočišnými druhy, proto je třeba maximálně dodržovat pravidla nejlepší laboratorní praxe pro zamezení kontaminace externí mtDNA. Izolaci vzorku provádíme v laminárním či biohazardním boxu. Postup izolace DNA volíme dle povahy vstupního materiálu. Pro zpracování zvířecích forenzních stop můžeme použít například MagCore Genomic DNA tissue kit nebo MagCore Forensic DNA Direct Kit, které jsou oba vhodné pro automatickou izolaci nukleových kyselin přístrojem MagCore HF16 Plus.

Pro další manipulace se vzorkem používáme DNA/RNA free plasty, pokud možno silanizované proti ulpívání vzorků na povrchu (LoBind); pro manipulace se vzorkem používáme špičky s filtrem.

Připravíme DNA izolovanou z forenzní stopy. Na spektrofotometru zkontrolujeme čistotu a koncentraci vzorku. Optimální hodnoty poměru absorbancí A_{260}/A_{280} vzorku DNA jsou mezi 1,7 a 1,9. Koncentrace by měla přesahovat 2 ng/μl.

Sekvence primerů pro amplifikaci úseku 16S rRNA (89):

M13U16S-F: ACCGTGCAAAGGTAGCATAAT

M13U16S-R: TCCGGTCTGAACTCAGATCAC

Připravíme reakční mix pro PCR dle následujícího rozpisu (► tab. 5):

Tab. 5: Objemy PCR reagensií ve směsi

Reagencie	1 reakce, celkový objem 20 μ l
Water, PCR Grade	12,65 μ l
PCR Blue buffer w/o Mg^{2+} (10X)	2,0 μ l
Deoxynucleotide Mix	0,4 μ l
25 mM $MgCl_2$	0,67 μ l
Primer forward M13U16S-F 20 μ M	0,54 μ l
Primer reverse M13U16S-R 20 μ M	0,54 μ l
Taq DNA polymeráza 1.1 (1 U/ μ l)	1,0 μ l
DNA	2,2 μ l

Napipetujeme PCR reakci pro požadovaný počet vzorků, přičemž zařadíme vzorek pro pozitivní kontrolu amplifikace a vzorek NTC (non-template control sample). Objem navýšíme tak, abychom kompenzovali pipetovací ztráty (například o 17 %). PCR pipetujeme v pre-PCR laboratoři v PCR boxu nebo laminárním boxu za dodržení všech opatření na zamezení kontaminace vzorků.

PCR provedeme v termocykléru Biometra TProfessional Basic či jiném cykléru se srovnatelnou teplotní charakteristikou. Amplifikační profil:

iniciální denaturace	94 °C, 180 s
cyklování 35×:	
denaturace	94 °C, 40 s
annealing	56 °C, 45 s
extenze	72 °C, 45 s
finální extenze	72 °C, 10 min

Po PCR provedeme kontrolu amplifikace vizualizací DNA fragmentů na 2% agarózovém gelu barveném interkalačním činidlem (například

ethidium bromidem nebo lépe jeho nekarcinogenní alternativou) za použití elektroforetické soupravy, například OWL D2, a zdroje stejnosměrného proudu, například MS 300V Power Supply. Pracujeme v laboratoři pro post-PCR aplikace. Sledujeme specifickou amplifikaci u jednotlivých stop a u pozitivního kontrolního vzorku a absenci PCR produktů ve vzorku NTC. Amplifikované úseky mají přibližně velikost 500 bp, kterou ověříme porovnáním s velikostním standardem GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

Přečištění PCR produktu, stanovení koncentrace a sekvenační reakce

Přečištění PCR produktů provedeme pomocí přečišťovací soupravy ExoSAP-IT PCR Product. Na 10 µl PCR produktu přidáme 4 µl ExoSAP-IT. Přečištění probíhá v termocykléru Biorad T100 při teplotním profilu:

inkubace 37 °C, 15 min

inkubace 80 °C, 15 min

Při prvním kroku inkubace dochází ke hydrolytickému štěpení volných primerů a defosforylaci nezačleněných nukleotidů. Při druhém inkubačním kroku dochází k tepelné deaktivaci enzymů.

Stanovení koncentrace PCR produktu provedeme fluorometricky soupravou Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit na přístroji Qubit Fluorometer Q 32857. Napipetujeme 199 µl Qubit 1X dsDNA HS Working Solution do označené 0,5 mL zkumavky, přidáme 1 µl přečištěného PCR produktu. Krátce zvortexujeme a inkubujeme při laboratorní teplotě přibližně 2 minuty. Zkumavku pak vložíme do přístroje Qubit Fluorometer Q 32857 a změříme koncentraci v jednotkách µg/mL.

Sekvenační reakci provádíme použitím soupravy BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, který obsahuje Ready Reaction Mix a BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X). Připravíme reakční mix dle následujícího rozpisu (► tab. 6):

Tab. 6: Objemy reagensií pro Sangerovo sekvenování

Reagencie	1 reakce, celkový objem reakce 15 µl
Ready Reaction Mix	0,6 µl
BigDye Sequencing Buffer (5X)	3,9 µl
Primer forward M13U16S-F (5µM)	1,0 µl
Templát	4,0 ng PCR produktu do celkové reakce
Water, PCR Grade	doplnit do 15,0 µl

Cyklická sekvenační reakce probíhá v termocykléru Biorad T100 či jiném cykléru se srovnatelnou teplotní charakteristikou. Amplifikační profil:

denaturace 96 °C, 180 s

cyklování 30*

96 °C, 10 s

50 °C, 5 s

60 °C, 2 min

Přečištění produktů cyklické sekvenační reakce provádíme pomocí soupravy BigDye X Terminator Purification Kit, která obsahuje SAM Solution a XTerminator Solution (roztok s mikrokuličkami). SAM Solution krátce zvortexujeme; k celému objemu produktu sekvenační reakce (15 µl) přidáme 30 µl roztoku SAM a 20 µl vody Water, PCR Grade. K přečišťovanému produktu sekvenační reakce přidáme 6 µl roztoku XTerminator Solution. Pipetujeme špičkou s průměrem nasávacího otvoru větší než 1 mm, například pipetovací špičky výrobce Axygen, katalogové číslo: 613-1297. Roztok důkladně vortexujeme před každým nabráním. Takto připravený mix umístíme do třepačky IKA MS 3 Basic. Třepačku nastavíme na rychlost třepání 3000 1/min a čas 30 min. Po ukončení třepání centrifugujeme vzorky při 1300 g po dobu 2 minut v centrifuze Galaxy 16DH. Opatrně odebereme do čisté zkumavky / PCR destičky roztok nad usazenými mikrokuličkami.

Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforézu provedeme na přístroji ABI3130 nebo ABI3130xl s použitím separačního prostředí polymeru POP-7 a kapilár o délce 36 cm.

Do PCR destičky MicroAmp™ EnduraPlate napipetujeme 10 µl přečištěných produktů cyklické sekvenační reakce a destičku krátce stočíme. Destičku umístíme do analyzátoru ABI3130/ ABI3130xl, nastavíme parametry sekvenačního běhu a běh spustíme. Kapilární elektroforézu provádíme s nastavením sekvenační chemie dye set Z_BigDyeV3 a Run modulu UltraSeq36_POP7 o parametrech elektroforézy:

Teplota	60 °C
PreRun Voltage	15 kV
PreRun Time	180 s
Injection Voltage	1,2 kV
Injection time	13 s

Každý sekvenátor je však unikát a parametry napětí a injekčního času je nutno verifikovat. Analyzační protokol zvolíme dle nastaveného modulu a setu fluorescenčních značení: KB_3130_POP7_BDTv3.mob

Vzorový výsledek

Data z kapilární elektroforézy jsou uložena v souborech s příponou *.abl. Tyto soubory lze prohlížet v různých softwarech; pro Windows jsou vhodné Sequencing Analysis, Chromas Lite, ABI Sequence Scanner, ABI Peak Scanner, BioEdit a další. Takové softwary dokáží prohlížet píky, kvalitu piků a exportovat výstupy v různých formátech:

- ▶ *.phd.l textový soubor s odečtenou sekvencí, kde u každé báze je uveden ukazatel kvality
- ▶ *.seq textový soubor s odečtenou sekvencí je formátu Fasta
- ▶ *.txt textový soubor s odečtenou sekvencí

Nejprve je třeba posoudit kvalitu jednotlivých piků. Software Sequencing Analysis, který bývá běžnou součástí dodávky přístroje ABI3130/

ABI3130xl, stanovuje kvalitu zjištění každé jednotlivé báze (parametr quality value /QV/) – barevně označuje, které báze jsou akceptovatelné, báze, u kterých je třeba vizuální kontrola, a báze, které nejsou akceptovatelné. Je třeba prohlédnout naměřená data a u bází s nižší QV provést ruční odečet výsledné báze. Obdobnou funkci umožňují i ostatní zmíněné softwary. Zkontrolovanou sekvenci dat je možné exportovat ve formátu Fasta nebo jako prostý text.

Pro zjištění, kterému druhu sekvence patří, je třeba porovnat sekvenci s databází GenBank, k čemuž je vhodný webový software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), který vyhledává oblasti podobnosti mezi biologickými sekvencemi. Program porovnává vložené nukleotidové nebo proteinové sekvence s databázemi sekvencí GenBank a vypočítává statistickou významnost podobnosti. Sekvence se vkládá jako text či Fasta do vyhledávacího pole, nebo ji lze importovat přímo ze souboru. Vyhledávací parametry lze optimalizovat, nicméně pro základní vyhledání stačí pouze vložit sekvenci a stisknout tlačítko BLAST. Doba prohledávání genové databáze je úměrná délce sekvence.

Výstupem BLASTu je přehledová tabulka řazena sestupně od organizmů s nejlepší shodou se zadanou sekvencí (►obr. 13). Tabulka zahrnuje latinský taxonomický název organismu, odkaz na databázovou sekvenci, procento identity (% bází, které jsou identické s referenčním genomem), *query coverage* (% délky shody kontigu, které odpovídá nálezu v NCBI databázi), *E value* (počet náhodně očekávaných zásahů → čím je E hodnota nižší, tím lépe). BLAST dokáže zobrazit i taxonomický strom a zařadit do něj porovnávanou sekvenci.

Pro ilustraci zde uvádím alignment sekvencí vzorků z různých forenzních případů (►obr. 14 a 15). Vzorky byly jednoznačně identifikovány a přísluší zástupcům různých zvířecích kmenů. Na ukázce je patrná mezidruhovná odlišnost sekvencí. Alignment byl proveden webovým bioinformatickým softwarem Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (90).

< Edit Search

Save Search

Search Summary ▾

Job Title

Nucleotide Sequence

RID

XX4TCZF601R

Search expires on 01-13 15:37 pm

Download All ▾

Program

BLASTN [Citation ▾](#)

Database

nt [See details ▾](#)

Query ID

lcl|Query_456775

Description

None

Molecule type

dna

Query Length

465

Other reports

[Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism

only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download ▾

new Select columns ▾

Show 100 ▾

[?](#)

☒ select all

100 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

new [MSA Viewer](#)

	Description ▾	Scientific Name ▾	Max Score	Total Score	Query Cover	E value ▾	Per. Ident %	Acc. Len ▾	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Gadus morhua mitochondrion, complete genome	Gadus morhua	857	857	99%	0.0	100.00%	16616	MN122852.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gadus morhua genome assembly, organelle, mitochondrion	Gadus morhua	857	857	99%	0.0	100.00%	16656	LS999407.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Gadus morhua genome assembly, organelle, mitochondrion	Gadus morhua	857	857	99%	0.0	100.00%	16656	LS999106.1

Obr. 13 Ukázkový výpis výsledku BLASTu pro sekvenci části 16S RNA druhu treska obecná (*Gadus morhua*)

Gadus morhua mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [MN122852.1](#) Length: 16616 Number of Matches: 1

Range 1: 2127 to 2590 [GenBank](#) [Graphics](#)

▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
857 bits(464)	0.0	464/464(100%)	0/464(0%)	Plus/Plus
Query 1	TATGAATGGCATCACGAGGGCTTAGCTGTCTCCATCTCCAGTCAATGAAATTGACCTCC	60		
Sbjct 2127	TATGAATGGCATCACGAGGGCTTAGCTGTCTCCATCTCCAGTCAATGAAATTGACCTCC	2186		
Query 61	CCGTGCAGAGGCGGGGATAATTACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACCTAA	120		
Sbjct 2187	CCGTGCAGAGGCGGGGATAATTACATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAGACCTAA	2246		
Query 121	AGTAAGTCACGTTTAAACATGCTGTGATAACAGTAAAACTTAGTGATATTACTGAAGTG	180		
Sbjct 2247	AGTAAGTCACGTTTAAACATGCTGTGATAACAGTAAAACTTAGTGATATTACTGAAGTG	2306		
Query 181	TCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACACACAACCCCATGTGGACGGGGATATTATC	240		
Sbjct 2307	TCTTTGGTTGGGGCGACCGCGGGGTAACACACAACCCCATGTGGACGGGGATATTATC	2366		
Query 241	CCTAATACTCAGAGCCTCTACTCCAAGTAACAGAAATTTGACTTTTCTGATCCGGTATA	300		
Sbjct 2367	CCTAATACTCAGAGCCTCTACTCCAAGTAACAGAAATTTGACTTTTCTGATCCGGTATA	2426		
Query 301	ACCGATCAACGAACCGAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCTCAGAGCCATA	360		
Sbjct 2427	ACCGATCAACGAACCGAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCTCAGAGCCATA	2486		
Query 361	TCGACGAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCTTAATGGTGACGCGCTA	420		
Sbjct 2487	TCGACGAGGGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCTTAATGGTGACGCGCTA	2546		
Query 421	TTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGA	464		
Sbjct 2547	TTAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAAAGTCCTACGTGATCTGA	2590		

Obr. 14 Detail alignmentu sekvence části 16S RNA druhu treska obecná (*Gadus morhua*) s referenční sekvencí MN122852.1

Kapitola 3: Identifikace neznámého zvířecího druhu

63

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment	
lunak_cerveny	GTATGAATGGCTAAACGAGGCCCTTAACTGCTCTTACAGATAGTCAGTGAAATTGATCTC 60
treska_obecna	-TATGAATGGCATCACGAGGGCTTAACTGCTCTTACAGATAGTCAGTGAAATTGATCTC 59
pes_domaci	-TATGAATGGCATCACGAGGGCTTAACTGCTCTTACAGATAGTCAGTGAAATTGATCTC 59
tur_domaci	-TATGAATGGCATCACGAGGGCTTAACTGCTCTTACAGATAGTCAGTGAAATTGATCTC 59

lunak_cerveny	CCTGTGCAAAAGCAGGAATAAGCACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAACCTTAAAAATCA 120
treska_obecna	CCCGTCAGAGGGCGGGGATAATTACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAACCTTAAAAATCA 119
pes_domaci	CCCGTCAGAGGGCGGGGATAATTACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAACCTTAAAAATCA 119
tur_domaci	CCCGTCAGAGGGCGGGGATAATTACATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAACCTTAAAAATCA 119
** * * * *	
lunak_cerveny	GCAGCCATGCACACAAGATACGCACCTACTAGGTCTACAACATAAACCTTAATGCTGGC 180
treska_obecna	AAGTAAGTCACGTTTAACTAGCTGTGATAACAGTAAAAAC-----TTAGTGATATTACT 174
pes_domaci	TAACCCAACTTATGGATACATAGTACCTACAAGGCATAACATAACACCTATTATTATGAG 179
tur_domaci	CAACCCAAAGAGATAAGATTTTAACCATTA-----GGAATAACAACATCTCCATGAG 172
*	
lunak_cerveny	CTGCATTTTTCGGTTGGGGGACCTTGGAGAAAAGAAAGCCCTCCAAAAATAAGACCATA 240
treska_obecna	GAAGTGTCTTTTGGTTGGGGGACCGCGGGGTAAAAACAACCCCATGTGGACCGGGGAT 234
pes_domaci	TTAGCAATTTAGGTTGGGGTGACCTCGGAATATAAAAAAATCCCGAGTGATTAA--AAT 237
tur_domaci	TTGGTAGTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAAAAATCCCTCGAGCGGATTTAAGA 232
* * * * * *	
lunak_cerveny	-----CCCTTTAACCAAGAACAACCCCTCAACGTGCTAATAGTAACAGACCCA 289
treska_obecna	ATTATCCCTAAGCTCAGAGCCTCTACTCCAAGTACAGAAATCTGACTTTTGTGATCC 294
pes_domaci	-----TTAGACC-----CACAGTCAAAATACAACATCACTTATTGATCCA 278
tur_domaci	-----CTAGACC-----CACAGTCAAAATCACTCTATCGCTCATTGATCC 272
* * * * *	
lunak_cerveny	ATAAAATTTGATCAATGGACTAAGCTACCCAGGGATAACAGCGCAATCCCTCCTAAGAG 349
treska_obecna	GGTATAACCGATCAACGAACCGAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCCTAGAG 354
pes_domaci	ATAAATTTTGTATCAACGGAACAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCCTAAGAG 338
tur_domaci	-AAAAACTTGATCAACGGAACAAGTTACCTTAGGGATAACAGCGCAATCCCTCCTAAGAG 331
* * * * * *	
lunak_cerveny	CCCCTATCGACGAGGGGCTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAG 409
treska_obecna	CCCATATCGACGAGGGGCTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAG 414
pes_domaci	TCCATATCGACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAG 398
tur_domaci	TCCATATCGACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCTAATGGTGCAG 391
* * * * * *	
lunak_cerveny	TGCGTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAACAGTCCTACGTGATCTGAGTCCAAAAA 469
treska_obecna	CCGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAACAGTCCTACGTGATCTGAT----- 465
pes_domaci	CAGCTATTAAAGGGTTCGTTTGTTCACGATTAACAGTCCTACGTGATCTGAT----- 448
tur_domaci	CCGCTATCAAGGTTTCGTTTGTTCACGATTAACAGTCCTACGTGATCTGAT----- 443

Obr. 15 Multiple sequence alignment

Uvedu něco málo z pozadí jednotlivých případů:

- Případ luňák červený. Bylo třeba zjistit, jestli nalezené zbytky peří náleží luňáku červenému, který je řazen mezi kriticky ohrožené živočišné druhy. Bylo podezření, že někdo luňáka zastřelil v III. zóně Chráněné krajinné oblasti Labské pískovce.
- Případ treska obecná. Byla potřeba ověřit, že rybí maso pochází opravdu z uváděného druhu.
- Případ pes domácí. Na kraji vsi došlo ke střetu drahého osobního automobilu se zvířetem, pravděpodobně psem. Na nárazníku ulpěl jeden velký chlup. Majitel poškozeného auta se chtěl domoci náhrady za opravu vozu na majiteli psa. Bylo třeba ověřit, z kterého živo-

čicha chlup pochází. Potvrdilo se, že pochází ze psa. Pak bylo třeba stanovit identifikační STR profil toho psa a ztotožnit ho s profilem psa žijícího v sousedství autonehody.

- Případ tur domácí. Tento vzorek byl analyzován v rámci mezilaboratorní kontroly kvality organizovanou forenzní sekcí organizace ISAG (International Society for Animal Genetics).

Komentář a řešení problémů

Jako u každé genetické metody, úspěch analýzy závisí především na množství a kvalitě vstupního materiálu. Na vzorky zvířat lze aplikovat postupy přečišťování a koncentrování DNA, jako se používají při analýzách vzorků lidí. Běžně se v praxi lze potkat se zvířecími stopami krve, slin, exkrementů, tkání a kožních derivátů jako chlupy, peří nebo žíně. Obecně lze tyto materiály zpracovávat shodnými postupy, jako se používají pro izolaci DNA ze stop pocházejících od člověka. Specifikum má krev ptáků a ryb, která na rozdíl od savců obsahuje jaderné erythrocyty. Tedy krevní stopy ptáků a ryb jsou na DNA bohatší než krevní stopy savců. S tím je třeba počítat při volbě vstupního množství materiálu do izolace DNA.

Metoda analýzy úseků 16S rRNA je obecně robustní a všeobecně uznávanou metodou, která s vysokou mírou úspěšnosti dokáže identifikovat celou řadu druhů zvířat. Pro potvrzení závěrů forenzní analýzy identifikace druhu lze doporučit ověřit závěr ještě jinou metodou, například sekvenací úseku mitochondriálního genu *cytochromu b* (primery L14724 and H15149 /91/) nebo genu *COI* (primery LCO1490 a HCO2198 /92/).

Nejčastějším problémem při druhové identifikaci analýzou mtDNA je kontaminace vzorku externí mitochondriální DNA. Kontaminaci snadno odhalíme shlédnutím elektroforetogramu sekvence. Mitochondriální genom je haploidní, tedy sekvence by neměla obsahovat překryvy píků, vyjma případných heteroplazmií. Detekujeme-li překryvy píků, jedná se mix mitochondrií z různých druhů organismů. Je-li velký rozdíl ve vstupním množství mitochondrií dvou organismů, je

šance na získání majoritní a minoritní sekvence a úspěšnou identifikaci jednotlivých druhů.

V databázi referenčních sekvencí nejsou zastoupeny mitochondriální sekvence všech žijících živočišných druhů. Zejména u zvířat z volné přírody mohou sekvence některých druhů chybět. BLAST vyhledá sekvence s největší shodou a označí taxonomicky příbuzné druhy.

Lidská mitochondriální DNA je v prostředí poměrně hojně zastoupena. Může se tedy stát, že metoda identifikace živočišného druhu analýzou genů mtDNA poskytne sekvence mající shodu s lidskou DNA a zvířecí DNA bude buď viditelná jako minoritní sekvence nebo bude proti lidské mtDNA v tak malém množství, že nebude detekovatelná.

Problém	Příčina a řešení
✓ Příliš nízká koncentrace DNA	✓ Postupy koncentrování DNA (například odpaření zahříváním nebo vakuové odpaření, precipitace vzorku ledovým etanolem či isopropanolem, separace pomocí paramagnetických částic, separace na kolonkách a snížení elučního objemu).
✓ Obsah inhibitorů ve vzorku DNA	✓ Postupy pro přečištění vzorku (například přečištění na kolonce s iontoměničovou membránou, separace pomocí paramagnetických částic, neutralizace inhibitorů).
✓ Ve vzorku NTC je detekován specifický/nеспецифický PCR produkt	✓ Reakční PCR mix byl kontaminován, je nutné opakovat PCR reakci, je vhodné dekontaminovat pracovní prostředí a použít nová balení reagentů.
✓ Ve vzorku pozitivní kontroly amplifikace je PCR produkt, který neodpovídá očekávané velikosti nebo jsou přítomny nespecifické produkty	✓ Je třeba opakovat PCR a zkontrolovat použité primery.
✓ PCR poskytuje více PCR produktů, jsou přítomny nespecifické PCR produkty	✓ Optimalizace teploty hybridizace. ✓ Kontrola sekvence použitých primerů.
✓ Získaná hrubá (raw) sekvenační data jsou příliš vysoká	✓ Opakování sekvenační reakce s nižším množstvím templátu. ✓ Ředění vzorku před vložením do sekvenátoru.
✓ Získaná hrubá (raw) sekvenační data jsou příliš nízká	✓ Opakování sekvenační reakce s vyšším množstvím templátu. ✓ Prodloužení času nástřiku vzorku do sekvenátoru.
✓ Získaná sekvence vykazuje překryvy píků	✓ Vzorek obsahuje mtDNA různých živočišných druhů. ✓ Některý ojedinělý nepoměrný překryv může znamenat heteroplazmii, nemusí se jednat o mix více druhů.

Problém	Příčina a řešení
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sekvenační reakce neproběhla optimálně, sekvence vykazuje nespecifické píky → opakování sekvenační reakce nebo opakování celé PCR a sekvenační reakce nebo přečištění DNA a opakování analýzy.
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sekvenační data jsou optimální, přesto BLAST nenašel 100% shodu s žádným živočišným druhem 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vzorek pravděpodobně náleží živočišnému druhu, jehož mtDNA není zaznamenána v databázi referenčních sekvencí. BLAST nabídne evolučně příbuzné druhy.

Poděkování

Kapitola byla vypracována za přispění grantových projektů
 VI20202022123, LM2018133, LM2018125, LM2018132,
 CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448,
 EF16_013/0001674, IGA LF UP 2022_012.

Kapitola 4:

Analýza kontrolní oblasti mtDNA využitím masivně paralelního sekvenování

Jana Nováčková, Vlastimil Stenzl, Alena Jurčková

Kriminalistický ústav Praha, oddělení genetiky

Úvod

Lidská mitochondriální DNA (mtDNA) je kruhová a má kánonickou délku 16569 bp (individuální délka se liší podle inzercí a delecí ve srovnání s revidovanou cambridžskou referenční sekvencí /rCRS/). Mutační rychlost je o řád vyšší než u jaderné DNA. V jedné buňce může být i tisíc mitochondrií a v jedné mitochondrii i patnáct mtDNA oproti dvěma kopiím jaderné DNA. mtDNA obsahuje asi 1200 bp dlouhou nekódující kontrolní oblast (cr-mtDNA z anglického *control region mtDNA*), která má v rámci populace vysokou variabilitu, proto se pro forenzní účely provádí analýza právě této kontrolní oblasti.

Mitochondriální DNA je v nezměněné podobě děděna z matky na potomky, ať už ženského nebo mužského pohlaví; mluvíme o maternální dědičnosti. Jediným mechanismem změn jsou mutace; nedochází k rekombinaci a chybí korektorská funkce.

Analýza sekvence mitochondriální DNA má ve forenzní praxi své nezastupitelné místo (93, 94). Je využívána při zpracování biologických vzorků ze srovnávacích materiálů (bukálních stěrů) i z biologických stop obsahujících degradovanou DNA nebo velmi malé množství DNA. V těchto případech jsou běžné analýzy jaderné DNA neúspěšné (jedná se například o trichologický materiál nebo o značně degradovaný kosterní materiál). Větší stabilita mtDNA ve srovnání s gDNA je daná tím, že je chráněná lipidovou dvojvrstvou mitochondrií a zároveň je kruhová DNA nepřístupná pro exonukleázy.

Analýza mtDNA je dále využívána pro určování příbuzenských vztahů po maternální linii, například při identifikaci neznámých mrtvol. V případě analýzy mtDNA se jedná vždy pouze o skupinovou identifikaci – analýza mtDNA sama o sobě neodliší jednotlivé osoby ze stejné maternální linie.

Při analýze mtDNA můžeme sledovat výskyt heteroplasmie. Jedná se o stav, kdy se nemusí v buňce, tkáni nebo v jedinci vyskytovat identické varianty mtDNA. Zavedením masivně paralelního sekvenování (MPS) se citlivost detekce těchto míst značně zvyšuje a může vést k přesnější genotypizaci dat.

V současné době se k rutinnímu stanovení sekvence kontrolní oblasti mtDNA využívá především metoda Sangerova sekvenování. Tato metoda má však určitá úskalí. Obvyklé primery vymezující oblast sekvenování jsou pro svou velikost ampliconů (241–404 bp) nevhodné v případě značně degradovaného materiálu. Je velmi obtížné degradovaný materiál dostatečně a kvalitně prosekvenovat. Dalším omezením je limitace počtu vzorků na jednu sekvenační reakci, kdy lze při obvyklém laboratorním vybavení analyzovat nanejvýš osm vzorků. V neposlední řadě je zde také časová a přístrojová náročnost metody.

Tyto nevýhody beze zbytku eliminuje masivně paralelní sekvenování (MPS). Navíc vysoká citlivost MPS a neustále se snižující cena za vzorek umožňuje přenesení metody do rutinní praxe.

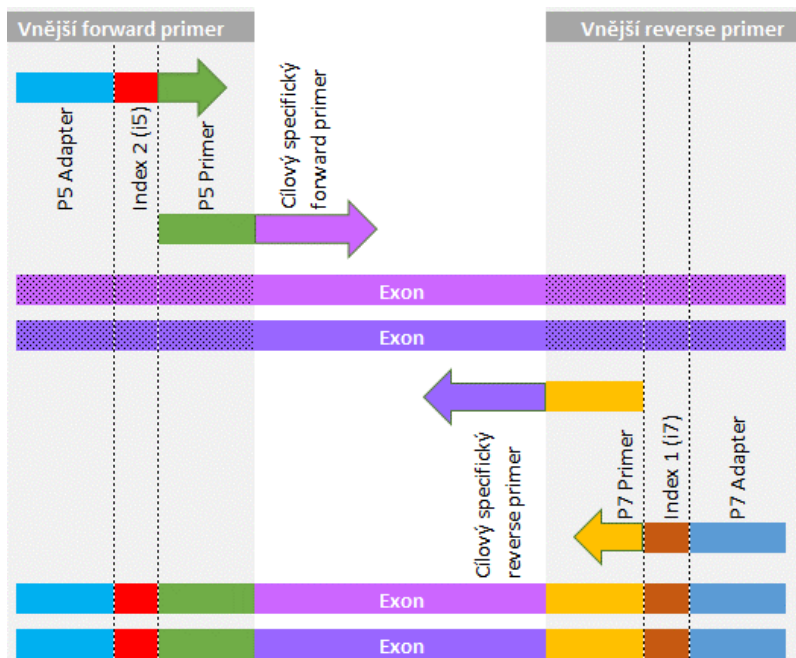
MPS se rychle rozvíjí v klinické genetice (95, 96) a s drobným zpožděním i ve forenzní genetice (97, 98), (https://www.swgdam.org/_files/ugd/4344b0_f61de6abf3b94c52b28139bff600ae98.pdf). Nespornou před-

ností této metody je získání značného množství informací z desítek až stovek vzorků během jedné sekvenační reakce. Princip MPS je založen na sekvenování krátkých úseků, což umožňuje osekvenovat i značně degradovanou DNA. Metoda má navíc nízký limit detekce; některé komerční kity deklarují, že metodika je využitelná pro 100 pg vstupní množství DNA. Množství vzorků do jedné sekvenační reakce se odvíjí od počtu unikátních indexů, které jedinečně označí každý jednotlivý vzorek. Při analýze kontrolní oblasti mtDNA je možné osekvenovat až 96 vzorků.

K analýze cr-mtDNA pomocí MPS používáme PowerSeq® CRM Nested System, Custom (Promega Corporation). Tento kit je zaměřen právě na analýzu kontrolní oblasti lidské mtDNA, která obsahuje nejvíce polymorfních oblastí mitochondriálního genomu. Systém generuje 10 malých ampliconů pokrývajících kontrolní oblast mitochondriálního genomu v jednom multiplexu. Cílové oblasti jsou navrženy tak, aby byly v rozmezí 144–237 bp a zajistily tak optimální výsledky z degradovaných vzorků.

Výrobce kitu doporučené vstupní množství celkové DNA (gDNA plus mtDNA) do reakce je 0,5 ng. Kvantifikované vzorky se ředí pomocí nuclease free vody na požadovanou koncentraci do objemu 12,5 µL. Připraví se PCR master mix, který využívá funkčně prodloužené primery a nested (vnořenou) PCR. Během jediné polymerázové reakce dojde k včlenění všech důležitých komponent – primeru, který vymezuje oblast zájmu (tj. kontrolní oblasti mtDNA), I5 a I7 indexů, které jsou nezbytné k unikátnímu označení každého vzorku a adaptérů, krátkých oligonukleotidů, které slouží k připojení sekvenovaného úseku na reakční komůrku (flowcellu), na které probíhá vlastní proces sekvenování ve stroji MiSeq.

Po PCR následuje purifikace k odstranění nezačleněných komponent PCR. Dle výrobce lze přečištění provést pomocí kolonek nebo magnetických kuliček. Pročištění pomocí kuliček se provádí pomocí AMPure XP (Beckman Coulter), které se smíchají s amplifikátem v poměru 1:1. Po 5 min inkubaci při pokojové teplotě se vzorek promývá 80% etanolem. Eluuje se do 25 µL EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5).



Obr. 16 Schéma připravené knihovny po PCR
(převzato a upraveno dle Lange et al., 2014)

Před závěrečnou normalizací je potřeba vzorky zkvantifikovat. Jedná se také o jediné místo kontroly kvality vzorku před vlastním sekvenováním. Kvantifikaci je možné provést fluorometricky nebo pomocí real-time PCR. V naší laboratoři se provádí fluorometrické měření pomocí kitu AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit (Biotium) na stroji QFX Fluorometer (DeNovix).

Proces normalizace je závislý na typu sekvenační chemie a předpokládané výsledné koncentraci knihovny k sekvenování. Naše knihovny se normalizují na 4 nM podle následujícího vzorečku:

$$\text{nM} = \left(\frac{\text{koncentrace}[\text{ng}/\mu\text{L}]}{660 * 220} \right) * 1000000$$

(660 g/mol je průměrná molární váha jedné báze, 220 bp je průměrná délka sekvenovaných amplikonů). Během poolování se všechny znor-malizované knihovny spojí do jedné zkumavky. Díky indexování, kdy je každý vzorek unikátně označen během amplifikace, jsou sekvenační data pro každý vzorek ve směsi jednoznačně přiřaditelná.

Závěrečné ředění je odvislé od použité sekvenační chemie, případ-ně od počtu a kvality vzorků. Postupuje se dle dokumentu # 15039740 v10 https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf, ve kterém jsou dle Illuminy uvedena veškerá doporučení na ředění a denaturaci knihovny před spuštěním vlastního sekvenačního běhu. Koncentrace knihovny připravené k sekvenování je 9 pM, vkládá se 10 % kontrolní PhiX. PhiX je uměle připravený bakteriofágový genom o velikosti cca 500 bp, který slouží ke kontrole vlastního sekvenování.

Před spuštěním sekvenačního běhu je nutné vytvořit tzv. *Sample Sheet* pomocí programu Illumina Experiment Manager. Jedná se o se-znam vzorků, které byly připraveny k sekvenování. Ke každému vzorku je nutné nadefinovat jeho indexování (unikátní označení vzorku), které je nezbytné pro následný proces demultiplexování, tj. procesu, kdy jsou osekvenovaná data roztríděna k jednotlivým vzorkům na základě jejich označení.

Existují rozdíly mezi tvorbou *Sample Sheet* a spuštěním sekvenač-ního běhu. Tyto rozdíly jsou dány použitou chemií pro přípravu MPS. Obecně to lze rozdělit na kity od společnosti Verogen, Inc. (ForenSeq) a všechny ostatní kity (Promega, Qiagen), které jsou spouštěny v tzv. RUO formátu (Research Use Only).

Podle typu připravených knihoven se použije i typ spouštění sekve-nace. Přístroj MiSeq FGx™ System (Verogen) má 2 módy sekvenování:

- ▶ Forensic Genomics – dostupné jenom pro kity od společnosti Vero-gen, Inc. (ForenSeq)
- ▶ Research Use Only (RUO) – pro ostatní kity

Vlastní proces sekvenování probíhá na sekvenátoru MiSeq FGx System (Verogen), který využívá systém SBS (*sequencing by synthesis*). Jedná se o jeden z nejčastěji využívaných systémů MPS. Principem sekvenování je tzv. *bridge PCR*, kdy se na povrch flowcell pomocí adapteru zachytí denaturovaný úsek DNA, který se bude sekvenovat. Po přidání neznačených nukleotidů a enzymů do systému se zahájí proces amplifikace – enzym inkorporuje nukleotidy k vybudování dvouřetězcových „můstků“ na substrátu pevné fáze.

Denaturace ponechá jednovláknové templáty ukotvené k substrátu. Tento proces se neustále opakuje. V každém kanálu flowcellly se generuje několik milionů hustých shluků (clusterů) DNA. Po zahájení prvního sekvenačního cyklu se do flowcellly přidají všechny čtyři značené reverzibilní terminátory, primery a enzym DNA polymeráza. Po excitaci laserem se zachytí obraz emitované fluorescence z každého clusteru na flowcellu. Zaznamenaná se identita první báze pro každý cluster. Během každého cyklu je přiřazena vždy jedna báze v daném fragmentu DNA. Tak dochází k několikerému pročení všech úseků DNA. Získaná data se v další fázi seřídí, zarovnájí, porovnájí s referenční sekvencí a identifikují se sekvenční rozdíly.

Po každém sekvenování se provádí kontrola primárních dat, tj. kontrola kvality sekvenačního běhu, v programu Sequencing Analysis Viewer (SAV). V tabulce níže jsou uvedeny některé důležité sledované metriky (► **tab. 7**). Projected Total Yield (G) udává výtěžnost dat v gigabázech; hodnota by měla odpovídat očekáváním dle Illuminy. Procento Aligned odpovídá procentu vzorku, který se zarovnal s genomem, představuje tak procentuální zastoupení kontroly PhiX v reakci, procento Error Rate by mělo být do 0,5 %, hodnota Q30 ukazuje, kolik procent sekvencí má přiřazenou bázi čtení s chybou menší než 1 na 1000.

Vyhodnocení analýzy MPS se provádí pomocí software GeneMarker HTS (SoftGenetics, LLC.). Během hodnocení sledujeme pokrytí vzorku sekvenačními daty, minimální coverage byla dle mezinárodní literatury stanovena na hodnotu 100 (99, 100).

Tabulka 7: Run Summary – přehledný výpis základních metrik primární analýzy

Level	Yield Total (G)	Projected Total Yield (G)	Aligned (%)	Error Rate (%)	Intensity Cycle 1	% ≥ Q30
Read 1	0,54	0,54	17,66	0,46	110	87,08
Read 2 (I)	0,03	0,03	0	NaN	49	78,41
Read 3 (I)	0,03	0,03	0	NaN	1061	90,34
Read 4	0,54	0,54	17,40	0,41	336	78,68
Non-Indexed Total	1,07	1,07	17,53	0,44	223	82,88
Total	1,12	1,12	17,53	0,44	389	82,94

Přístroje, reagentie, software

Reagentie

PowerSeq® CRM Nested System, Custom (Promega Corporation)

<https://worldwide.promega.com/products/forensic-dna-analysis-mps/target-amplification-and-library-prep/powerseq-crm-nested-system-custom/?catNum=AX5810>

AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit (Biotium)

AMPure XP (Beckman Coulter)

Tris-HCl (pH 8,0) (Sigma-Aldrich)

2 N NaOH (Sigma-Aldrich)

Tween® 20 (Sigma-Aldrich)

Calcium chloride solution (CaCl₂) (Sigma-Aldrich)

PhiX Control v3 (Illumina)

MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina)

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf

EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) Qiagen)

nuclease-free water (Promega Corporation)

Přístroje

ABI Geneamp 9700 PCR Thermal Cycler (Thermofisher)

QFX Fluorometer (DeNovix)

MiSeq FGx™ System (Verogen)

Centrifuga, vortex

Pipety (objem 1–1000 µl)

Software

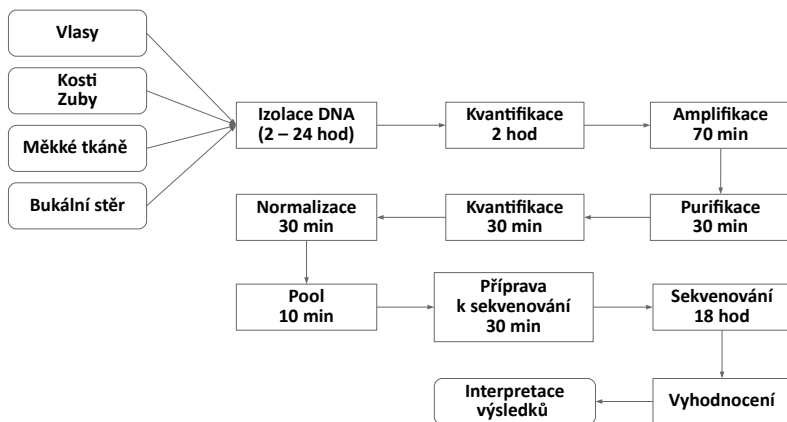
GeneMarker HTS (SoftGenetics, LLC.)

Sequencing Analysis Viewer (Verogen)

Illumina Experiment Manager (Verogen)

Protokol

Procesní diagram



Obr. 17 Schéma pracovního postupu

Příprava knihoven

Ředění vzorků, amplifikace

1. Necháme rozmrznout následující komponenty:
 - ▷ PowerSeq™ 5X Master Mix,
 - ▷ PowerSeq™ CRM Nested 10X Primer Pair Mix,
 - ▷ 10X Index Primer 1,
 - ▷ 10X Index Primer 2,
 - ▷ 2800M Control DNA.
2. Naředíme vzorky na vstupní množství DNA 0,5 ng (tj. 40 pg/μL) do reakce, tak aby byl minimální objem naředěného vzorku 12,5 μl (při koncentraci pod 40 pg/μL se vzorek neředí).
3. Komponenty zvortexujeme, stočíme a připravíme PCR master mix dle následující tabulky (jsou zahrnuty i PK, NK) (► tab. 8):

Tab. 8: Reakční objemy PowerSeq

Komponenta	Objem na reakci [μL]
PowerSeq™ 5X Master Mix	5,0
PowerSeq™ CRM Nested 10X Primer Pair Mix	2,5
10X Index Primer 1	2,5
10X Index Primer 2	2,5
Naředěná DNA	12,5
Celkový objem reakčního mixu	25,0

4. Zvortexujeme, stočíme a rozpipetujeme **7,5 μl PCR master mixu** do PCR zkumavek.
5. Namyslíme si unikátní indexování a připipetujeme **2,5 μl 10X Index Primer 1** a **2,5 μl 10X Index Primer 2** (ideálně kombinujeme dle následující tabulky) (► tab. 9):

Tab. 9: Míchání indexů

	D701	D702	D703	D704	D705	D706	D707	D708	D709	D710	D711	D712
D501	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
D502	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
D503	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D504	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
D505	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
D506	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
D507	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
D508	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

- Do každé zkumavky přidáme 12,5 µl vzorku, důsledně propipetujeme.
- PK (2800M Control DNA) zvortexujeme, stočíme a naředíme na alikvóty 0,1 ng/µL. Přidáme 12,5 µl naředěné DNA do reakce obsahující PCR master mix a Index Primer 1, 2.
- Pro NK použijeme 12,5 µl nuclease free vody.
- Zkumavky uzavřeme, zvortexujeme, stočíme a vložíme do termálního cykléru. Spustíme následující program:

Víko vyhřívané na 106 °C; objem 25 µl

Teplota	Čas	Počet cyklů
96 °C	10 min	
96 °C	5 s	30 cyklů
60 °C	35 s	
72 °C	5 s	
60 °C	2 min	
4 °C	∞	

Purifikace amplifikátu

- Vyjmeme AMPure Beads a necháme inkubovat při pokojové teplotě 30 min.
- Připravíme 80% EtOH (40 mL abs. EtOH + 10 mL H₂O) – připravujeme VŽDY ČERSTVÝ!

3. Naředíme proteinázu K (dodávána v lyofilizovaném stavu) na 20 mg/mL zásobní roztok:
 - a) Nejdříve připravíme **50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl₂**:
 - ▷ 75 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 - ▷ 15 µl 10 mM CaCl₂
 - ▷ 1410 µl H₂O
 - b) Přidáme 0,5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl₂ k lyofilizované proteináze K, tím získáme 20 mg/mL zásobního roztoku (lze uchovat 2–3 měsíce při –20 °C)
4. Naředíme 20 mg/mL zásobní roztok proteinázy K na 360 µg/mL pracovní roztok:
 - ▷ 10 µl 20 mg/mL zásobní roztok
 - ▷ 545 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM CaCl₂
5. Přidáme 5 µl 360 µg/mL pracovního roztoku proteinázy K ke každému vzorku.
6. Do čisté 1,5 mL zkumavky rozpipetujeme 30 µL důkladně promíchaných vytemperovaných AMPure Beads, přidáme celý objem vzorku (30 µL), důkladně propipetujeme a necháme 5 min inkubovat při pokojové teplotě.
7. Umístíme zkumavky na magnetický separátor a necháme inkubovat, dokud nebude supernatant čirý, poté jej opatrně odstraníme (neodebereme kuličky) a vyhodíme.
8. Promyjeme 200 µL 80% EtOH – přidáme EtOH, necháme 30 s inkubovat, odsajeme supernatant, vyhodíme – zopakujeme 2× (celkem 3× promytí).
9. Necháme 5 min inkubovat na magnetickém stojánku do vysušení pelety (nesmí popraskat).
10. Do každé zkumavky přidáme 28 µL EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5), resuspendujeme kuličky s navázanou DNA a necháme 2 min inkubovat při pokojové teplotě mimo magnetický separátor.
11. Poté vložíme zkumavky zpět na magnetický separátor, necháme inkubovat do vyčištění supernatantu, přepipetujeme 25 µL vzorku do čisté 0,2 mL zkumavky.

Kvantifikace knihoven

1. Provedeme na stroji QFX Fluorometer (DeNovix) za použití kitu AccuGreen Broad Range dsDNA Quantitation Kit (Biotium) dle doporučení výrobce.
2. Přidáme 2 μl vzorku do celkového objemu 200 μl roztoku.
3. Výsledky kvantifikace zaneseme do interní tabulky pro výpočet ředění pro následnou normalizaci vzorku.

Normalizace knihovny, poolování

1. Dle výpočtu ředění naředíme jednotlivé vzorky na konečnou koncentraci 4 nM pomocí EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5).
2. Nejprve napipetujeme do čistých zkumavek požadované množství EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5), poté přidáme 5 μl vzorku získaného po purifikaci \rightarrow normalizace knihoven na 4 nM.
3. Z každé znormalizované knihovny napipetujeme 5 μl vzorku do čisté 1,5 mL zkumavky \rightarrow poolování knihovny.

Příprava knihovny k sekvenování

1. Naředíme 2 N NaOH na 0,2 N pomocí nuclease free vody
2. Do čisté 1,5 mL zkumavky napipetujeme:
 - ▷ 5 μl ZNORMALIZOVANÉ a ZPOOLOVANÉ KNIHOVNY
 - ▷ 5 μl 0,2 N NaOH, inkubujeme 5 min při pokojové teplotě = DENATURACE KNIHOVNY
3. Přidáme 990 μl chlazeného HT1 Buffer \rightarrow **20 pM denaturovaná zpoolovaná knihovna**
4. Do čisté 1,5 mL zkumavky napipetujeme:
 - ▷ 270 μl 20 pM denaturované zpoolované knihovny
 - ▷ 330 μl HT1 Buffer \rightarrow 600 μL **9 pM denaturované zpoolované knihovny**
5. Do čisté 1,5 mL zkumavky připravíme PhiX:
 - ▷ 2 μl PhiX Control (10 nM)
 - ▷ 3 μl EB Buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
 - ▷ 5 μl 0,2 N NaOH, inkubujeme 5 min = DENATURACE PHIX

6. Přidáme 990 µl chlazeného HT1 Buffer → **20 pM denaturovaná PhiX**
7. Do čisté 1,5 mL zkumavky napipetujeme:
 - ▷ 375 µl 20 pM denaturované PhiX
 - ▷ 225 µl HT1 Buffer → 600 µl **12,5 pM denaturované PhiX**
8. Do čisté 1,5 mL zkumavky připravíme konečné sekvenační ředění (10% PhiX):
 - ▷ **60 µl 12,5 pM denaturovaná PhiX**
 - ▷ **540 µl 9 pM denaturované zpoolované knihovny**

Celý objem (600 µl) přepipetujeme do sekvenační cartridge na pozici 17.

Sekvenování

Research Use Only (RUO)

1. Zkontrolujeme rozmrazení všech reagentů v cartridge, cartridge otřeme do sucha. Klepnutím o pevný povrch se zbavíme nechtěných bublin.
2. Na obrazovce MiSeq zvolíme možnost SEQUENCE a postupujeme dle instrukcí na obrazovce.
3. Přihlašovací údaje na basespace nedáváme, sekvenační běh se spustí potvrzením tlačítka Next.
4. Vyjmeme flowcellu z transportní nádoby, omyjeme miliQ vodou a důkladně osušíme papírovými ubrousky nezanechávající vlákna (Kimwipes – Kimtech).
5. V přístrojové části pro flowcell po odklopení krycího víka stiskneme bílé tlačítko, vyjmeme starou flowcellu a umístíme novou. Zkontrolujeme správné usazení flowcellu, zaklapneme nástavec a zavřeme krycí víko.
6. Na obrazovce sekvenátoru potvrdíme Next.
7. Otevřeme dvířka části sekvenátoru pro reagenty, vysuneme páku sipperu směrem nahoru, vyjmeme láhev s 0,5% Tweenem, zkontrolujeme vyprázdnění odpadního kontejneru (popřípadě vylijeme), vložíme promíchanou láhev s inkorporačním pufrem, páku sipperu stáhneme dolů.

8. Na obrazovce sekvenátoru potvrdíme krok stisknutím *Next*.
9. Po několika vteřinách vyjedou sippery z promývací kazety.
10. Vždy čistou 1000 µl špičkou propícháme krycí fólii kazety v místě označení pro vzorek – *Sample* (pozice č. 17), následně do jamky napipetujeme 600 µl připravené knihovny.
11. Z přístroje vyjmeme promývací cartridge a vložíme sekvenační cartridge. Zavřeme dvířka, potvrdíme *Next*.
12. Na obrazovce vybereme možnost *Change Sample Sheet* a vyhledáme v nabídce aktuální *Sample Sheet* pro dané vzorky. Potvrdíme *Next*.
13. Na obrazovce se zobrazí souhrnné nastavení, které překontrolujeme. Je-li vše v pořádku, potvrdíme krok stisknutím *Next*.
14. Následuje kontrola průtoku reagentů, která trvá cca 5 min.
15. Po kontrole se spustí sekvenační běh potvrzením *Start Run*.
16. Po dokončení běhu se data ve formátu *Fastq.gz* uloží přímo v přístroji *MiSeq*.
17. Po skončení sekvenování se provede promytí stroje. Postupuje se dle instrukcí na přístroji.

Vzorový výsledek

Vyhodnocení dat se provádí pomocí software *GeneMarker HTS* (*SoftGenetics, LLC.*) (101), kde jsou ve sloupci *Variants* uvedeny nalezené varianty v sekvenci kontrolní oblasti *mtDNA*, které jsou odečteny oproti referenční sekvenci *rCRS*, *Variants %* uvádí procentuální zastoupení alternativního nukleotidu, *Coverage* uvádí počet čtení na dané pozici, kdy byla dle zahraniční literatury stanovena hraniční hodnota 100 (► [tab. 10](#)).

Tab. 10: Zobrazení nalezených majoritních variant v software GeneMarker HTS (SoftGenetics, LLC)

Index	Position	Ref	Alt	IUPAC	Variants	Variants (%)	Coverage	A (#F:#R)	C (#F:#R)	G (#F:#R)	T (#F:#R)	Del (#F:#R)	Ins (#F:#R)
1	73	A	G	73G	A73G	99.71	2840	4:3	0:0	1453;1379	1:0	0:0	0:0
2	263	A	G	263G	A263G	99.77	10204	1:4	1:1	3267;6914	8:8	0:0	0:0
3	309	C	insC	309.1C	C309insC	84.25	3162	0:5	125;3021	0:0	4:3	2:2	25;2605
4	315	C	insC	315.1C	C315insC	90.76	3162	0:0	131;3030	0:0	0:0	0:1	43;2827
5	16 126	T	C	16126C	T16126C	99.42	8938	0:1	4453;4434	3:2	23;22	0:0	0:0
6	16 294	C	T	16294T	C16294T	99.56	2784	0:1	46	0:1	1426;1346	0:0	0:0
7	16 296	C	T	16296T	C16296T	99.06	2785	0:0	7;19	0:0	1423;1336	0:0	0:0
8	16 304	T	C	16304Y	T16304C	95.28	2800	1:0	1364;1304	0:0	65;66	0:0	0:0
9	16 305	A	G	16305R	A16305G	97.21	2800	36;36	1:1	1389;1333	4:0	0:0	0:0
10	16 519	T	C	16519C	T16519C	98.39	4800	14;16	2278;2445	23;20	1:3	0:0	0:0

Komentář a řešení problémů

MPS je otevřený systém, kdy malými změnami ve workflow jsme schopni získat jiný charakter dat. Princip metody zůstává stejný, ale změnou navržené knihovny (souboru primerů) jsme schopni sekvenovat i celý genom mtDNA (16 569 bp). Stanovení sekvence mitogenomu se jeví jako vhodné pro rozlišení jednovaječných dvojčat (102).

Vývoj technik MPS a specializovaných bioinformatických pipeline značně zlepšil detekci variant mtDNA na nízké úrovni. Limit detekce minoritní (heteroplazmické) alely pro detekci mutací mtDNA je u Sangerova sekvenování zřídka lepší než 20 %, kdežto u MPS je udávána schopnost detekovat úroveň heteroplazmie až na 0,01 % (103). Heteroplazmie byla obecně, při využití Sangerova sekvenování, považována spíše za výjimku než za pravidlo. Při zavedení MPS technik se ukázalo, že se v běžné populaci vyskytuje se značnou frekvencí (104–106) a musí být zohledněna při interpretaci forenzních důkazů. Jsou také popsány rozdíly v detekci heteroplazmických variant u různých typů vzorků. Při použití MPS na analýzu vlasů mohou být poměry heteroplazmických variant zcela odlišné od poměrů pozorovaných v krevních buňkách a mohou korelovat s poměry sledovanými v buňkách (107). Interpretační doporučení, vytvořené pro Sangerovu technologii, nejsou pro citlivější MPS vyhovující.

Pro kontrolu případné kontaminace nebo neshod v nalezených variantách je vhodné využít prediktory mitoskupin (například Empop (108), MitoTool (109), James Lick's mtHap utility, Haplogrep2 (110)). Výstupy ze všech prediktorů jsou srovnatelné. Určování haploskupin také může přiblížit cílovou skupinu při identifikaci neznámých mrtvol ve značném stadiu rozkladu nebo při nalezení kosterních materiálů – lze určit přibližný geografický původ osoby.

Problém	Příčina a řešení
✓ Nízká koncentrace vzorku po purifikaci	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chybné ředění vzorku nebo chyba při přípravě master mixu pro amplifikaci. Opakujeme PCR. ✓ Přesušení pelety při purifikaci. Opakujeme purifikaci při zkrácení doby sušení.
✓ Vysoká <i>Cluster density</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chybná normalizace a pool knihoven – příliš mnoho knihoven. Více naředíme knihovny. ✓ Mnoho primerových dimerů, špatná purifikace. Opakujeme celou přípravu.
✓ Nízká <i>Cluster density</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Málo DNA, degradovaná DNA. Zakoncentrujeme DNA. ✓ Špatná denaturace, špatná příprava knihoven. Opakujeme celou přípravu.
✓ <i>Fowcell Error Rate</i>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Systém MiSeq nezaznamenal vhodné prostředí pro použití flowcelly. Dle pokynů výrobce provedeme pokyn <i>Pump</i>, případně <i>Maintenance Wash</i>

Poděkování

Kapitola byla vypracována za přispění grantového projektu Zavedení nových metod identifikace lidského, zvířecího a rostlinného materiálu do forenzní praxe při dokazování trestných činů – VI201620200I5.

Kapitola 5:

Detekce metylace pyrosekvenováním pro stanovení biologického věku

Jana Stránská², Karolína Bartáková¹

¹Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc

²Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

Úvod

Stárnutí je proces asociovaný s nejrůznějšími molekulárními modifikacemi v buňkách, jako jsou i epigenetické změny, které vyvolávají změny v expresi genů ovlivňující systémy odpovědné za údržbu, opravné a obranné odpovědi proti vnitřním a vnějším útokům indukujícím kumulativní poškození na různých úrovních (111). Epigenetika zkoumá dědičné změny v genové expresi (a tím většinou i fenotyp), které nevznikly alterací nukleotidů v DNA, ale modifikacemi DNA (metylací cytosinu na jednom z vláken DNA) nebo modifikací chromozomálního scaffoldu/lešení (např. acetylací histonů). Mnoho studií naznačuje, že metylace DNA je důležitým prvkem stárnutí. K dědičné, geneticky řízené DNA metylaci se přidává řada faktorů z vnějšího prostředí, které ovlivňují původní metylační status a vytváří tím markery epigenetického driftu

(112, 113). Rozdíl mezi biologickým a chronologickým věkem může být způsoben množstvím faktorů klinických a vnějších a může také sloužit jako indikátor zvýšeného rizika nemocí a úmrtnosti (114).

S nástupem vysokokapacitních technologií se zkoumání epigenetických změn zpřístupnilo a umožnilo úspěšnou identifikaci ve změnách metylace DNA spojených s věkem (112, 115, 116). Tyto objevy vedly k predikčním modelům určení věku. Metody na určování věku založené na epigenetické analýze byly většinou založeny na izolaci DNA z krve, ale zkoumaly se i jiné zdroje DNA (117).

Forenzní vědy již dlouho potřebovaly k vyřešení kriminálních trestných činů relevantní biologický marker k určení věku pachatele z biologických stop (118). Použití kitu Ageplex, které je popsáno v této kapitole, je zavedeno k odhadu věku určením metylační úrovně markerů *ELOVL2*, *Clorf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2* izolovaných z lidské krve (119).

Přístroje, reagentie, software

Laboratorní vybavení

Flowbox, Mars Safety Class 2 (ScanLaf)

Termocyklér, CFX96 Real-time System (BioRad)

Termocyklér, Mastercycler nexus (Eppendorf)

Mikrocentrifuga na 1,5 mL zkumavky, MiniSpin (Eppendorf)

Vortex (Labnet International)

Set of single/multi- kanálových pipet se stojánkem (Eppendorf)

Elektronická multidávkovací pipeta, Pipetman 2 ÷ 20 µl (Gilson)

Chladicí stojánky pro 96jamkové PCR destičky (Sarstedt)

Robotická pracovní stanice QIAcube (Qiagen)

Centrifuga na destičky 5430 (Eppendorf)

QIAxcel Advanced Instrument (Qiagen)

Pyromark Q48 Autoprep, pyrosekvenátor (Qiagen)

mrazák, -20 °C (Gorenje)

lednice, 2 °C ÷ 8 °C (Gorenje)

Chemikálie

MagCore Genomic DNA Bisulfite Kit (kat. č. MGB400-02),
RBCBioscience, KRD

EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (kat. č. 59824 nebo 59826), Qiagen,
Genetica

PyroMark PCR Kit (kat. č. 978703 nebo 978705), Qiagen, Genetica

PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents (kat. č. 974022), Qiagen,
Genetica

AgePlex Mono Kit (kat. č. BVE-200-202), BioVectis, Dynex, obsahuje:

- 5 PCR párů primerů
- 5 pyrosekvenačních primerů

PyroMark Q48 Magnetic Beads (kat. č. 974203), Qiagen, Genetica

High-purity (deionizovaná) voda

Plasty

mikrozkumavky 1,5 mL, nuclease-free (kat. č. 1210-00), SSIBio, P-lab

8zkumavkový strip bez víček, 0,2 mL (kat. č. 4316567), Applied
Biosystems, ThermoFisher Scientific

špičky s filtrem (kompatibilní s pipetami), Eppendorf

Filter-Tips, 200 µl, předplněné špičky s filtrem (kat. č. 990332), Qiagen,
Genetica

Filter-Tips, 1000 µl, předplněné špičky s filtrem (kat. č. 990352), Qiagen,
Genetica

eluční zkumavky 1,5 mL, Safe Seal Conical Tube (kat. č. 72706),
Sarstedt, Sarstedt

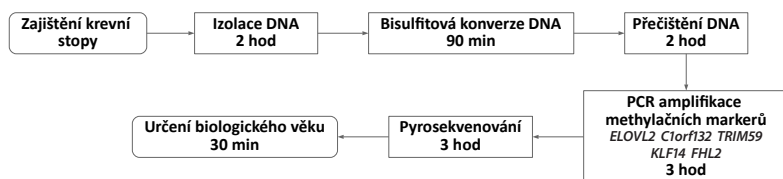
Sample Tubes RB, 2,0 mL mikrozkumavky (kat. č. 990381), Qiagen,
Genetica

PyroMark Q48 Disc (kat. č. 974901), Qiagen, Genetica

PyroMark Q48 Absorber strip (kat. č. 974912), Qiagen, Genetica

Protokol

Procesní diagram



Obr. 18 Procesní kroky při určování věku z krve pyrosekvenováním

Bisulfitová konverze

1. Necháme rozmrazit přečištěnou/izolovanou DNA z krevního vzorku. Zkontrolujeme, že poměr absorbancí A_{260}/A_{280} vzorku DNA se pohybuje mezi 1,7–1,9 a koncentrace je nejméně 10 ng/μl.
2. Připravíme si EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=ab2427dc-3da9-412c-8c37-7e78d397b6ac&lang=en>): při teplotě 2–8 °C skladujeme kolonky MinElute DNA spin columns a pufry DNA Protect Buffer a Buffer BD. Ostatní části kitu včetně Bisulfite Solution skladujeme při pokojové teplotě (RT).
3. Připravíme si Buffer BW: ke koncentrátu 52 mL Buffer BW přidáme 120 mL 96–100% etanolu, přidání označíme na víčku/etiketě, skladujeme při RT. Před použitím vždy lahvičku s naředěným pufrem několikrát převrátíme.
4. Připravíme si Buffer BD: ke koncentrátu 3 mL Buffer BD přidáme 27 mL 96–100% etanolu, přidání označíme na víčku/etiketě, skladujeme při 2–8 °C. Před použitím vždy lahvičku s naředěným pufrem několikrát převrátíme. Po použití lahvičku ihned uzavřeme. Případný bílý precipitát nevadí, nenanášíme ho ale na MinElute DNA kolonku.
5. Vzorky a pufry necháme vytemperovat na RT. Zkontrolujeme, že roztok Bisulfite Solution je kompletně rozpuštěný. Pokud není, můžeme Bisulfite Solution umístit do termobloku na 60 °C a vortexovat, dokud se precipitát nerozpustí. Rozpuštěný roztok Bisulfite Solution nedáváme do ledu / chlazeného stojánu.

6. Popíšeme si 0,2 mL PCR zkumavky. Do zkumavek si připravíme směs na bisulfitační reakci (► tab. 11) (objemy jsou uvedeny pro 1 reakci). Jednotlivé reagenty přidáváme v pořadí, uvedeném v tabulce.

Tab. 11: Reagencie bisulfitační reakce

Reagencie	Objem
DNA	x μ l (200 ng)
RNase-free voda	(20 – x) μ l
Bisulfite Solution	85 μ l
DNA Protect Buffer	35 μ l
Celkový objem	140 μ l

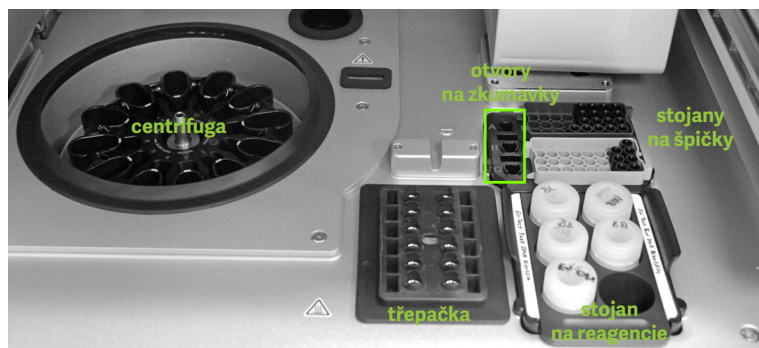
7. Zavřeme PCR zkumavky a řádně promícháme. Před bisulfitační konverzí zkumavky uchováváme při pokojové teplotě. Po přidání do bisulfitační reakce by měl DNA Protect Buffer změnit barvu ze zelené na modrou. To ukazuje dostatečné promíchání a správné pH pro konverzi. DNA Protect Buffer nedáváme do mrazáku, pokud se tak stane, tak jej již nepoužíváme.
8. Provedeme bisulfitační konverzi DNA na termocykléru (Eppendorf) podle programu (► tab. 12). Vzhledem k tomu, že se v reakci nepoužívá minerální olej na překrytí, je nanejvýš vhodné použít termocyklér s vyhříváním víkem. Pokud používáme termocyklér, který nám nedovolí zadat objem 140 μ l, nastavíme ho na nejvyšší možný objem. Konvertovaná DNA může zůstat beze ztrát v termocykléru přes noc při RT.

Tab. 12: Tepelné podmínky bisulfitační konverze

Krok	Čas	Teplota
Denaturace	5 min	95 °C
Inkubace	20 min	60 °C
Denaturace	5 min	95 °C
Inkubace	20 min	60 °C
Hold	∞	20 °C

Přečištění DNA po bisulfitací konverzi na přístroji QIAcube

1. Po dokončení bisulfitací konverze zkumavky krátce zcentrifugujeme. Poté přepipetujeme celých 140 µl bisulfitací reakce do označených 2,0 mL safe-lock mikrocentrifugačních zkumavek (sample tubes RB). V jednom běhu *Cleanup* na QIAcube může být přečištěno až 12 vzorků.
2. Připravíme přístroj QIAcube na protokol *Cleanup*. Otevřeme dvířka QIAcube, abychom získali přístup k pracovnímu prostoru (► **obr. 19**). Pro více informací viz manuál výrobce (<https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=f7d77c6e-0479-4b2b-a2e0-5ca747114e34&lang=en>).



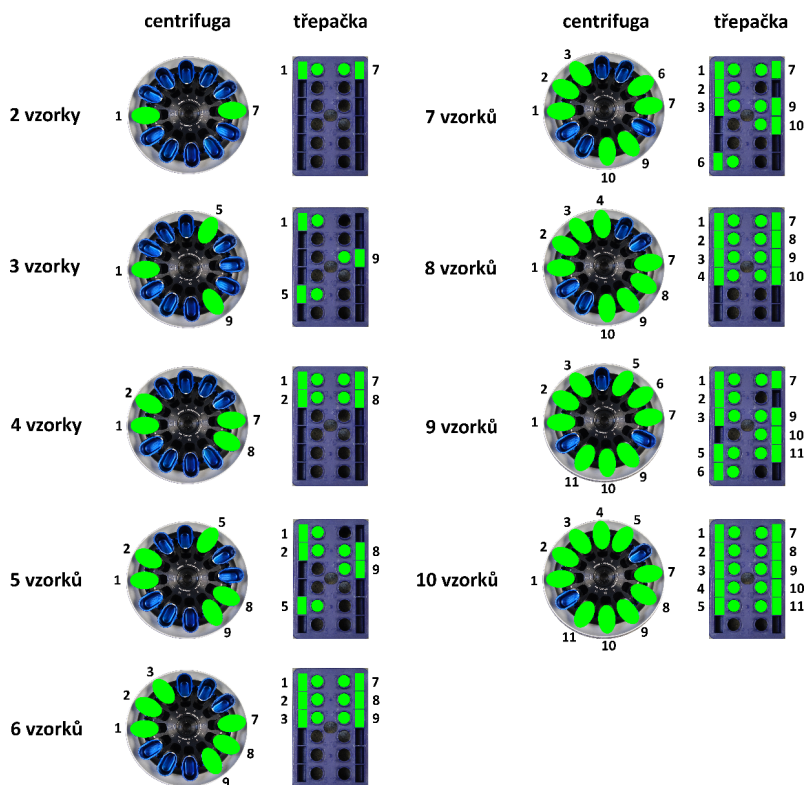
Obr. 19 Pracovní prostor QIAcube

3. Připravíme si stojan na reagentie. Následujeme pozice pro každou reagentii (► **obr. 20**). Před umístěním na pracovní plochu ze všech lahviček s reagentiemi odšroubujeme víčka (předem si popíšeme). Můžeme použít pouze lahvičky s reagentiemi určené pro QIAcube, jinak se mohou vyskytnout chyby při detekci roztoků. Pokud pufr Buffer BL obsahuje precipitát, rozpustíme ho zahřátím na max. 70 °C a jemným promícháním. Stojan s reagentiemi umístíme na určené místo v pracovním prostoru.



Obr. 20 Stojan s reagensiiemi do QIAcube

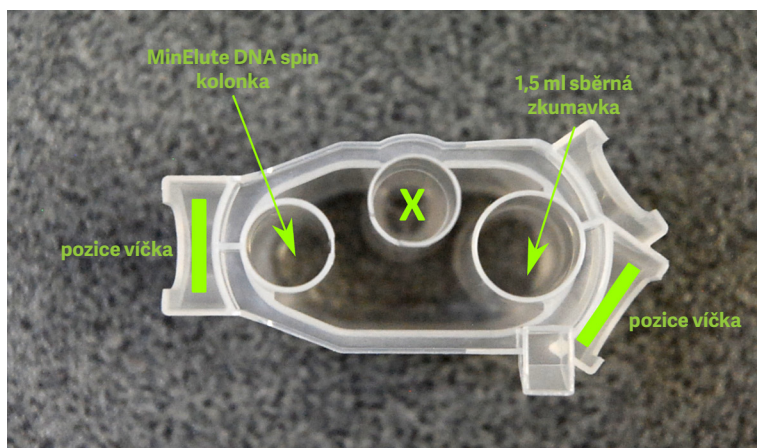
4. Předplněné stojany na špičky 200 μ l (modrý) a 1000 μ l (světle šedý) s dostatečným počtem špiček umístíme do pracovního prostoru na určené místo v pracovním prostoru.
5. 2,0 mL safe-lock mikrocentrifugační zkumavky (sample tubes RB) s konvertovanou DNA umístíme do stojanu (označení „2“) do třepačky dle počtu vzorků (► **obr. 21**). Víčka zkumavek opatrně ohneme a umístíme do otvorů u hrany stojanu. Do otvorů u hrany stojanu, kde nejsou zasunutá víčka, nezasunujeme ucpávky (jsou určeny pro protokoly se šroubovacími zkumavkami) a necháme tam volná místa, aby se nepopletl software kontrolující počet vzorků při kontrole naplnění pracovního prostoru. Naplněný stojan umístíme na určené místo v pracovním prostoru.
6. Připravíme si plastové adaptory do rotoru. Do adaptoru umístíme kolonku s membránou a jako sběrnou zkumavku popsanou 1,5 mL Safety Cap zkumavku (► **obr. 22**). Zatlačíme je řádně do dané pozice, víčko ohneme a zasuneme do otvoru. Prostřední pozice zůstane prázdná. Během protokolu je kolonka přenesena na eluci DNA do sběrné zkumavky. Adaptory umístíme do výklopných částí centrifugy podle počtu vzorků (► **obr. 21**), lze to jen jedním správným



Obr. 21 Rozmístění zkumavek v třepačce a rozmístění adaptorů v rotoru centrifugy v závislosti na počtu vzorků

způsobem. Výklopné části musí být v centrifuze všechny, i když zpracováváme méně než 12 vzorků.

7. Zavřeme dvířka přístroje QIAcube a zapneme jej.
8. Rozsvítí se dotykový displej. Z hlavního menu vybereme aplikaci *Cleanup* ťuknutím na ikonu.
9. Vybereme správné jméno kitu, zdrojový materiál a typ protokolu. V seznámech se pohybujeme šipkami nahoru a dolů a vybereme *EpiTect Fast DNA Bisulfit, Converted DNA a Up to 100 ng DNA*. Výběr



Obr. 22 Rozmístění kolonky, sběrné zkumavky a víček v adaptoru do rotoru při přečišťovacím protokolu QIAcube

potvrdíme ťuknutím na ikonku *Select*. Tento protokol je navržen na přečištění konvertované DNA do 100 ng (DNA koncentrace se po bisulfitaci konverzi dramaticky snižuje).

10. Znovu otevřeme dvířka přístroje a následujeme pokyny k naplnění pracovního prostoru (vzorky, reagensy, plasty) zobrazené na displeji. Dokončíme a potvrdíme požadované úkony nebo potvrdíme, že jsou již hotové.
11. Zavřeme dvířka QIAcube a ťukneme na *Start*. Přečišťovací protokol trvá s 12 vzorky přibližně 90 min.
12. Po dokončení protokolu následujeme pokyny k úklidu pracovního prostoru zobrazené na displeji.
13. MinElute spin kolonku ve sběrné zkumavce ještě jednou zcentrifugujeme 1 min při 10 000 g pro eluci zbytku DNA. Objem DNA po přečišťovacím protokolu na QIAcube je 15 µl.
14. Přečištěnou DNA můžeme uložit při 2–8 °C do 24 hod nebo zamrazit na –20 °C na delší dobu.

Přečištění DNA po bisulfitární konverzi manuálně

Pozn.: Pokud nemáme přístroj QIAcube, můžeme konvertovanou DNA přečistit na kolonkách manuálně. Centrifugujeme při RT na maximální výkon.

1. Pufrý temperujeme na RT.
2. Po dokončení bisulfitární konverze zkumavky krátce zcentrifugujeme. Poté přepipetujeme celých 140 µl bisulfitární reakce do označených 1,5 mL Safe-lock mikrocentrifugačních zkumavek.
3. Přidáme 310 µl pufru Buffer BL ke každému vzorku. Zvortexujeme a krátce stočíme.
4. Přidáme 250 µl 96–100% EtOH ke každému vzorku. Pulzně vortexujeme 15 s a krátce stočíme.
5. Označíme si MiElute®DNA spin kolonky. Vložíme je do sběrných zkumavek a do stojánu. Směs z předchozího kroku přepipetujeme na odpovídající kolonku.
6. Kolonky centrifugujeme 1 min. Ze sběrných zkumavek odstraníme roztok a kolonky umístíme zpět do zkumavky.
7. Do každé kolonky přidáme 500 µl pufru Buffer BW. Centrifugujeme 1 min. Ze sběrných zkumavek odstraníme roztok a kolonky umístíme zpět do zkumavky.
8. Do každé kolonky přidáme 500 µl pufru Buffer BD. Dáváme pozor, abychom nepřenesli žádný precipitát. Minimalizujeme vystavení Buffer BD vzduchu, aby zbytečně nedocházelo ke změně pH. Zavřeme kolonku víčkem a inkubujeme 15 min při RT.
9. Kolonky centrifugujeme 1 min. Ze sběrných zkumavek odstraníme roztok a kolonky umístíme zpět do zkumavky.
10. Do každé kolonky přidáme 500 µl pufru Buffer BW. Centrifugujeme 1 min. Ze sběrných zkumavek odstraníme roztok a kolonky umístíme zpět do zkumavky.
11. Promytí pomocí Buffer BW v kroku 10) zopakujeme.
12. Do každé kolonky přidáme 250 µl 96–100% EtOH. Centrifugujeme 1 min. Sběrné zkumavky vyhodíme. Kolonky umístíme do nových 2 mL zkumavek a centrifugujeme 1 min k odstranění zbytkových

roztoků. Pokud máme možnost, inkubujeme otevřené kolonky (ve zkumavkách) v termobloku 5 min při 60 °C k odpaření zbytkových roztoků.

13. Sběrné zkumavky vyhodíme. Kolonky umístíme do nových 1,5 mL centrifugačních zkumavek (nedodáno s kitem). Přidáme 15 µl elučního pufru Buffer EB přímo do středu membrány v kolonce a opatrně zavřeme víčko kolonky.
14. Kolonky inkubujeme 1 min při RT. Eluujeme DNA – centrifugujeme 1 min. Kolonku vyhodíme. Přechištěnou DNA můžeme uložit při 2–8 °C do 24 hod nebo zamrazit na 20 °C na delší dobu.

PCR amplifikace metylačních markerů AgePlex

1. Pro PCR amplifikaci metylačních markerů použijeme PyroMark PCR Kit (PCR reagentie, <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=b8cdb9f4-clec-4045-83dd-468f4bf5b8fa&lang=en>) a AgePlex Mono Kit (PCR primery). Jeden z primerů je označen biotinem, aby byla umožněna imobilizace na magnetické kuličky pokryté streptavidinem během přípravy jednovláknového DNA templátu v sekvenačním běhu.
2. Při RT necháme roztát PyroMark PCR Master Mix, primery, 25 mM MgCl₂ and RNase-free vodu. Roztoky zvortexujeme, krátce scentrifugujeme a odložíme do chladicího stojánu.
3. Připravíme a označíme si 8zkumavkové stripy o objemu 200 µl. Nachystáme si reakční směsi (► tab. 13). Pro každý vzorek potřebujeme 5 různých PCR reakcí s 5 různými páry primerů pro markery: *ELOVL2*, *Clorf132*, *TRIM59*, *KLF14* a *FHL2*. V tabulce (► tab. 13) je uveden výpočet pro 1 reakci, čtyřnásobek (1 sekvenační běh na přístroji PyroMark) a dvanáctinásobek (plná kapacita QIAcube) s pipetovací chybou 17 %. Jednotlivé reagentie přidáváme v uvedeném pořadí, abychom se vyvarovali vysoké lokální koncentraci solí.

Tab. 13: Složky PCR amplifikace metylačních markerů

Reagencie	1 reakce	4 reakce	12 reakcí
PyroMark PCR Master Mix, 2×	12,5 µl	58,5 µl	175,5 µl
25 mM MgCl ₂	1,0 µl	4,7 µl	14,0 µl
AgePlex PCR Mono primer mix	2,0 µl	9,4 µl	28,1 µl
RNase-free voda	4,0 µl	18,7 µl	56,2 µl
Celkový objem	19,5 µl	91,3 µl	273,8 µl

4. Propipetujeme master mix, rozpipetujeme ho po 19,5 µl do stripů/200 µl zkumavek.
5. Přípravu master mixu a rozpipetování musíme provést celkem 5×, pro každý z metylačních markerů.
6. Do každé zkumavky s jednotlivými markery přidáme 3 µl purifikované konvertované DNA (5×). Zkumavky/stripy zvortexujeme a krátce stočíme.
7. Spustíme PCR amplifikaci na termocykléru Bio-Rad (► tab. 14). Používáme termocyklér s vyhříváním víkem a nastavením Ramp speed na 1 °C/s.

Tab. 14: Tepelné podmínky PCR amplifikace metylačních markerů

Krok	Čas	Teplota	Počet cyklů
Hot start	15 min	95 °C	1
Denaturace	30 s	94 °C	45
Annealing	60 s	56 °C	
Extenze	60 s	72 °C	
Finální extenze	10 min	72 °C	1
Chlazení	∞	4 °C	1

8. Po amplifikaci můžeme vzorky uchovat přes noc při 2–8 °C, na delší dobu při –20 °C.

Pyrosekvenování na přístroji PyroMark Q48

1. Použijeme PyroMark Q48 Advanced CpG Reagents. Rozpustíme lyofilizované Enzyme mixture a Substrate mixture přidáním 660 µl pufu PyroMark Advanced Annealing Buffer do každé ze zkumavek.

Nevortexujeme, jen jemně protřepeme. Po rozpuštění jsou obě směsi stabilní nejméně 5 dní při 2–8 °C. Zamražené reagenty by neměly projít více než 6 rozmrazovacími cykly.

2. 48 pozic na disku přístroje PyroMark může být využito několika způsoby. Můžeme analyzovat 4 vzorky s 5 sekvenačními primery v duplikátu (40 obsazených pozic) nebo 9 vzorků v jednom opakování v jednom sekvenačním běhu (45 obsazených pozic). Pro vyšší přesnost můžeme opakovat sekvenační běh se stejnými vzorky. Více informací se dočteme v manuálu výrobce <https://www.qiagen.com/nl/resources/resourcedetail?id=650a0c13-3b8e-4a77-b433-6b1e50b9525a&lang=en>.
3. Zapneme program PyroMark Q48 Autoprep. Vytvoříme soubor *Run Setup* pro aktuální sekvenační běh podle předchozího běhu – klikneme pravým tlačítkem v průzkumníku zkratk na ukončený běh (processed run file, modrý obdélníček se zaškrtnutím) a vybereme *Copy and Rerun* v kontextovém menu. Zkopíruje se jen nastavení běhu, ne samotný běh a analýzu dat. Vybereme *standard protocol type*, zaškrtneme *manual primer loading* a dvojkliknutím na danou jamku upravíme názvy vzorků (*edit sample ID*), popřípadě nakopírujeme z .txt souboru. Uložíme soubor dle našich zvyklostí (např. *RRMMDD_Ageplex_operátor*). Nastavení disku si můžeme vytisknout z *Tools* menu výběrem *Pre Run Information*.
4. Pokud chceme nastavit nový pokus, přes nabídku vybereme *New CpG Assay* a (► tab. 15) doplníme nezbytné informace (kdy A = adenin, C = cytosin, G = guanin, T = thymin, R = G nebo A, Y = T nebo C). Vytvoříme CpG Assay pro každý metylační marker. Vložíme *Sequence to analyze* z tabulky do okénka *Sequence Before Bisulfite Treatment* v PyroMark Q48 Autoprep Software. Zaškrtneme *Forward Orientation*. Můžeme zamknout assay pro editování kliknutím na tlačítko *Lock Assay* umístěné dole v okně při nastavování assaye (poté nebude možné po dokončení pokusu upravovat parametry analýzy nebo výsledky). Podle pokynů v kroku 3 vytvoříme nastavení disku.

Tab. 15: CpG assaye pro metylační markery při určování věku

Název sekvence	Sekvence k analýze („Sequence to analyze“)	Proměnné pozice	Umístění (GRCh38)
ELOVL2	CCRTAAACRTTAAACCRCCRCRAAACCRAC	C7	Chr6:11044661
C1orf132	AAATCTACRCAAACRACRATAAATAATCC	C1	Chr1:207823681
TRIM59	GGTTTGGYGYGGGAYGAGGYGAAGYGTGG TGGTYGAYGGTTTTGAGGAATTATTTTTATTT	C7	Chr3:160450199
KLF14	TYGYGTTTTTTTTTGTGGYGGAGTTAGGTA ATGGTAATAGAG	C1	Chr7:130734355
FHL2	AGTTATYGGGAGYGTGTTTTYGGYGTGGG TTTTYGGGYGYGAGTTTGGAYGAGGTTGGG	C2	Chr2:105399288

5. USB disk se souborem vytvořeným softwarem PyroMark Q48 Autoprep vložíme do USB portu na přístroji PyroMark Q48 Autoprep. USB port je umístěn na přístroji vpředu.
6. Před prvním pyrosekvenčním během dne se musí promýt vstřikovače (injektory) v jednotlivých kazetách (► obr. 23) deionizovanou / high-purity vodou: na domovské obrazovce vybereme tlačítko *Cleaning* a všechny injektory. U vybraných injektorů se zobrazí symbol kapky. Do přístroje vložíme absorpční pásek s konci spojenými vlevo na pozici 9 hodin (► obr. 24). Do každé nádržky injektoru určeného k promytí napipetujeme 200 µl deionizované vody (pipetujeme bez tvorby bublinek dolů do zúžené části nádržky, nesmíme však porušit filtr!). Zavřeme a zamkneme víčka kazet. Výběrem tlačítka *Start* spustíme první promytí. Poté následujeme pokyny a promyjeme injektory ještě jednou.
7. Ke spuštění sekvenčního běhu na domácí obrazovce vybereme tlačítko *Sequence* a načteme běh z USB disku. Nastavení běhu spustíme kliknutím na jeho název a šipku, která se za názvem běhu objeví.
8. Do přístroje vložíme nový absorpční pásek (► obr. 24). Absorpční pásek má maximální kapacitu 8 mL tekutiny. Software upozorní uživatele na výměnu pásku před spuštěním běhu, nástřikem nebo promytím. Prostor komory lze vyčistit etanolem, odstraníme tak přebytky odpadu.
9. Naplníme vstřikovače. Na obrazovce přístroje vybereme vstřikovače, které chceme naplnit. U vybraných injektorů se zobrazí symbol



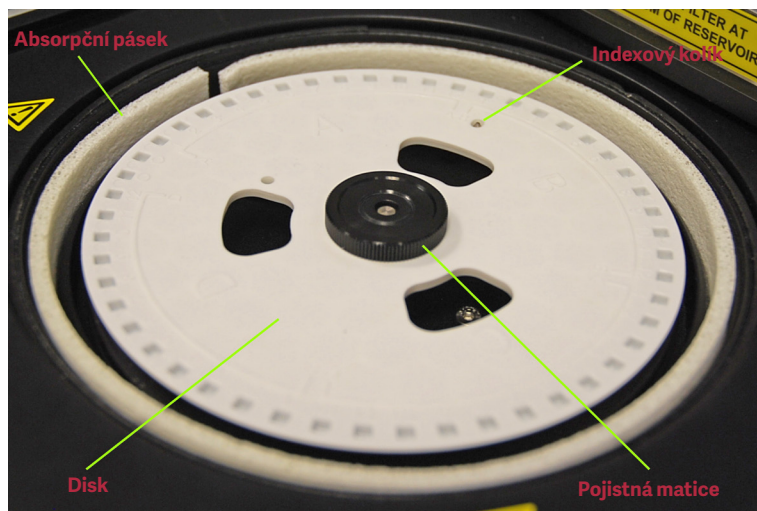
Obr. 23 Kazety s injektory:

Kazeta s nukleotidy: A – dATPaS, C – dCTP, G – dGTP, T – dTTP;

Kazeta s primery: P1 – Primer 1, P2 – Primer 2, P3 – Primer 3,

P4/BB – Primer 4/Binding buffer;

Kazeta s reagensii: DS – Denaturation solution, E – Enzyme, S–Substrate, AB – Annealing buffer.



Obr. 24 Komora přístroje PyroMark Q48

- kapky. Pokud budeme spouštět pouze 1 běh v rámci dne, označíme *Last run today* a software spočítá objemy reagensů tak, aby vystačily pouze na 1 běh.
10. Ručně napipetujeme každou reagensii do daného injektoru podle objemů zobrazených na obrazovce přístroje. Pipetujeme bez tvorby bublinek tak, aby se nepoškodil filtr ve spodní zúžené části nádržky. Zavřeme víčka kazet a zamkneme je zámečky.
 11. Vybereme tlačítko *Start*. Vstřikovače se zeleným zaškrtnutím ukazují, že jsou již naplněny a nepotřebují být plněny znovu. Vstřikovače s otazníkem byly naplněny před delší dobou a naplnění doporučují, ale nemusí být provedeno.
 12. Do přístroje vložíme disk/kotouč (► obr. 24): přidržíme disk prsty pomocí úchytů, umístíme indexový otvor kotouče (otvor u jamky B1) nad indexový kolík kotouče na náboji rotoru a vložíme disk na rotor. Kolík musí být umístěn v otvoru, aby mohl detekční systém disk rozpoznat. Disk zafixujeme v pozici zašroubováním pojistné matice k rotoru.
 13. Naneseme DNA templát (produkt PCR) a magnetické kuličky na disk. Vynecháváme pozice se symbolem \emptyset , které slouží jako odpadní jamky.
 14. Před pipetováním zvortexujeme řádně magnetické kuličky do homogenní suspenze. Napipetujeme 3 μ l magnetických kuliček do každé požadované jamky na disku dle rozpisu. Používáme elektronickou multi-dávkovací pipetu. Magnetické kuličky po vortexování rychle sedimentují, tudíž opakujeme vortexování mezi každým pipetováním.
 15. Napipetujeme 10 μ l PCR produktu do správné jamky na disku, následujeme pokyny na obrazovce.
 16. Běh spustíme tlačítkem *Start*. Příprava jednovláknové DNA zahrnuje odpařování v zahřívacím kroku (víko komory je v tomto kroku otevřené) ke snížení objemu v jamce.
 17. Po 20 min ručně přidáme sekvenační primery: napipetujeme 2 μ l odpovídajícího sekvenačního primeru (4 μ M) k danému vzorku v jamce


- na disku. Potvrdíme tlačítkem *Next*. Víko přístroje se automaticky zavírá a pyrosekvenování začíná, čas se odečítá.
18. Po dokončení běhu se víko přístroje automaticky otevře a data se přenesou na USB disk. Po dokončení přenosu se zobrazí zpráva *Run Complete*.
 19. Vybereme tlačítko *Home* k návratu na domovskou stránku. Zvolíme, zda chceme spustit další sekvenční běh, nebo promýt vstřikovače.
 20. Po posledním běhu vyjmeme disk z přístroje a promyjeme vstřikovače výběrem tlačítka *Cleaning*. Pokud byl vybrán poslední běh dne, automaticky se zobrazí oznámení o zahájení promývání.
 21. K promývání pokračujeme podle kroku 6). Zavřeme a zamkneme víčka kazet, vyměníme absorpční pásy a vybereme tlačítko *Start*. Úspěšně promyté injektory se označí zeleným zaškrtnutím. Po ukončení promývání odemkneme víčka kazet a trochu je pootevřeme. Slouží to jako prevence kondenzace a minimalizuje usedání prachu v kazetách.
 22. Vezmeme si USB disk s přenesenými daty a analyzujeme data na PC s PyroMark Q48 Autoprep Software. Zkontrolujeme, že v operačním systému PC máme nastavenou tečku jako desetinný oddělovač.
 23. V PyroMark Q48 Autoprep Software otevřeme soubor běhu přes *File – Open* a v nabídce vybereme *CpG analysis mode*. Všechny jamky z disku s nastavenou assayí (Assay Setup) odpovídající vybranému způsobu analýzy se automaticky zanalyzují.
 24. Analýza vybraných buněk může být spuštěna kliknutím na tlačítko *Analyze Selected Wells* (modré okno se zaškrtnutím) v tabulce *Overview*. Můžeme také kliknout pravým tlačítkem myši a z kontextové nabídky vybrat *Analyze Selected*. Během analýzy se zobrazuje dialogové okno s průběhem analýzy, tlačítkem *Stop* a názvem buňky, která je právě analyzována. Dialogové okno se zavře po dokončení analýzy nebo po kliknutí na tlačítko *Stop*. Po dokončení analýzy se běh automaticky uloží na pozadí.
 25. Podíváme se na výsledky analýzy. Vybereme si zanalyzovanou jamku (světle modrou) v tabulce *Overview*. Odpovídající pyrogram je zobrazen v části *Pyrogram* a informace o jamce jsou uvedeny v části

- Well Information*. Pokud si vybereme v přehledu jamek více jamek najednou, zobrazují se informace o té jamce, která je oranžově ohraničena.
26. Hodnocení kvality je zobrazeno ve výsledku jako barva pozadí (procento metylace nebo procenta průměrné metylace zobrazené v pyrogramu): modrá = v pořádku (*Passed*), žlutá = zkontrolovat (*Check*), červená = nezadařilo se (*Failed*).
 27. K určení hladiny metylace každého markeru spočítáme průměr hladin metylace ze dvou nezávislých pyrosekvenačních běhů. Pro jednotlivé metylační markery použijeme hodnotu metylace místa CpG 7 u *ELOVL2*, CpG 1 u *Clorf132*, CpG 7 u *TRIM59*, CpG 1 u *KLF14* a CpG 2 u *FHL2*.
 28. Výsledky si můžeme vyexportovat z nabídky *Reports*. Vybereme *CpG Analysis Results* nebo *CpG Full Report*.
 29. Analýzu uložíme kliknutím na ikonku diskety v panelu nástrojů.
 30. Pro stanovení věku osoby, která poskytla vzorek, jdeme na webovou aplikaci *Age Calculator* dostupnou na <http://biovectis.com/forensic/age-calculator>. Vyplníme údaje dle pokynů na webové stránce, výpočet biologického věku spustíme kliknutím na tlačítko *AgePlex*. Aplikace použije k výpočtu nejaktuálnější algoritmy (► **obr. 25**).

Vzorový výsledek

Výsledek na stránce BioVectis je odhadovaný věk původce v okamžiku zanechání stopy (popřípadě v okamžiku odběru kontrolního vzorku). V posudku by měl být referován spolu se statistickým parametrem, popisujícím variabilitu. V komunitě měřičů epigenetického věku se používá MAD, mean absolute deviation (průměrná absolutní odchylka mezi predikovanou a reálnou hodnotou) spolu s pravděpodobností odlehklých hodnot. Například při $MAD \pm 4$ roky pro rozsah věku od 14 do 75 let může být 80% pravděpodobnost, že odhad bude správný s odchylkou ± 6 let, 70% pravděpodobnost, že odhad bude správný s odchylkou ± 5 let, 60% pravděpodobnost, že odhad bude správný s odchylkou ± 4 roky a 30% pravděpodobnost, že odhad bude správný s odchylkou ± 3 roky.

Pro užší rozsah věku (například 15 až 35 let) jsou pravděpodobnosti pro odchylky 6, 5, 4, 3 roky vyšší (90 %, 82 %, 68 %, 50 %).



The Age estimation calculator

The calculator estimates human age based on five epigenetic markers

Instruction:

1. Enter the percentage of marker methylation level (from 0 to 100%).
2. Press the AgePlex button - the estimated age will be shown in years

Marker	[%]
ELOVL2 - C7	<input type="text" value="68"/>
C1orf132 - C1	<input type="text" value="53"/>
TRIM59 - C7	<input type="text" value="37"/>
KLF14 - C1	<input type="text" value="6"/>
FHL2 - C2	<input type="text" value="41"/>

AgePlex

Estimated Age

42

Obr. 25 Výstup z online stránky BioVectis
(v tomto případě byl kalendářový věk 42 let shodně s odhadem)

Komentář a řešení problémů

- ▶ EpiTect Fast DNA Bisulfite Conversion Kit vyžaduje nižší vstupní množství DNA, než jiné kity. I tak je nutné počítat s nutností kompenzace DNA degradace a ztrát během konverze a přečištění.
- ▶ Pufr Buffer BL obsahuje guanidinové soli, které jsou nekompatibilní s čisticími a dezinfekčními prostředky obsahujícími bělidlo (mohou vytvořit toxické výpary s obsahem chloru).
- ▶ Desulfonace jako poslední krok chemické konverze cytosinů je zahrnuta při purifikaci na kolonce.

- ▶ Čistící a dezinfekční prostředky s etanolem lze použít k dezinfekci povrchů přístroje QIAcube – pracovního prostoru nebo centrifugy, ale ne dvířek. Dvířka čistíme pouze destilovanou vodou.
- ▶ K odstranění kontaminace nukleovými kyselinami na pracovních plochách, pomůckách, rotoru a odpadní nádobě v QIAcube můžeme použít DNA-ExitusPlus.
- ▶ Lahvičky na pufry (QIAcube) neponořujeme do 70% etanolu. Modré kolečko není odolné etanolu.
- ▶ Pokud používáme méně než 100 ng vstupní genomické DNA, můžeme použít Carrier RNA během kroku přechištování DNA (nutno zkusit, v našem případě nebylo třeba). Lyofilizovanou Carrier RNA (310 µg) rozpustíme v 310 µl RNase-free vody, aby výsledná koncentrace roztoku byla 1 µg/µl. Rozpuštěnou Carrier RNA rozpipetujeme po alikvotech (např. po 50 µl) a skladujeme při –20 °C. Připravujeme objem roztoku Buffer BL-Carrier RNA pouze pro aktuální vzorky (v poměru 1:100). Tento roztok by se měl připravovat vždy čerstvý, je stabilní při 2–8 °C až 48 hod.

Problém	Příčina a řešení
✓ Nízký stupeň konverze po bisulfitační reakci	<ul style="list-style-type: none"> ✓ DNA špatné kvality (např. kontaminace proteiny) → zkontrolujeme, že poměr A_{260}/A_{280} vzorku DNA se pohybuje mezi 1,7 a 1,9. ✓ Množství DNA mimo doporučený rozsah → zvýšíme nebo snížíme množství vstupní DNA tak, abychom zůstali v rozsahu 1 ng – 2 µg purifikované DNA. ✓ Bisulfitační roztok obsahuje precipitáty → zahřejeme Bisulfite Solution na 60 °C a vortexujeme do rozpuštění precipitátů.
✓ Špatné výsledky v navazujících aplikacích PCR	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Selhání bisulfitační konverze → vzorek DNA byl degradován před modifikační reakcí. Zajistíme, že se s vzorkem DNA manipuluje a skladuje se správně.
✓ Málo nebo žádná DNA po purifikačním kroku	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Carrier RNA nebyla přidána do Buffer BL → připravíme carrier RNA a přidáme do Buffer BL, jak je popsáno v Komentářích. ✓ Buffer BL obsahuje precipitáty → Zkontrolujeme precipitáty v Buffer BL. Rozpustíme je zahřátím (max 70 °C) a jemným protřepáním.
✓ Špatný nebo zcela chybný pyrosekvenanční běh	<ul style="list-style-type: none"> ✓ V pozadí je kontaminující sekvence z PCR → zkontrolujeme PCR produkt na agarózovém gelu pro potvrzení, že máme pouze 1 specifický PCR amplikon

Problém	Příčina a řešení
✓ Chyby při pyrosekvenování související s analýzou	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Chybně rozpuštěné nebo skladované reagencie → následujeme instrukce z této kapitoly nebo manuálu výrobce. Zařadíme do nastavení běhu prázdnou jamku (pouze Annealing Buffer), abychom zkontrolovali, zda peaky na pozadí nepochází z nukleotidů. ✓ Chyba v pořadí nukleotidů → Spustíme test vstřikovačů (část 8.5 v PyroMark Q48 Autoprep User Manual). Pokud problém přetrvává, musíme kontaktovat technickou podporu QIAGEN.
✓ Špatný nukleotid napipetovaný do vstřikovače přístroje PyroMark Q48 Autoprep	✓ Spustíme promytí špatně naplněného vstřikovače podle kroku 6) E Pyrosekvenování na přístroji PyroMark Q48.
✓ Pumpa přístroje PyroMark Q48 Autoprep nedosáhne dostatečného tlaku	✓ Zkontrolujeme, že jsou víčka kazet zavřená a kazety jsou pevně usazeny.
✓ Selhání při promývání/naplňování injektorů	✓ Zkontrolujeme, zda je dostatek roztoků v nádržkách kazet. Může se jednat o potíže se senzorem kapiček nebo se vstřikovači. Spustíme test vstřikovačů (část 8.5 v PyroMark Q48 Autoprep User Manual).
✓ Roztok nebo magnetické kuličky mimo jamky	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Zkontrolujeme, že indexový kolík kotouče na rotoru je umístěn v indexovém otvoru kotouče (blízko jamky B1), aby mohl detekční systém disk rozpoznat. ✓ Zkontrolujeme, že objem v jamce nepřesáhl 20 µl.
✓ Odhadovaný věk zásadně neodpovídá chronologickému věku	✓ Pokud nedošlo k chybě v „mokrém“ části laboratorní práce, může se jednat o špatné použití modelu – jedná se o jinou tkáň nebo původce biologického materiálu se nějakým metylačně důležitým parametrem odlišuje od skupiny, na základě které byl model vystavěn.

Poděkování

Kapitola byla vypracována za přispění grantových projektů VI20202022123, LM2018133, LM2018125, LM2018132, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008448, EF16_013/0001674, IGA LF UP 2022_012.

Kapitola je aktualizovaným překladem Chapter 52: *Detection of methylation by pyrosequencing for biological age estimation* (Karolína Bartáková) z knihy *Laboratory techniques in cellular and molecular medicine* (ISBN 978-80-244-6049-9, DOI: 10.5507/lf.22.24460499).

Kapitola 6:

Fenotypování DNA a predikce věku z krve

Lucie Kotková², Rastislav Slavkovský¹, Jana Vrbková¹, Jiří Drábek¹

¹Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc

²Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

Úvod

Analýza DNA odebrané z biologických stop na místě činu má ve forezním prostředí jedinečné postavení jako významný a spolehlivý způsob identifikace osob.

V tomto kontextu je práce s DNA výhradně komparativní – profil sestavený na základě vzorku odebraného na místě činu je srovnáván s DNA profily uloženými v policejní databázi nebo profily DNA potenciálních podezřelých identifikovaných tradičními vyšetřovacími metodami (120).

Pokud není možné vytipovat úzkou skupinu podezřelých, řešením může být *plošný screening DNA*, kde jsou za součinnosti veřejnosti odebrány vzorky všech osob žijících v dané zájmové oblasti a postupně „naslepo“ porovnávány se vzorkem z místa činu (121). Jednou z nejvý-

znamnějších akcí tohoto typu v historii české kriminalistiky je případ vraždy ve středočeské Kmetiněvsi z roku 2004, kdy bylo odebráno a postupně analyzováno 700 vzorků místních obyvatel.

Metoda plošného screeningu je ale vnímána jako eticky velmi problematická a v některých zemích ji platná legislativa vůbec neumožňuje. Mimo to je velice zdoluhavá a finančně nákladná.

Jako řešení se nabízí rozvíjející se oblast fenotypování DNA. Jeho cílem je využít analýzu DNA nikoliv jako soudní důkaz o vině či nevině, ale jako vyšetřovací nástroj schopný zúžit skupinu potenciálních podezřelých a nasměrovat vyšetřování vůči specifické skupině lidí. Menší skupinu podezřelých je v případě potřeby následně možné efektivněji otestovat konvenčními DNA testy vedoucími k přímé identifikaci pachatele (120).

Fenotypování DNA pracuje s pravděpodobnostními modely, které umožňují s jistou pravděpodobností odvodit výskyt určitého znaku u pachatele (122). Jedná se nejčastěji o externě viditelné charakteristiky jako je věk, biogeografický původ, barva vlasů, očí nebo kůže, ale předpokládá se, že fenotypování DNA by se mohlo v budoucnu rozšířit i na další vizuální charakteristiky (stavba postavy, ztráta vlasů, rysy tváře) a znaky životního stylu (kouření, požívání alkoholu nebo drog, specifický jídelníček, socioekonomický status) (123).

Epigenetika, studium dědičných změn vyjádření genetické informace bez přímé změny sekvence DNA, může vystupovat jako spojovací prvek mezi relativně stabilním genomem a dynamickým prostředím. Za nejspolehlivější epigenetický marker je ve forenzním prostředí považována analýza změny metylace DNA, tedy míra modifikace cytosinů v CpG dinukleotidech (úsek sekvence DNA, kde po cytosinu následuje guanin, oddělený pouze fosfátovou skupinou) v oblasti promotorů určitých genů, která ovlivňuje míru jejich aktivního přepisu (121).

Metylace cytosinu v konkrétní pozici na DNA řetězci je binární znak, protože daný cytosin metylovou skupinu buď obsahuje, nebo ne (124). Reálný biologický vzorek ale obsahuje velké množství DNA řetězců, u kterých se status cytosinu v dané pozici může lišit, výsledná hodnota metylace je tedy udávána buď od nuly do jedné nebo jako procento

metylovaných cytosinů v dané oblasti napříč všemi molekulami DNA v testovaném vzorku.

Přestože buňky různých tkání v těle jedince mají shodný genom, k zisku odlišných vlastností a funkcí jim pomáhá mimo jiné DNA metylace. Metylační analýza je proto vhodná pro identifikaci různých typů tkání a tělních tekutin nalezených na místě činu. Z toho vyplývá, že možnosti forenzní aplikace detekce metylace jsou široké, nicméně tato kapitola (stejně jako kapitola předchozí) se bude věnovat jen molekulární predikci věku zůstavitele stopy.

Epigenetická predikce věku zůstavitele stopy je založená na premise, že aktivita určitých genů se v průběhu lidského života mění (125), a že v promotorech genů existují určité cytosiny, jejichž nárůst nebo pokles metylace jsou ovlivněny jen věkem.

V současné době je k dispozici několik rozsáhlých panelů využívajících stovky CpG oblastí. Tyto panely a interpretace jejich výsledků jsou obvykle označovány jako epigenetické hodiny (112, 126). Vyznačují se vysokou přesností určení věku, ale vzhledem k jejich úrovni multiplexingu jsou pro rutinní forenzní praxi zcela nevhodné. Limitujícím faktorem forenzních analýz totiž zpravidla bývá nezbytné množství vstupní DNA z místa činu, jejíž kvalita i kvantita je z velké části mimo kontrolu laboratoře a mnohdy výrazně omezená.

Uznávaný model Steva Horvatha z roku 2013 vznikl na základě analýzy téměř osmi tisíc vzorků a využívá pro věkovou predikci 353 CpG. Je charakterizován průměrnou absolutní odchylkou predikce 3,6 let napříč sadou více než 50 testovaných tkání (112). Ve stejném roce publikoval svůj predikční model založený na 71 CpG a s průměrnou absolutní odchylkou 3,9 let i tým Gregoryho Hannuma; tento model už byl ale zaměřen úzce na analýzu krevních vzorků (126).

Vzhledem k praktickým omezením je vhodné přesunout svou pozornost k menším modelům, které pro predikci věku vyžadují analýzu jednotek CpG (127). Bylo publikováno velké množství takových predikčních modelů, nejčastěji založených na metodě pyrosekvenování (► tab. 16). V konkrétních CpG oblastech je mezi jednotlivými modely poměrně malá shoda, je tedy těžké zvolit optimální skladbu modelu.

Analýzou míry metylace pomocí modelů vyvinutých v letech 2014 až 2017 je možné odhadnout věk zůstavitele stopy s průměrnou absolutní odchylkou 3–6 let (116, 119, 128–131).

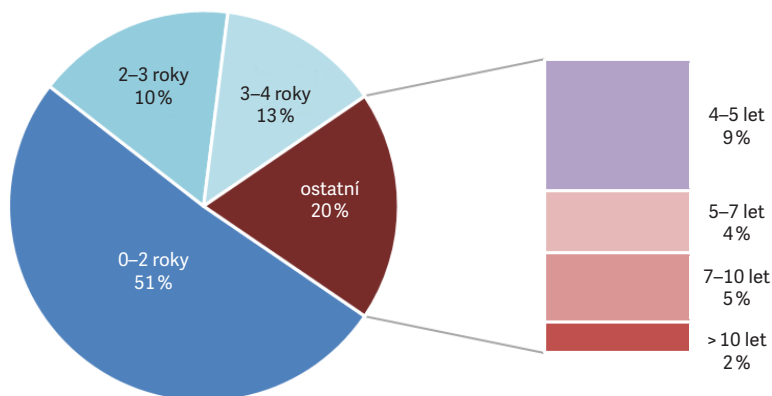
Tab. 16: Modely používané pro predikci věku a jejich průměrná absolutní odchylka mezi predikovanou a reálnou hodnotou

	Počet CpG	MAD
Weidner, 2014	3	4,5–5,4
Bekaert, 2015	4	3,8–4,0
Park, 2016	3	3,2–3,3
Thong, 2017	3	3,3–5,0
Zbieć-Piekarska, 2015a	2	5,0–5,8
Zbieć-Piekarska, 2015b	5	3,4–3,9
Huang, 2015	4	7,8–7,9

Jistou komplikací představuje již zmíněná tkáňová specifita DNA metylací. V různých druzích tkání se přirozené stárnutí projevuje rozdílně; například CpG metylace závislá na věku v krvi se neshoduje s metylací ve vzorcích spermatu (123). Proto je nutné vyvinout specifické predikční modely pro jednotlivé druhy tkání nacházené na místě činu.

V současné době jediný komerčně dostupný forenzní test pro věkovou predikci AgePlex (Qiagen, založený na modelu Zbieć-Piekarska, 2015b) je validován pro použití pouze u krevních vzorků. Modely vyvíjené v rámci konsorcia VISAGE (<https://www.visage-h2020.eu/>), které dosáhly úrovně technologické připravenosti 5 (TRL5, technologie je validovaná v relevantním prostředí) jsou připravovány samostatně pro analýzu vzorků krve, spermatu, slin a kostí (119).

Následující protokol byl vyvinut v rámci projektu Bezpečnostního výzkumu VI20202022123 a popisuje provedení věkové predikce zůstavitele krevního vzorku ze vzorku vyizolované DNA. Při testování tohoto modelu bylo 80 % vzorků predikováno správně (maximální přípustná odchylka predikované a skutečné hodnoty byla čtyři roky), při maximální přípustné odchylce predikované a skutečné hodnoty pět let se úspěšnost zvedla na 89 %. Více než polovina vzorků (51 %) byla správně věkově zařazena s odchylkou dvou let (►obr. 26).



Obr. 26 Procento vzorků predikovaných s danou odchylkou od reálné hodnoty věku

Přístroje, reagentie, software

Reagentie

EZ DNA Methylation-Gold kit; Zymo Research
(D5005; dodává Amplicon)

Platinum Multiplex PCR Master Mix; Applied Biosystems
(4464268; dodává Fisher Scientific CZ)

EvaGreen Dye, 20x in the water; Biotinum
(Biot31000; dodává Labmark)

QIAxcel DNA High Resolution Kit; Qiagen (929002; dodává iBiotech)

QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen (28104; dodává iBiotech)

Qubit dsDNA HS Assay Kit; ThermoFisher
(Q33230; dodává Fisher Scientific CZ)

Nextera XT DNA Library Preparation Kit; Illumina
(FC-131-1024; dodává GeneTiCA)

Nextera XT Index Kit; Illumina (FC-131-1001; dodává GeneTiCA)

MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 cyklů) / MiSeq Reagent Micro Kit
(300 cyklů) / MiSeq Reagent Kit v2 (300 cyklů) / MiSeq Reagent Kit v3

(150 cyklů), vše Illumina (MS-103-1001/MS-103-1002/MS-102-2002/MS-102-3001; dodává GeneTiCA)

DEPC-Treated Water, nuclease-free; Ambion
(AM9906; dodává Fisher Scientific CZ)

Etylalkohol pro UV spektrometrii; Penta
(02850M1000; dodává Verkon)

Přístroje a laboratorní vybavení

Laboratoř příjmu a zpracování vzorku

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000

Laboratoř pre-PCR

Box Biohazard HERAsafe KS

VortexMixer, LabMark

Vortex Genie 2, P-lab

Centrifuga 5430 Eppendorf s výkyvným rotorem FA-45-24-11-HS
Eppendorf, Minispin

Termocycler MasterCycler Nexus, Eppendorf

MiSeq, Illumina

PCR zkumavky, Eppendorf zkumavky 1,7 mL, PCR desky

Pipety, špičky

Laboratoř PCR

Centrifuga 5430 Eppendorf s výkyvným rotorem A-2-MTP

Realtime PCR cycler CFX96, Biorad

Laboratoř post-PCR

Box Biohazard Mars Safety Classe 2

QIAxcel; Qiagen

MiniCentrifuge Ohaus FC5306

Qubit 2.0 Fluorometr

PCR zkumavky, Eppendorf zkumavky 1,7 mL, PCR destičky,

0,2 mL stripy, zkumavky určené pro fluorometrii

Chlazený stojánek

Pipety, multikanálové pipety, špičky

Software

Bio-Rad CFX Maestro 2.2 v5.2.008.0222

QIAxcel Screen Gel 1.5.0.16

Illumina Experiment Manager 1.19.1

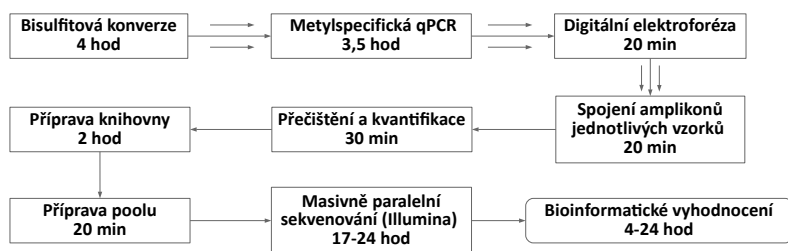
Bismark Bisulfite Mapper v0.22.3

Bowtie2 v2.4.4

SeqMonk v1.48.0

Protokol

Procesní diagram



Obr. 27 Procesní kroky při určování věku pomocí MPS z krve

Níže uvedený protokol byl upraven a optimalizován na základě obecného postupu uvedeného v metodické publikaci *Laboratory Techniques in Cellular and Molecular Medicine* (132).

Bisulfitová konverze

Pro bisulfitovou konverzi použijeme EZ DNA-Metylation-Gold kit (Zymo research).

Ideální množství vstupní DNA je 200–500 ng, výrobce kitu připouští rozsah 500 pg2 µg. Vzorky zpracováváme optimálně v sadách po deseti.

Všechny centrifugační kroky provádíme při 19 360 g (14 000 rpm při poloměru rotoru 87,8 mm).

1. Připravíme CT Conversion reagent.
 - ▷ Zkumavka označená CT Conversion Reagent obsahuje prášek. Před otevřením ji stočíme.
 - ▷ Do zkumavky označené CT Conversion Reagent přidáme 900 µl vody, 300 µl M Dillution pufru a 50 µl M-Dissolving pufru.
 - ▷ Hotovou konverzní směs vortexujeme 10 minut při laboratorní teplotě.
2. V PCR zkumavce smícháme 130 µl připravené konverzní směsi a 20 µl DNA. Promícháme propipetováním a krátce stočíme.
3. Umístíme do termocykléru a spustíme program (► **tab. 17**).

Tab. 17: Protokol pro bisulfitovou konverzi

98 °C	10 min
64 °C	150 min
4 °C	až 20 hodin

4. Připravíme M-Wash pufr.
 - ▷ Smícháme 1,2 mL M-Wash koncentrátu a 4,8 mL 100% etanolu. Promícháme vortexováním.
5. Na Zymo-Spin kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce nanese 600 µl M-Binding pufru a plný objem vzorku (cca 150 µl). Promícháme několika převráceními zkumavky.
6. Centrifugujeme 1 minutu. Vyprázdníme sběrnou zkumavku.

7. Naneseme na kolonku 100 µl M-Wash pufru a centrifugujeme 1 minutu.
8. Naneseme na kolonku 200 µl M-Desulphonation pufru.
9. Necháme inkubovat 15–20 minut při laboratorní teplotě, pak centrifugujeme 1 minutu.
10. Naneseme na kolonku 200 µl M-Wash pufru a centrifugujeme 1 minutu. Vyprázdníme sběrnou zkumavku.
11. Naneseme na kolonku 200 µl M-Wash pufru a centrifugujeme 1 minutu.
12. Přeneseme kolonku na čistou zkumavku.
13. Naneseme na kolonku 10 µl Elution pufru a centrifugujeme 1 minutu.

Příprava qPCR

1. Kvantifikujeme konvertovanou DNA měřením na NanoDropu. Jako blank použijeme Elution pufr.
2. Naředíme vzorky DNA na koncentraci 10 ng/µl.
3. Nachystáme primerové mixy (► **tab. 18**). Používáme primery o zásobní koncentraci 100 mM a DEPC vodu. Hotové mixy zvortexujeme a stočíme.

Tab. 18: Příprava primerových mixů

Mix A		Mix B		Mix C	
CCDC102B_F	1,0 µl	PDE4C_F	1,5 µl	C1orf132_F	0,5 µl
CCDC102B_R	1,0 µl	PDE4C_R	1,5 µl	C1orf132_R	0,5 µl
ELOVL2_F	1,0 µl	FHL2_F	0,5 µl	voda	24,0 µl
ELOVL2_R	1,0 µl	FHL2_R	0,5 µl		
Voda	21,0 µl	voda	21,0 µl		

4. Nachystáme reakční mixy (► **tab. 19**).

Tab. 20: qPCR touchdown protokol

95 °C	2 min	4*
94 °C	30 s	
65 °C *	90 s	
72 °C	60 s	
snímání fluorescence		
94 °C	30 s	30*
56 °C	90 s	
72 °C	60 s	
snímání fluorescence		
72 °C	10 min	

* = pokles teploty o 3 °C každý cyklus

Digitální elektroforéza

Digitální elektroforézu provedeme na přístroji QIAxcel (Qiagen), za použití DNA High Resolution kitu. Při měření je vždy nutné analyzovat celou řadu o dvanácti jamkách (minimálně 11 vzorků + velikostní marker). V případě menšího množství vzorků je nutné do nevyužitých jamek stripu napipetovat 10 µl DEPC vody. Bližší informace viz (133).

1. Reagencie a kazetu s kapilárami necháme temperovat na laboratorní teplotu (cca půl hodiny).
 - ▷ Dbáme na to, aby kazeta byla vždy umístěna ve svislé poloze a kapiláry byly ponořeny buď v promývacím pufru, nebo v gelu v obalu kazety, aby se předešlo jejich vysychání.
 - ▷ Kazetu umístíme do přístroje nápisem k sobě a připojíme čip. Dvířka kazetového prostoru musí být pečlivě uzavřena, jinak nedojde k detekci kazety přístrojem.
2. Nachystáme QX Alignment marker s rozsahem 15–600 bp.
 - ▷ Do každé jamky 0,2 mL dvanáctijamkového stripu napipetujeme 15 µl markeru a převrstvíme kapkou minerálního oleje, aby se zabránilo odpařování.
 - ▷ Strip umístíme do zásobníku pufrů na pozici označenou M1.

3. Naředíme velikostní marker (QX DNA Size marker) s rozsahem 25–500 bp na koncentraci 5 ng/μl v minimálním objemu 10 μl (např. 0,5 μl do 10 μl DEPC vody).
4. Do stripu nebo nové PCR destičky (podle počtu analyzovaných vzorků) smícháme 8 μl DEPC vody a 2 μl vzorku. Před měřením odstraníme ze vzorku bublinky, které by mohly způsobit zavzdušnění kazety.
5. Vzorky společně s velikostním markerem umístíme do držáku vzorků.
6. Nastavíme parametry měření v programu QIAxcel Screen Gel
 - ▷ Na záložce „*Process Profile*“ zvolíme „*Default High Res v2.0*“.
 - ▷ Na záložce „*Run Parametres*“
 - Levým tlačítkem myši označíme řady, ve kterých se nachází vzorky.
 - Pravým tlačítkem myši označíme jamku, ve které se nachází velikostní marker.
 - Nastavíme typ analýzy 0L500
 - ▷ Na záložce „*Marker*“ zadáme velikost alignment markeru a velikostního markeru.
 - ▷ Na záložce „*Sample selection*“ zkontrolujeme, popřípadě upravíme pozice vzorků a velikostního markeru.
 - ▷ Na záložce „*Sample information*“ vypíšeme názvy analyzovaných vzorků.
 - ▷ Na záložce „*Run check*“ zkontrolujeme a odškrtneme všechny vypsané body týkající se pozice vzorků, velikostního markeru a alignment markeru. Pokud nejsou přítomny žádné chyby nebo varování, spustíme měření tlačítkem Run.

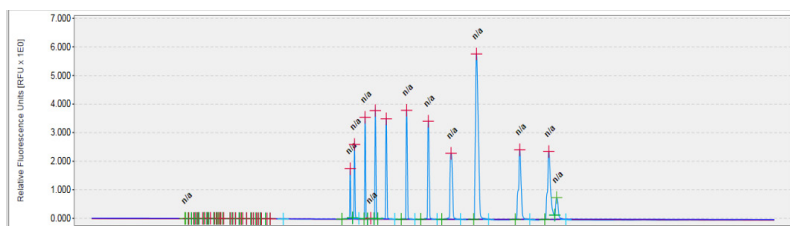
Pokud některá ze záložek při nastavování zežloutne, zadané informace si odporují, nejčastěji kvůli nekompatibilnímu velikostnímu a alignment markeru nebo špatně zadanému process profile.

Analýzu je nutné nechat doběhnout do konce. Pokud by byla ukončena předčasně, nebude možné analyzovat výsledky, přístroj je neucho-

vá. Vzorky natažené do kazety navíc mohou znehodnotit následující běh.

Vyhodnocení výsledků

1. V rozhraní „Analysis“ vybereme v levé části okna právě skončený běh, označíme jamky obsahující vzorky a přetáhneme je do středu okna.
2. V záložce „Electrophoregram“ zkontrolujeme kvalitu velikostního markeru. Pokud nebyla vytvořena velikostní škála, musíme ručně odstranit přebytečné píky (► obr. 29). V dolní části okna rozklikneme variantu „Peak result“, označíme přebytečné píky, pravým tlačítkem otevřeme možnosti a zvolíme „Delete selected peaks“.



Obr. 29 Elektroforetogram nesprávně načteného velikostního markeru

3. Po odstranění přebytečných píků se zobrazí správná velikost fragmentů velikostního markeru. Na horní liště zvolíme záložku „Reference marker“ a zvolíme „Apply“. Označíme všechny vzorky, na pravé liště zvolíme záložku „Analysis“ (Default DNA v2.0) a zvolíme „Start analysis“.
4. Na základě velikosti identifikujeme píky odpovídající zájmovým amplikonům a zaznamenejme jejich výšku v RFU (Relative Fluorescence Unit).

Příprava samostatných vzorků (tvorba poolu, přečištění, kvantifikace)

1. Smícháme amplikony A, B a C každého vzorku tak, aby RFU méně koncentrovaného amplikonu byly shodné.

Příklad výpočtu je uveden níže (► obr. 30). Koeficient pro přepočet (v tomto případě 3), je možné zvolit dle uvážení. U amplikonu s RFU nižším než 0,5 dáváme do poolu shodně 6 µl daného amplikonu.

	Reakční mix A		Reakční mix B		Reakční mix C
	CCDC102B (RFU)	ELOVL2 (RFU)	PDE4C (RFU)	FHL2 (RFU)	C1orf132 (RFU)
Vzorek 1	3,1	1,4	1,1	1,2	1,9
	↓ $\frac{3}{1,4} = 2 \mu\text{l do poolu}$		↓ $\frac{3}{1,1} = 2,7 \mu\text{l do poolu}$		↓ $\frac{3}{1,9} = 1,6 \mu\text{l do poolu}$

Obr. 30 Příklad výpočtu pro smíchání amplikonů

2. Vzorky vzniklé spojením všech tří amplikonu přečistíme pomocí QIAquick Purification kitu.
 - a) Smícháme vzorek s pětinasobným množstvím PB pufru a promícháme pipetováním.
 - b) Přeneseme vzorek na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce a centrifugujeme při 13 000 rpm jednu minutu.
 - c) Přidáme na kolonku 750 µl PE pufru a centrifugujeme při 13 000 rpm jednu minutu.
 - d) Vyprázdníme sběrnou zkumavku a centrifugujeme ještě jednu minutu, aby se odstranily zbytky PE pufru.
 - e) Umístíme kolonku na čistou 1,5 mL nebo 1,7 mL zkumavku.
 - f) Naneseme na kolonku 20 µl DEPC vody. Počkáme jednu minutu a centrifugujeme při 13 000 rpm jednu minutu.
3. Změříme koncentraci DNA v přečištěných vzorcích pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu.
 - a) Standardy necháme temperovat při laboratorní teplotě přibližně 30 minut. Qubit HS reagent před použitím pečlivě zvortexujeme.
 - b) Ve speciální zkumavce určené pro fluorometrii připravíme vzorky standardů smícháním 189 µl Qubit HS pufru + 1 µl Qubit HS reagentu + 10 µl Qubit HS standardu #1/#2.

- c) Ve speciální zkumavce určené pro fluorometrii smícháme 197 μl Qubit HS pufru, 1 μl Qubit HS reagentu a 2 μl vzorku.
- d) Hotové vzorky zvortexujeme, necháme 2 minuty inkubovat.
- e) V rozhraní fluorometru nastavíme postupně možnosti „DNA“; „dsDNA High Sensitivity“ a „Read new standards“.
- f) Postupně proměříme standard #1 a #2. Následně můžeme stisknutím možnosti Read načíst jednotlivé vzorky.
- g) V rozhraní „Calculate stock concentration“ zvolíme správnou jednotku ng/ μl a množství vstupního vzorku 2 μl .

Příprava knihovny

K přípravě knihovny použijeme Nextera XT DNA Library Preparation kit.

1. Vzorky naředíme na koncentraci 0,5 ng/ μl .
2. V 0,2 mL PCR zkumavce nebo stripu smícháme 2,5 μl Tagment DNA pufru, 1,25 μl ATM mixu a 1,25 μl naředěného vzorku. Promícháme pipetováním a stočíme.
3. Umístíme do termocykléru a spustíme program (► tab. 21).

Tab. 21: Program pro tagmentaci

55 °C	5 min
10 °C	∞

4. Přidáme 1,25 μl NT pufru. Promícháme pipetováním, stočíme.
5. Inkubujeme 5 minut při laboratorní teplotě.
6. Přidáme 3,75 μl NPM mixu, 1,25 μl index primeru i5 a 1,25 μl index primeru i7. Promícháme pipetováním, stočíme.
 - ▷ Kombinace primerů i5 a i7 musí být u každého vzorku v jednom běhu unikátní!
 - ▷ Při pipetování indexů máme otevřenou vždy jen jednu zkumavku, aby se předešlo křížové kontaminaci.
7. Umístíme do termocykléru a spustíme program (► tab. 22).

Tab. 22: Program pro indexační PCR

72 °C	3 min	
95 °C	30 s	
95 °C	10 s	16×
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
10 °C	∞	

8. Amplifikované knihovny přečistíme pomocí QIAquick Purification kitu (viz Příprava samostatných vzorků, krok 2) a kvantifikujeme pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu (viz Příprava samostatných vzorků, krok 3; měření standardů můžeme vynechat).

Příprava na sekvenování a sekvenování

1. Ekvimolárně smícháme všechny indexované knihovny určené k sekvenování; použijeme chlazený stojánek. Vzniklý pool znovu kvantifikujeme pomocí Qubit dsDNA HS Assay kitu (viz Příprava samostatných vzorků, krok 3).
2. Vypočítáme molaritu získaného poolu pomocí následující rovnice:

$$c[nM] = \rho \times \frac{10^6}{660 \times 230}$$

- ▷ ρ je koncentrace DNA poolu, zadáváme v ng/ μ l
 - ▷ 660 g/mol je průměrná molární váha jedné báze
 - ▷ 230 bp je průměrná délka sekvenovaných amplikonů
3. Naředíme pool na 2 nM a denaturujeme smícháním 10 μ l poolu a 10 μ l čerstvě připraveného 0,2 nM NaOH (např. 5 μ l 5 M NaOH + 120 μ l vody).
 4. K 10 μ l denaturovaného poolu přidáme 990 μ l HTL.
 5. Naneseme 600 μ l poolu na sekvenační flow cellu.

6. Připravíme rozpis (tzv. sample sheet) pomocí programu Illumina Experiment Manager.
 - ▷ Zvolíme variantu pro MiSeq, kategorii „Other“ a variantu „FASTQ only“.
 - ▷ Rozhraní „Workflow parameters“ vyplníme parametry (► obr. 31) a doplníme zbývající povinné položky.

PCR Amplicon Run Settings

Reagent Cartridge Barcode*	<input type="text"/>
Library Prep Workflow	Nextera XT
Index Adapters	Nextera XT Index Kit (24 Indexes 96 Sam
Index Reads	<input type="radio"/> 0 (None) <input type="radio"/> 1 (Single) <input checked="" type="radio"/> 2 (Dual)
Experiment Name*	<input type="text"/>
Investigator Name	<input type="text"/>
Description	<input type="text"/>
Date	7.12.2021
Read Type	<input checked="" type="radio"/> Paired End <input type="radio"/> Single Read
Cycles Read 1	151
Cycles Read 2	151

Obr. 31 Nastavení parametrů v programu Illumina Experiment Manager – Workflow parameters

- ▷ V rozhraní „Sample selection“ přidáme odpovídající počet prázdných řádků. Vyplníme unikátní označení vzorků a odpovídající čísla i5 a i7 indexů. Sekvence indexů se vypíše automaticky. Načteme soubor s koordinátami analyzovaných ampliconů ve formátu *.bed (► tab. 23). Hotový „sample sheet“ uložíme.
7. Spustíme sekvenační běh na sekvenátoru Illumina MiSeq.

Bioinformatická analýza

Příprava regionu zájmu pro bioinformatické analýzy

Připravíme soubor Manifest s koordináty analyzovaných ampliconů ve formátu *.bed nebo *.txt (► [tab. 23](#)). Do textového souboru vkládáme jenom data o pozici regionu bez hlavičky (tučně).

Tab. 23: Hodnoty pro vytvoření BED souboru.

Koordináty jsou uváděny ve verzi hg19

Chromozom	Start	Stop	Označení
chr18	66389390	66389503	<i>CCDC102B</i>
chr6	11044840	11044966	<i>ELOVL2</i>
chr1	207996950	207997095	<i>C1orf132</i>
chr19	18343815	18343970	<i>PDE4C</i>
chr2	106015677	106015868	<i>FHL2</i>

Sekundární analýza

Standardně byl pro vyhodnocování sekvenačních dat používán počítač s následujícími parametry: operační systém na bázi jádra Linux – Ubuntu 20, procesor 32 jader, 128 GB RAM. Na jiném zařízení nebyl postup testován, z hlediska náročných výpočtů je doporučeno použít počítač s alespoň dvanácti jádry a operačním systémem typu Linux.

1. Otevřeme složku s daty ve formátu FASTQ přímo na sekvenátoru nebo data stáhneme z virtuálního prostředí Illumina BaseSpace. Na sekvenátoru MiSeq je standardní cesta D:\Illumina\MiSeqOutput\[datum a označení analyz.běhu]\Data\Intensities\BaseCalls\),
2. Do samostatné složky na výpočetním počítači zkopírujeme soubory ve formátu *.fastq.gz označené R1 a R2 a Manifest.bed. Ostatní soubory nejsou k následné analýze potřebné.
3. Provedeme alignment sekvenačních dat (zarovnání sekvenačních dat s bisulfitově konvertovaným referenčním genomem) prostřednictvím balíčku nástrojů Bismark Bisulfite Mapper (134) za pomoci aktivního nástroje Bowtie2 (135).

- V terminálu v příkazové řádce aktivujeme pracovní složku, kde se nacházejí fastq data a do příkazového řádku vložíme následující skriptový příkaz, který zpracovává všechna data v postupné sekvenci:

```
FILES=./*1_001.fastq.gz
for f in $FILES
do
    f2=${f%.*}
    fp=${f2%.*}
    filename=${fp::-5}
    echo "Processing $f file to $f.bam"
    fastp --in1 ${filename}1_001.fastq.gz \
        --in2 ${filename}2_001.fastq.gz \
        --out1 ${filename}1_001T.fastq.gz \
        --out2 ${filename}2_001T.fastq.gz -z 9 \
        --adapter_sequence=AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA \
        --adapter_sequence_r2=AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

    bismark --bowtie2 --multicore 3 -p 3 \
        --path_to_bowtie ~/tools/bowtie2-2.4.2-linux-x86_64 \
        -n 1 -l 28 \
        ~/reference/hg19 \
        -1 ${filename}1_001T.fastq.gz \
        -2 ${filename}2_001T.fastq.gz
done
```

Příkaz je nutné rozšířit/upravit o cestu k uloženým výpočetním nástrojům, která je aktuální na výpočetním systému (viz ~/tools/bowtie2-2.4.2-linux-x86_64) a k referenční sekvenci (viz. ~/reference/hg19).

4. Prostřednictvím nástroje Bismark metylation extractor získáme informaci o metylačním statusu každé přítomné CpG oblasti.

- Do příkazového řádku vložíme následující příkaz:

```
FILES=./*001T_bismark_bt2_pe.bam
for f in $FILES
do
    ~/tools/Bismark-0.22.3/bismark_metylation_extractor \
    -p --comprehensive --multicore 12 --merge_non_CpG $f
done
```

- ▷ Příkaz je nutné rozšířit/upravit o cestu k uloženým výpočetním nástrojům, která je aktuální na výpočetním systému (~/tools/Bismark-0.22.3/)
 - ▷ Získáme data označená CpG_context_[název vzorku]_bismark_bt2_pe.txt
5. Pokud chceme znát sekvenační pokrytí v jednotlivých analyzovaných oblastech, je nutné nejprve vygenerovat indexované soubory ve formátu *.bam
- ▷ Do příkazového řádku vložíme následující příkaz:

```
FILES=./*.bam
for f in $FILES
do
    f2=${f%.*}
    echo "Processing $f file"
    samtools sort -@ 24 $f -o ${f2}_sort.bam
    samtools index ${f2}_sort.bam
done
```

Do příkazového řádku vložíme následující příkaz:

```
fp=${f%.*}
bedtools coverage -bed -d -b $f -a ./Manifest.bed >
./coverage_res/${fp}_CpG_cov_pos.txt
```

- ▷ Příprava Manifest.bed je popsána výše, viz *Příprava regionu zájmu pro bioinformatické analýzy*.

Terciární analýza

6. V programu SeqMonk (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk/>) vytvoříme nový projekt a zvolíme referenční genom hg19. Naimportujeme získaná data.
- ▷ V rozhraní „File“ zvolíme možnost „Import data“ a následně variantu „Text (generic)“. Vybereme umístění souborů získaných v bodě 4.

- Při importu vyplníme parametry udávající, jaký typ dat se nachází v jakém sloupci importovaného souboru (► **tab. 24**).

Tab. 24: Nastavení parametrů při importu vzorků do programu SeqMonk

Column Delimiter	Tab
Start at Row	1
Chr Col	3
Start Col	4
End Col	4
Strand Col	2
<i>ostatní parametry beze změny</i>	

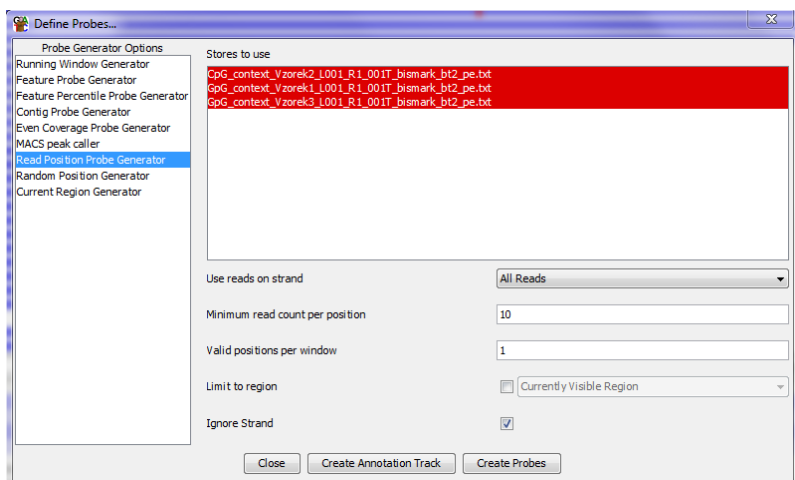
- Pro anotaci zájmových oblastí naimportujeme do programu SeqMonk manifest ve formátu *.txt nebo bed.
- V rozhraní „File“ zvolíme možnost „Import annotation“ a následně variantu „Text (generic)“. Vyplníme parametry (► **tab. 25**). Zájmové oblasti budou ve výstupech programu označeny jako „features“.

Tab. 25: Nastavení parametrů při importu anotace do programu SeqMonk

Column Delimiter	Tab
Start at Row	0
Chr Col	1
Start Col	2
End Col	3
Name Col	4
Description Col	4
<i>ostatní parametry beze změny</i>	

7. Vygenerujeme seznam jednonukleotidových prób.

- V rozhraní „Data“ zvolíme možnost „Define Probes“ a následně variantu „Read Position Probe Generator“.
- Zvolíme všechny analyzované vzorky, vyplníme parametry (► **obr. 32**) a zvolíme možnost „Create probes“.



Obr. 32 Nastavení parametrů při tvorbě seznamu prób v programu SeqMonk

8. Kvantifikujeme podíl metylovaných cytosinů v jednotlivých vzorcích.

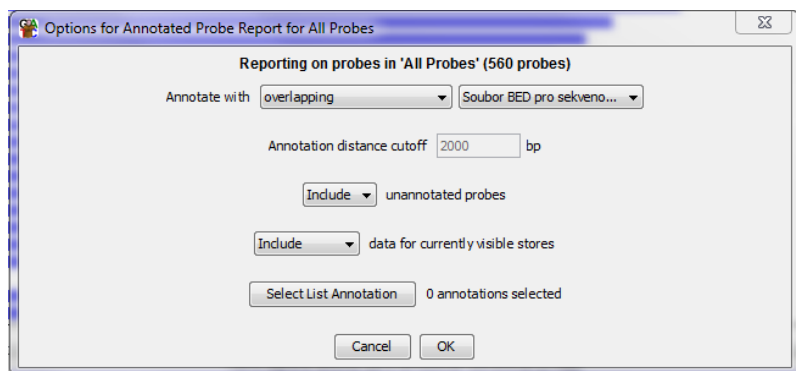
- ▷ V rozhraní „Data“ zvolíme možnost „Quantitation pipelines“ a následně variantu „Bisulphite methylation over features“.
- ▷ V menu „Feature to quantify“ zvolíme variantu „Existing probes“. Je vhodné nastavit minimální počet čtení na 10.

9. Odfiltrujeme artefakty

- ▷ V rozhraní „Filtering“ zvolíme možnost „Filter on values“ a následně variantu „Individual probes“.
- ▷ Označíme všechny analyzované vzorky a zadáme hodnotu odpovídající počtu vzorků obsahujících pro danou пробу validní data – tedy v rozsahu 0 až 100. Minimální hodnota filtru by měla odpovídat 75 % vzorků, ideálně > 90 %.

10. Vytvoříme kvantifikační report.

- ▷ V rozhraní „Report“ zvolíme možnost „Annotated probe report“. Nastavíme jednotlivé parametry (► [obr. 33](#)).



Obr. 33 Nastavení parametrů při tvorbě kvantifikačního reportu v programu SeqMonk

11. Zaznamenáme hodnotu metylace v zájmových oblastech (► tab. 26).

Tab. 26: Zájmové oblasti pro predikční model

Označení	Koordináty (hg19)
<i>C1orf132</i>	chr1: 20,7997,026
<i>FHL2₁</i>	chr2: 10,6015,745
<i>FHL2₂</i>	chr2: 10,6015,748
<i>ELOVL₁</i>	chr6: 11,044,888
<i>ELOVL₂</i>	chr6: 11,044,894
<i>CCDC102B</i>	chr18: 66,389,420
<i>PDE4C</i>	chr19: 18,343,916

12. Metylační hodnoty v těchto oblastech dosadíme do následující rovnice:

$$\begin{aligned}
 x = & 37,485 + (-0,306 \times C1orf132) + (0,149 \times FHL2_1) + (0,251 \times FHL2_2) \\
 & + (0,270 \times ELOVL_1) + (0,140 \times ELOVL_2) \\
 & + (-0,261 \times CCDC102B) + (0,310 \times PDE4C)
 \end{aligned}$$

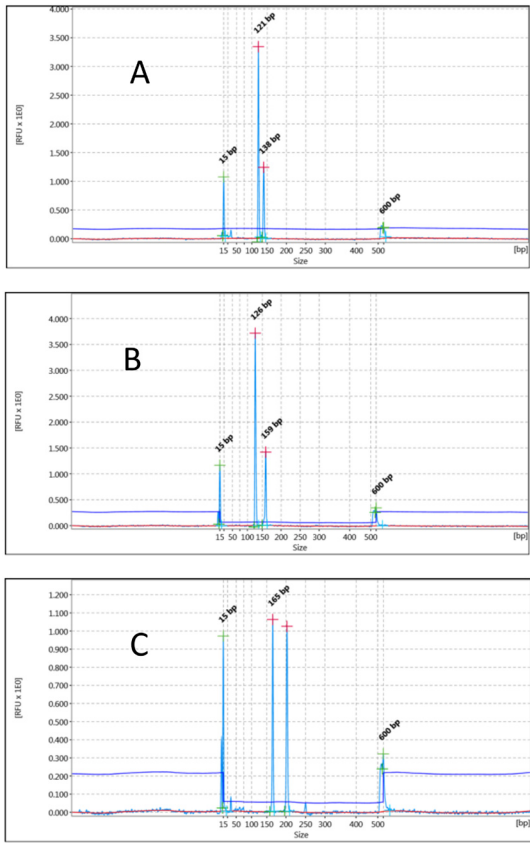
Výsledkem je odhadovaný věk původce DNA.

Vzorový výsledek

Výsledek predikce je ilustrován na hodnotách tří vzorků v průběhu zpracování celého protokolu (► tab. 27–31, ► obr. 34).

Tab. 27: Preanalytické hodnoty

	Vstupní koncentrace [ng/μl]	Koncentrace po konverzi [ng/μl]	Ředění na qPCR
Vzorek 1	77,4	49,1	4,9×
Vzorek 2	103,0	57,4	5,7×
Vzorek 3	69,0	33,7	3,4×



Obr. 34 Vizuální výsledky digitální elektroforézy vzorku 2 pro jednotlivé reakční mixy A–C

Tab. 28: Výsledky digitální elektroforézy

	Reakční mix A CCDC102B (RFU)	Reakční mix B ELOVL2 (RFU)	Reakční mix C PDE4C (RFU)	FHL2 (RFU)	C1orf132 (RFU)
Vzorek 1	2,80	1,03	1,15	1,18	1,73
Vzorek 2	3,34	1,24	1,06	1,02	1,42
Vzorek 3	2,66	0,92	0,94	0,92	1,57

Tab. 29: Rozpis pro tvorbu poolů a výsledky po přečištění

	Reakční mix A [μl]	Reakční mix B [μl]	Reakční mix C [μl]	Koncentrace po přečištění (ng/μl)
Vzorek 1	2,9	2,5	1,7	9,09
Vzorek 2	2,4	2,9	2,1	7,51
Vzorek 3	3,3	3,3	1,9	9,14

Tab. 30: Rozpis pro přípravu knihovny a výsledky po přečištění

	Ředění (DNA + voda [μl])	Index i5	Index i7	Koncentrace knihovny [ng/μl]	Množství do poolu [μl]
Vzorek 1	0,66 + 11,34	02	04	6,71	4,47
Vzorek 2	0,8 + 11,2	03	05	10,20	2,94
Vzorek 3	0,66 + 11,34	04	06	7,13	4,20

Tab. 31: Metylační hodnoty a finální výsledek

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
C1orf132	72,05%	88,59%	92,74%
FHL2 ₁	50,15%	28,28%	42,88%
FHL2 ₂	40,60%	24,34%	40,56%
ELOVL ₁	46,98%	25,19%	32,84%
ELOVL ₂	49,85%	25,41%	35,39%
CCDC102B	39,30%	57,19%	52,33%
PDE4C	39,33%	17,29%	27,06%
Předikovaný věk	54,8 ± 2,84	21,57 ± 2,23	34,32 ± 2,36
Skutečný věk	57	22	33

Obdobně jako u výsledků AgePlexu v předchozí kapitole, můžeme na základě výše uvedené analýzy při maximální odchylce ± 4 roky s 80 % pravděpodobností říct, že věk zůstavitele vzorku 1 je 55 let ± 2,8 roky,

věk zůstavitele vzorku 2 je 22 let \pm 2,2 roku a věk zůstavitele vzorku 3 je 34 let \pm 2,4 roku.

Predikční model je pravděpodobnostní; výsledný predikovaný věk je tedy nutné chápat jako pravděpodobnou, ale ani v rámci uznané specifity ne jistou hodnotu.

Komentář a řešení problémů

Problém	Příčina a řešení
✓ Digitální elektroforéza nevypočítala velikost piků.	✓ Je špatně načtený velikostní marker, zkontrolujeme ho a vymažeme přebytečné piky. V rozhraní „Reference marker“ zmáčkneme „Apply“ a necháme analýzu přepočítat.
✓ Digitální elektroforéza uvádí abnormálně velké hodnoty velikosti piků (cca > 350 bp).	✓ Jeden z ampliconů byl softwarem mylně vyhodnocen jako alignment marker o velikosti 600 bp. Zkontrolujeme a snížíme baseline tak, aby byl skutečný pik alignment markeru softwarem zaznamenán.
✓ Objem ampliconu, který by měl být použit pro přípravu poolu, je vyšší než dostupný objem vzorku.	✓ U vzorků s RFU nižším než 0,5 dáme do poolu 6 μ l vzorku.
✓ Koncentrace knihovny po přečištění je nižší než 1 ng/ μ l.	✓ Došlo k chybě při přípravě knihovny. Ze vzorku kvantifikovaného v posledním kroku Přípravy samostatných vzorků přípravu knihovny zopakujeme.
✓ Počet sekvenačních čtení v testované oblasti je nižší než 1000.	✓ Dotčenou knihovnu osekvenujeme znovu. Pokud problém přetrvává, ale na konci Přípravy samostatných vzorků byla koncentrace poolu vyšší než 1 ng/ μ l, zopakujeme přípravu knihovny.

Poděkování

Chci vyjádřit poděkování všem kolegům, kteří se kromě spoluautorů také podíleli na vzniku této práce: Helena Jurtíková (izolace DNA), Barbora Blumová (izolace DNA, příprava sekvenačních poolů), Patrícia Žižkovičová (sekvenování).

Kapitola byla vypracována za přispění grantových projektů VI20202022123, IGA LF UP 2022_012.

Resumé

Metodická kniha „Vybrané metody forenzní genetiky“ je určena laboratorním pracovníkům v KÚP, v OKTE a v dalších laboratořích, které se zabývají genetickými metodami s potenciálem použití v kriminalistice. Poslouží snad také studentům bakalářských, magisterských a doktorских studijních programů přírodovědeckých fakult.

Kniha si neklade za cíl poskytnout celkový přehled o současném stavu vývoje metod v oblasti forenzní genetiky. Cílem našeho lčlenného autorského týmu je poskytnout čtenářům přehled jen těch metod, které jsme sami ve svých laboratořích zavedli a zvalidovali.

Po úvodní, teoretické kapitole následuje pět metodických kapitol: sestavení profilů DNA analýzou STR lokusů, identifikace neznámého zvířecího druhu, mtDNA sekvenování s využitím masivně paralelního sekvenování a dva způsoby detekce metylace pro stanovení biologického věku: pyrosekvenování komerční soupravou a masivně paralelní sekvenování laboratorně vyvinutou metodou.

Před každou metodickou kapitolou jsou popsány principy metody, pro názornost jsme knihu zpestřili obrázky a schémata. Za každou kapitolou jsou tipy na řešení případných problémů. Kniha propaguje nejlepší laboratorní praxi pro zvýšení spolehlivosti forenzních laboratorních vyšetření.

Summary

The methodological book “Selected Methods of Forensic Genetics” is intended for laboratory technicians at the Criminalistic Institute of Prague (KÚP), Department of Criminalistic Expertise (OKTE), and other laboratories dealing with genetic methods with potential application in criminalistics. It will also be useful for students of bachelor, master, and doctoral programmes of science faculties.

The book does not aim to provide an overview of the current state of methods development in the field of forensic genetics. The aim of our 11-member author team is to provide readers with only those methods that we ourselves have implemented and validated in our laboratories.

The introductory, theoretical chapter is followed by five method chapters: DNA profiling by STR locus analysis, identification of an unknown animal species, mtDNA sequencing using massively parallel sequencing, and two methods of methylation detection for biological age determination: pyrosequencing with a commercial kit and massively parallel sequencing with a laboratory-developed method.

Before each method chapter, the principles of the method are described, and the book is illustrated with pictures and diagrams. Each chapter is followed by tips for solving potential problems. The book promotes best laboratory practices to increase the reliability of forensic laboratory testing.

Seznam literatury

1. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA ‚fingerprints‘. *Nature*. 1985; 318(6046): 577–9.
2. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable ‚minisatellite‘ regions in human DNA. *Nature*. 1985; 314(6006): 67–73.
3. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific ‚fingerprints‘ of human DNA. *Nature*. 1985; 316(6023): 76–9.
4. Hall CL, Kesharwani RK, Phillips NR, Planz JV, Sedlazeck FJ, Zascavage RR. Accurate profiling of forensic autosomal STRs using the Oxford Nanopore Technologies MinION device. *Forensic Sci Int Genet*. 2022; 56: 102629.
5. Fan H, Wang L, Liu C, Lu X, Xu X, Ru K, et al. Development and validation of a novel 133-plex forensic STR panel (52 STRs and 81 Y-STRs) using single-end 400 bp massive parallel sequencing. *Int J Legal Med*. 2022; 136(2): 447–64.
6. Dowdeswell TL. Forensic genetic genealogy: A profile of cases solved. *Forensic Sci Int Genet*. 2022; 58: 102679.
7. Guerrini CJ, Wickenheiser RA, Bettinger B, McGuire AL, Fullerton SM. Four misconceptions about investigative genetic genealogy. *J Law Biosci*. 2021; 8(1): lsab001.
8. Wickenheiser RA. Expanding DNA database effectiveness. *Forensic Sci Int Synerg*. 2022; 4: 100226.
9. Simkova H. Breviar forenzní genetiky: forenzní analýza v otázkách a odpovědích. Drabek J, Horinek A, Stenzl V, editors. Brno: Tribun EU s. r. o.; 2012. 1–214 p.

10. Vasek J, Cilova D, Melounova M, Svoboda P, Zdenkova K, Cermáková E, et al. OpiumPlex is a novel microsatellite system for profiling opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Sci Rep.* 2021; 11(1): 12799.
11. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJ. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol.* 2011; 7(4): 379–92.
12. Karadayı S. Assessment of the link between evidence and crime scene through soil bacterial and fungal microbiome: A mock case in forensic study. *Forensic Sci Int.* 2021; 329: 111060.
13. Bozza S, Scherz V, Greub G, Taroni F. A probabilistic approach to evaluate salivary microbiome in forensic science when the Defense says: 'It is my twin brother'. *Forensic Sci Int Genet.* 2022; 57: 102638.
14. Jan C, Fumagalli L. Polymorphic DNA microsatellite markers for forensic individual identification and parentage analyses of seven threatened species of parrots (family Psittacidae). *PeerJ.* 2016; 4: <https://doi.org/10.7717/peerj.2416>.
15. Cunha HA, da Silva VM, Santos TE, Moreira SM, do Carmo NA, Solé-Cava AM. When You Get What You Haven't Paid for: Molecular Identification of „Douradinha“ Fish Fillets Can Help End the Illegal Use of River Dolphins as Bait in Brazil. *J Hered.* 2015; 106 Suppl 1: 565–72.
16. Johnson TA, Iyengar A. Phylogenetic evidence for a case of misleading rather than mislabeling in caviar in the United Kingdom. *J Forensic Sci.* 2015; 60 Suppl 1: S248–53.
17. Linacre A, Gusmao L, Hecht W, Hellmann AP, Mayr WR, Parson W, et al. ISFG: Recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics.* 2011; 5(5): 501–5.
18. Walsh S, Wollstein A, Liu F, Chakravarthy U, Rahu M, Seland JH, et al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Science International: Genetics.* 2011; 6(3): 330–40.
19. Branicki W, Liu F, van DK, Draus-Barini J, Pospiech E, Walsh S, et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Human Genetics.* 2011; 129(4): 443–54.
20. Tozzo P, Politi C, Delicati A, Gabbin A, Caenazzo L. External visible characteristics prediction through SNPs analysis in the forensic setting: a review. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2021; 26(10): 828–50.
21. Berger C, Heinrich J, Berger B, Hecht W, Parson W, On Behalf Of Ca D. Towards Forensic DNA Phenotyping for Predicting Visible Traits in Dogs. *Genes (Basel).* 2021; 12(6).
22. Haas C, Hanson E, Bar W, Banemann R, Bento AM, Berti A, et al. mRNA profiling for the identification of blood-Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Science International: Genetics.* 2010; 5(1): 21–6.

23. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *Rna*. 2020; 26(1): 1–9.
24. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Science International: Genetics*. 2010; 5(5): 517–24.
25. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, et al. DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol*. 2019; 20(1): 249.
26. Parson W. Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi) Genomics: A Mini-Review. *Gerontology*. 2018; 64(4): 326–32.
27. Pospiech E, Teisseyre P, Mielniczuk J, Branicki W. Predicting Physical Appearance from DNA Data-Towards Genomic Solutions. *Genes (Basel)*. 2022; 13(1).
28. Buckleton J, Triggs J, Walsh SJ. Forensic DNA Evidence Interpretation. Buckleton J, Triggs J, Walsh SJ, editors. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005. 1–534 p.
29. Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, et al. DNA recommendations – Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Journal of Legal Medicine*. 1997; 110(4): 175–6.
30. Olaisen B, Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, et al. DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. *Vox Sanguinis*. 1998; 74(1): 61–3.
31. Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *American Journal of Human Genetics*. 1993; 53(4): 953–8.
32. Cha YS, Choi SH, Lee JH, Shin SK, Lee SH, Lee SD, et al. Analysis of TPOX short tandem repeat locus with matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight-based restriction fragment mass polymorphism assay. *Analytical Biochemistry*. 2011; 412(1): 79–84.
33. Court DS. DNA analysis: Current practice and problems. In: Gall J, Payne-James J, editors. *Current Practice in Forensic Medicine*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. 193–237.
34. Ruttly GN. An investigation into the transference and survivability of human DNA following simulated manual strangulation with consideration of the problem of third party contamination. *International Journal of Legal Medicine*. 2002; 116(3): 170–3.
35. Butler J. Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers: Academic Press; 2005. 1–688 p.

36. Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, Geigl EM. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS ONE*. 2010; 5(9).
37. Hoile R, Banos C, Colella M, Walsh SJ, Roux C. Gamma irradiation as a biological decontaminant and its effect on common fingerprint detection techniques and DNA profiling. *Journal of Forensic Sciences*. 2010; 55(1): 171–7.
38. Archer E, Allen H, Hopwood A, Rowlands D. Validation of a dual cycle ethylene oxide treatment technique to remove DNA from consumables used in forensic laboratories. *Forensic Science International: Genetics*. 2010; 4(4): 239–43.
39. Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Graft A. Authentication of forensic DNA samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2010; 4(2): 95–103.
40. Biedermann A, Hicks T, Voisard R, Taroni F, Champod C, Aitken CG, et al. E-learning initiatives in forensic interpretation: Report on experiences from current projects and outlook. *Forensic Science International*. 2012; 230(1–3): 2–7.
41. Cook R, Evett IW, Jackson G, Jones PJ, Lambert JA. A model for case assessment and interpretation. *Science & Justice*. 1998; 38(3): 151–6.
42. Li Cx, Han J-p, Ren W-y, Ji A-q, Xu X-l, Hu L. DNA profiling of spermatozoa by Laser Capture Microdissection and Low Volume-PCR. *PLoS ONE*. 2011; 6(8).
43. Zhu B, Furuki T, Okuda T, Sakurai M. Natural DNA mixed with trehalose persists in B-form double-stranding even in the dry state. *JPhysChemB*. 2007; 111(20): 5542–4.
44. Caddy B, Taylor G, Linacre A. A review on the science of Low Template DNA analysis. 2008. p. 1–35.
45. Kline MC, Duewer DL, Redman JW, Butler JM. Results from the NIST 2004 DNA quantitation study. *Journal of Forensic Sciences*. 2005; 50(3): 571–8.
46. Taylor D. Using a multi-head, convolutional neural network with data augmentation to improve electropherogram classification performance. *Forensic Sci Int Genet*. 2022; 56: 102605.
47. Perlin MW, Szabady B. Linear mixture analysis: a mathematical approach to resolving mixed DNA samples. *Journal of Forensic Sciences*. 2001; 46(6): 1372–8.
48. Robertson B, Vignaux GA, Berger CEH. *Interpreting evidence: Evaluating Forensic Science in the Courtroom*, 2nd edition. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Ltd.; 2016. 1–216 p.
49. Weir BS. DNA statistics in the Simpson matter. *Nature Genetics*. 1995; 11(4): 365–8.

50. Song YS, Patil A, Murphy EE, Slatkin M. Average probability that a „cold hit“ in a DNA database search results in an erroneous attribution. *Journal of Forensic Sciences*. 2009; 54(1): 22–7.
51. Cook R, Evett IW, Jackson G, Jones PJ, Lambert JA. A hierarchy of propositions: deciding which level to address in casework. *Science & Justice*. 1998; 38(4): 231–9.
52. Garbolino P, Taroni F. Evaluation of scientific evidence using Bayesian networks. *Forensic Science International*. 2002; 125(2–3): 149–55.
53. Furst T, Simkova H, Zimmer J, Furstova J. Nova teorie dukazu a komentovany cesky preklad smernice ENFSI pro znalecke hodnoceni ve forenznich vedach. 1st ed. Praha: Nakladatelství Leges, s.r.o.; 2022. 154 p.
54. Storvik G, Egeland T. The DNA database search controversy revisited: bridging the Bayesian-frequentist gap. *Biometrics*. 2007; 63(3): 922–5.
55. Drabek J. Interpretace DNA profilu při urcovani otcovstvi a pribuznosti. Simkova H, Zidkova A, editors. Brno: Tribun EU, s.r.o.; 2011. 1–95 p.
56. Harrel M, Holmes AS. Review of direct PCR and Rapid DNA approaches to streamline sexual assault kit testing. *J Forensic Sci*. 2022;online ahead of print.
57. Krüger J, Schleinitz D. Genetic Fingerprinting Using Microsatellite Markers in a Multiplex PCR Reaction: A Compilation of Methodological Approaches from Primer Design to Detection Systems. *Methods Mol Biol*. 2017; 1492: 1–15.
58. de Knijff P. On the Forensic Use of Y-Chromosome Polymorphisms. *Genes (Basel)*. 2022; 13(5).
59. Gomes I, Pinto N, Antão-Sousa S, Gomes V, Gusmão L, Amorim A. Twenty Years Later: A Comprehensive Review of the X Chromosome Use in Forensic Genetics. *Front Genet*. 2020; 11: 926.
60. Spitzer A, Elkayam Sapir L, Amiel M. What is she doing here? Klinefelter syndrome in forensic casework. *Sci Justice*. 2021; 61(4): 443–8.
61. Buckleton J, Robertson B, Curran J, Berger C, Taylor D, Bright JA, et al. A review of likelihood ratios in forensic science based on a critique of Stiffelman „No longer the Gold standard: Probabilistic genotyping is changing the nature of DNA evidence in criminal trials“. *Forensic Sci Int*. 2020; 310: 110251.
62. Morrison GS. Advancing a paradigm shift in evaluation of forensic evidence: The rise of forensic data science. *Forensic Sci Int Synerg*. 2022; 5: 100270.
63. Raffone C, Baeta M, Lambacher N, Granizo-Rodríguez E, Etxeberria F, de Pancorbo MM. Intrinsic and extrinsic factors that may influence DNA preservation in skeletal remains: A review. *Forensic Sci Int*. 2021; 325: 110859.
64. Holmes AS, Houston R, Elwick K, Gangitano D, Hughes-Stamm S. Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples. *Int J Legal Med*. 2018; 132(3): 691–701.

65. Gile GH, Stern RF, James ER, Keeling PJ. DNA barcoding of chlorarachniophytes using nucleomorph ITS sequences. *Journal of Phycology*. 2010; 46(4): 743–50.
66. Struder-Kypke MC, Lynn DH. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity*. 2010; 8(1): 131–48.
67. Hamsher SE, LeGresley MM, Martin JL, Saunders GW. A comparison of morphological and molecular-based surveys to estimate the species richness of Chaetoceros and Thalassiosira (bacillariophyta), in the Bay of Fundy. *PLoS One*. 2013; 8(10): e73521.
68. Kaczmarek I, Ehrman JM, Moniz MJB, Davidovich N. Phenotypic and genetic structure of interbreeding populations of the diatom *Tabularia fasciculata* (Bacillariophyta). *Phycologia*. 2009; 48(5): 391–403.
69. Purty RS, Chatterjee S. DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin J Biotechnol Bioeng*. 2016; 3(1): 1059.
70. Smith MA, Bertrand C, Crosby K, Eveleigh ES, Fernandez-Triana J, Fisher BL, et al. Wolbachia and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *PLoS One*. 2012; 7(5): e36514.
71. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73(1): 278–88.
72. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; 173(2): 697–703.
73. Links MG, Dumonceaux TJ, Hemmingsen SM, Hill JE. The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49755.
74. Makarova O, Contaldo N, Paltrinieri S, Kawube G, Bertaccini A, Nicolaisen M. DNA barcoding for identification of 'Candidatus Phytoplasmas' using a fragment of the elongation factor Tu gene. *PLoS One*. 2012; 7(12): e52092.
75. Schneider KL, Marrero G, Alvarez AM, Presting GG. Classification of plant associated bacteria using RIF, a computationally derived DNA marker. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18496.
76. Liu L, Huang XL, Zhang RL, Jiang LY, Qiao GX. Phylogenetic congruence between Mollitrichosiphum (Aphididae: Greenideinae) and Buchnera indicates insect-bacteria parallel evolution. *Systematic Entomology*. 2013; 38(1): 81–92.
77. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(16): 6241–6.

78. Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D, et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*. 2015; 35: 242–63.
79. Khaund P, Joshi SR. DNA barcoding of wild edible mushrooms consumed by the ethnic tribes of India. *Gene*. 2014; 550(1): 123–30.
80. Brown SP, Rigdon-Huss AR, Jumpponen A. Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*. 2014; 9: 65–8.
81. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8613.
82. Theodoridis S, Stefanaki A, Tezcan M, Aki C, Kokkini S, Vlachonassios KE. DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Mol Ecol Resour*. 2012; 12(4): 620–33.
83. Yang Y, Zhai Y, Liu T, Zhang F, Ji Y. Detection of *Valeriana jatamansi* as an adulterant of medicinal Paris by length variation of chloroplast psbA-trnH region. *Planta Med*. 2011; 77(1): 87–91.
84. Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol*. 2010; 130(1): 116–21.
85. Lobo J, Costa PM, Teixeira MA, Ferreira MS, Costa MH, Costa FO. Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecol*. 2013; 13: 34.
86. Yacoub HA, Fathi MM, Sadek MA. Using cytochrome b gene of mtDNA as a DNA barcoding marker in chicken strains. *Mitochondrial DNA*. 2015; 26(2): 217–23.
87. Siddappa CM, Saini M, Das A, Doreswamy R, Sharma AK, Gupta PK. Sequence Characterization of Mitochondrial 12S rRNA Gene in Mouse Deer (*Moschiola indica*) for PCR-RFLP Based Species Identification. *Mol Biol Int*. 2013; 2013: 783925.
88. Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool*. 2005; 2(1): 5.
89. Yang L, Tan Z, Wang D, Xue L, Guan MX, Huang T, et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Sci Rep*. 2014; 4: 4089.
90. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009; 25(9): 1189–91.
91. Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Evol*. 1991; 32(2): 128–44.

92. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994; 3(5): 294–9.
93. Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, et al. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International*. 2000; 110(2): 79–85.
94. Parson W, Gusmao L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International-Genetics*. 2014; 13: 134–42.
95. Abicht A, Scharf F, Kleinle S, Schön U, Holinski-Feder E, Horvath R, et al. Mitochondrial and nuclear disease panel (Mito-aND-Panel): Combined sequencing of mitochondrial and nuclear DNA by a cost-effective and sensitive NGS-based method. *Mol Genet Genomic Med*. 2018; 6(6): 1188–98.
96. Lange V, Böhme I, Hofmann J, Lang K, Sauter J, Schöne B, et al. Cost-efficient high-throughput HLA typing by MiSeq amplicon sequencing. *BMC Genomics*. 2014; 15: 63.
97. Jager AC, Alvarez ML, Davis CP, Guzman E, Han Y, Way L, et al. Developmental validation of the MiSeq FGx Forensic Genomics System for Targeted Next Generation Sequencing in Forensic DNA Casework and Database Laboratories. *Forensic Science International-Genetics*. 2017; 28: 52–70.
98. Cihlar JC, Amory C, Lagace R, Roth C, Parson W, Budowle B. Developmental Validation of a MPS Workflow with a PCR-Based Short Amplicon Whole Mitochondrial Genome Panel. *Genes*. 2020; 11(11).
99. Brandhagen MD, Just RS, Irwin JA. Validation of NGS for mitochondrial DNA casework at the FBI Laboratory. *Forensic Science International-Genetics*. 2020; 44(102151).
100. Hickman MP, Grisedale KS, Bintz BJ, Burnside ES, Hanson EK, Ballantyne J, et al. Recovery of whole mitochondrial genome from compromised samples via multiplex PCR and massively parallel sequencing. *Future Science OA*. 2018; 4(9).
101. Holland MM, Pack ED, McElhoe JA. Evaluation of GeneMarker® HTS for improved alignment of mtDNA MPS data, haplotype determination, and heteroplasmy assessment. *Forensic Sci Int Genet*. 2017; 28: 90–8.
102. Wang Z, Zhu R, Zhang S, Bian Y, Lu D, Li C. Differentiating between monozygotic twins through next generation mtGenome sequencing. *Analytical Biochemistry*. 2015; 490: 1–6.
103. Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA. Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(36): 14508–13.

104. Irwin JA, Saunier JL, Niederstätter H, Strouss KM, Sturk KA, Diegoli TM, et al. Investigation of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region: a synthesis of observations from more than 5000 global population samples. *J Mol Evol.* 2009; 68(5): 516–27.
105. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet.* 2008; 83(2): 254–60.
106. Just RS, Irwin JA, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 18: 131–9.
107. Gallimore JM, McElhoe JA, Holland MM. Assessing heteroplasmic variant drift in the mtDNA control region of human hairs using an MPS approach. *Forensic Sci Int Genet.* 2018; 32: 7–17.
108. Parson W, Dur A. EMPOP-A forensic mtDNA database. *Forensic Science International: Genetics.* 2007; 1(2): 88–92.
109. Fan L, Yao YG. An update to MitoTool: Using a new scoring system for faster mtDNA haplogroup determination. *Mitochondrion.* 2013; 13(4): 360–3.
110. Weissensteiner H, Pacher D, Kloss-Brandstatter A, Forer L, Specht G, Bandelt HJ, et al. HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research.* 2016; 44(W1): W58–W63.
111. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell.* 2013; 153(6): 1194–217.
112. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013; 14(10): R115.
113. Mendelsohn AR, Larrick JW. Epigenetic Drift Is a Determinant of Mammalian Lifespan. *Rejuvenation Res.* 2017; 20(5): 430–6.
114. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol.* 2015; 16: 25.
115. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sanchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic Predictor of Age. *PLoS ONE.* 2011; 6(6).
116. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology.* 2014; 15(2): R24.
117. Jung SE, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin KJ, Lee HY. DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, Clorf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Science International-Genetics.* 2019; 38: 1–8.
118. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International.* 2010; 203(1–3): 34–43.

119. Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Paleczka A, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 17: 173–9.
120. Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet*. 2009; 3(3): 154–61.
121. Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 18: 33–48.
122. Samuel G, Prainsack B. The regulatory landscape of forensic DNA phenotyping in Europe. London; 2018.
123. Vidaki A, Kayser M. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: broadening DNA investigative intelligence. *Genome Biol*. 2017; 18(1): 238.
124. Lee HY, Lee SD, Shin KJ. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Reports*. 2016; 49(7): 359–69.
125. Schneider PM, Prainsack B, Kayser M. The Use of Forensic DNA Phenotyping in Predicting Appearance and Biogeographic Ancestry. *Deutsches Arzteblatt International*. 2019; 116(51–52): 873–80.
126. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*. 2013; 49(2): 359–67.
127. Daunay A, Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Evaluation of six blood-based age prediction models using DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 8862.
128. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*. 2015; 10(10): 922–30.
129. Park JL, Kim JH, Seo E, Bae DH, Kim SY, Lee HC, et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Science International: Genetics*. 2016; 23: 64–70.
130. Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 14: 161–7.
131. Huang Y, Yan J, Hou JY, Fu XD, Li LY, Hou YP. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Science International-Genetics*. 2015; 17: 129–36.
132. Slavkovsky R. Bisulfite amplicon next-generation sequencing for methylation status assessment. 2021. In: *Laboratory Techniques in Cellular and Molecular Medicine* [Internet]. Olomouc: Vydavatelství UPOL. 1. [409–21].

133. Kotkova L. Determination of length of nucleic acid fragments by digital capillary electrophoresis. 2021. In: Laboratory Techniques in Cellular and Molecular Medicine [Internet]. Olomouc: Vydavatelství UP. 1. [399–407].
134. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. Bioinformatics. 2011; 27(11): 1571–2.
135. Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. BioData Min. 2015; 8(1): 1.

Seznam obrázků

Obr. 1	Procesní kroky při analýze DNA z místa činu	14
Obr. 2	Schematické umístění zásadních procesů ohledně zkoumání místa činu na časovou osu	15
Obr. 3	Schématické znázornění heterozygotních píků a artefaktů, které se mohou při analýze stejného lokusu objevit	24
Obr. 4	Úplný profil DNA	25
Obr. 5	Procesní kroky při profilování DNA	41
Obr. 6	Výsledek analýzy jednoho vzorku, Allelic Ladder (AL), Pozitivní kontrola (PK) – všechny barvy	47
Obr. 7	Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK modrý fluorescenční kanál	47
Obr. 8	Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK zelený fluorescenční kanál	48
Obr. 9	Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK žlutý fluorescenční kanál (zobrazený černě)	48
Obr. 10	Výsledek analýzy jednoho vzorku, AL, PK červený fluorescenční kanál	49
Obr. 11	Export výsledků v podobě tabulky	49
Obr. 12	Procesní kroky při identifikaci neznámého druhu Sangerovým sekvenováním	57
Obr. 13	Ukázkový výpis výsledku BLASTu pro sekvenci části 16S RNA druhu treska obecná (<i>Gadus morhua</i>)	63

Obr. 14	Detail alignmentu sekvence části 16S RNA druhu treska obecná (<i>Gadus morhua</i>) s referenční sekvencí MN122852.1	63
Obr. 15	Multiple sequence alignment	64
Obr. 16	Schéma připravené knihovny po PCR (převzato a upraveno dle Lange et al., 2014)	71
Obr. 17	Schéma pracovního postupu	75
Obr. 18	Procesní kroky při určování věku z krve pyrosekvenováním	88
Obr. 19	Pracovní prostor QIAcube	90
Obr. 20	Stojan s reagensiemi do QIAcube	91
Obr. 21	Rozmístění zkumavek v třepačce a rozmístění adaptorů v rotoru centrifugy v závislosti na počtu vzorků	92
Obr. 22	Rozmístění kolonky, sběrné zkumavky a víček v adaptoru do rotoru při přečišťovacím protokolu QIAcube	93
Obr. 23	Kazety s injektory: Kazeta s nukleotidy: A – dATPαS, C – dCTP, G – dGTP, T – dTTP; Kazeta s primery: P1 – Primer 1, P2 – Primer 2, P3 – Primer 3, P4/BB – Primer 4/Binding buffer; Kazeta s reagensiemi: DS – Denaturation solution, E – Enzyme, SSubstrate, AB – Annealing buffer.	99
Obr. 24	Komora přístroje PyroMark Q48	99
Obr. 25	Výstup z online stránky BioVectis (v tomto případě byl kalendářový věk 42 let shodně s odhadem)	103
Obr. 26	Procento vzorků predikovaných s danou odchylkou od reálné hodnoty věku	110
Obr. 27	Procesní kroky při určování věku pomocí MPS z krve	112
Obr. 28	Ilustrační rozmístění reakčních mixů a analyzovaných vzorků na PCR destičce	115
Obr. 29	Elektroforetogram nesprávně načteného velikostního markeru	118
Obr. 30	Příklad výpočtu pro smíchání amplikonů	119
Obr. 31	Nastavení parametrů v programu Illumina Experiment Manager – Workflow parameters	122
Obr. 32	Nastavení parametrů při tvorbě seznamu prób v programu SeqMonk	127
Obr. 33	Nastavení parametrů při tvorbě kvantifikačního reportu v programu SeqMonk	128
Obr. 34	Vizuální výsledky digitální elektroforézy vzorku 2 pro jednotlivé reakční mixy A–C	129

Seznam tabulek

Tab. 1:	Hodnoty PI pro kombinace profilů DNA matky, dítěte a žalovaného	33
Tab. 2:	Objemy premixů v mikrolitrech (μl) pro různé počty reakcí	42
Tab. 3:	Amplifikační program ESSplex SE QS	43
Tab. 4:	Objemy denaturačního roztoku v mikrolitech (μl) pro různé počty vzorků	44
Tab. 5:	Objemy PCR reagentů ve směsi	58
Tab. 6:	Objemy reagentů pro Sangerovo sekvenování	60
Tab. 7:	Run Summary – přehledný výpis základních metrik primární analýzy	74
Tab. 8:	Reakční objemy PowerSeq	76
Tab. 9:	Míchání indexů	77
Tab. 10:	Zobrazení nalezených majoritních variant v software GeneMarker HTS (SoftGenetics, LLC)	82
Tab. 11:	Reagencie bisulfitační reakce	89
Tab. 12:	Tepelné podmínky bisulfitační konverze	89
Tab. 13:	Složky PCR amplifikace metylačních markerů	96
Tab. 14:	Tepelné podmínky PCR amplifikace metylačních markerů	96
Tab. 15:	CpG assaye pro metylační markery při určování věku	98
Tab. 16:	Modely používané pro predikci věku a jejich průměrná absolutní odchylka mezi predikovanou a reálnou hodnotou	109
Tab. 17:	Protokol pro bisulfitovou konverzi	113
Tab. 18:	Příprava primerových mixů	114
Tab. 19:	Příprava reakčních mixů	115

Tab. 20:	qPCR touchdown protokol	116
Tab. 21:	Program pro tagmentaci	120
Tab. 22:	Program pro indexační PCR	121
Tab. 23:	Hodnoty pro vytvoření BED souboru. Koordináty jsou uváděny ve verzi hg19	123
Tab. 24:	Nastavení parametrů při importu vzorků do programu SeqMonk	126
Tab. 25:	Nastavení parametrů při importu anotace do programu SeqMonk	126
Tab. 26:	Zájmové oblasti pro predikční model	128
Tab. 27:	Preanalytické hodnoty	129
Tab. 28:	Výsledky digitální elektroforézy	130
Tab. 29:	Rozpis pro tvorbu poolů a výsledky po přečištění	130
Tab. 30:	Rozpis pro přípravu knihovny a výsledky po přečištění	130
Tab. 31:	Metylační hodnoty a finální výsledek	130

KATALOGIZACE V KNIZE – NÁRODNÍ KNIHOVNA ČR

Vybrané metody forenzní genetiky / Jiří Drábek, ed.. -- 1. vydání. --
Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2022. -- 1 online zdroj
České a anglické resumé
Obsahuje bibliografii

ISBN 978-80-244-6177-9 (online ; pdf)

* 343.983:575 * 577.21-088.7:612.6.05 * 343.982 * (048.8:082)

- forenzní genetiky
- genetické testování
- kriminalistická technika
- kolektivní monografie

343.9 – Kriminalistika [16]

Vybrané metody forenzní genetiky

Jiří Drábek, ed.

Odpovědná redaktorka Tereza Vintrová

Jazyková korektura Jiří Drábek

Překlad resumé Jiří Drábek

Návrh obálky Lenka Wünschová

Sazbu písmem Adelle provedla Jitka Bednaříková

Publikace neprošla ve vydavatelství redakční jazykovou úpravou.

Vydala Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc
vydavatelství.upol.cz

1. vydání

Olomouc 2022

DOI: 10.5507/lf.22.24461779

ISBN 978-80-244-6177-9 (online: ipdf)

VUP 2022/0289 (online: ipdf)

Neprodejná publikace