



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



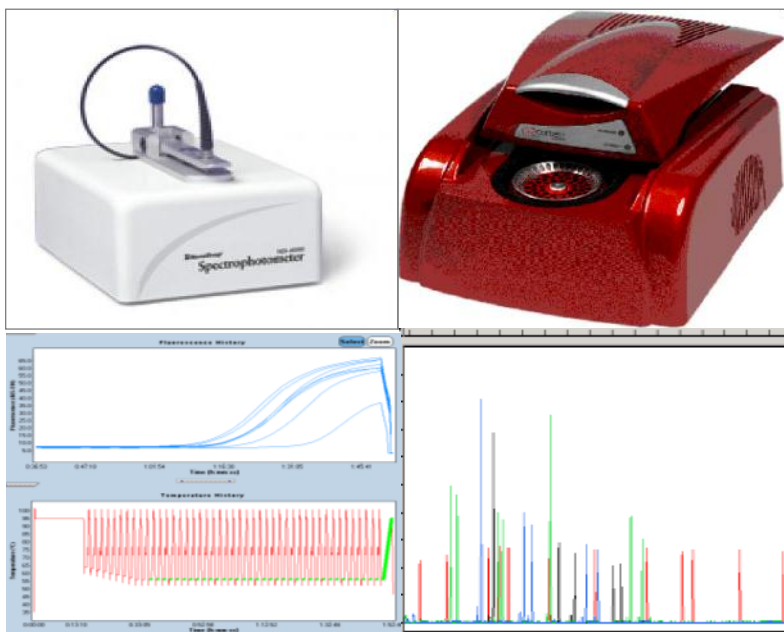
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# **Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů**

**Registrační číslo: CZ.1.07/1.1.00/14.0016**

# Proces forenzní identifikace pomocí DNA profilování



doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.

Ústav molekulární a translační  
medicíny

Univerzita Palackého Olomouc

12.1.2012

# CV

- 1993 – 1999: konzultant pro určení otcovství a příbuznosti soudní znalkyně doc.MUDr.A.Bártové, CSc.
- 1999 – doposud: soudní znalec pro určení otcovství a příbuznosti
- 2003 – 2003: validace miniSTR kitu pro identifikaci pozůstatků z teroristického útoku 9/11 (Ohio, USA)
- 2004 – doposud: dánská externí kontrola kvality PTW (RTW), oponent časopisu FSI (FSI:G); výuka forenzní chemie na UP
- 2008 – doposud: předseda ČSSFSG ([www.cssfg.org](http://www.cssfg.org)); řešitel grantu 4N6gen ([www.4N6gen.org](http://www.4N6gen.org))
- 2011 – doposud: člen pracovní skupiny ISFG; výuka forenzní genetiky na UK

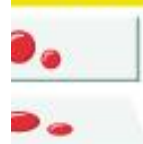


# CSI:

## CRIME SCENE INVESTIGATION



DO NOT CROSS





# CSI efekt



<http://www.scadconnector.com/news/the-csi-effect/>

# Osnova přednášky

- DNA jako důkaz
- Jak to začalo, kam to dospělo
- Jak to probíhá, co se může pokazit

# Forum

- Starořímské místo setkání kupců, politiků, učenců a občanů k projednání právních věcí.
- Forenzní – týkající se práva, soudní.

# DNA jako důkaz



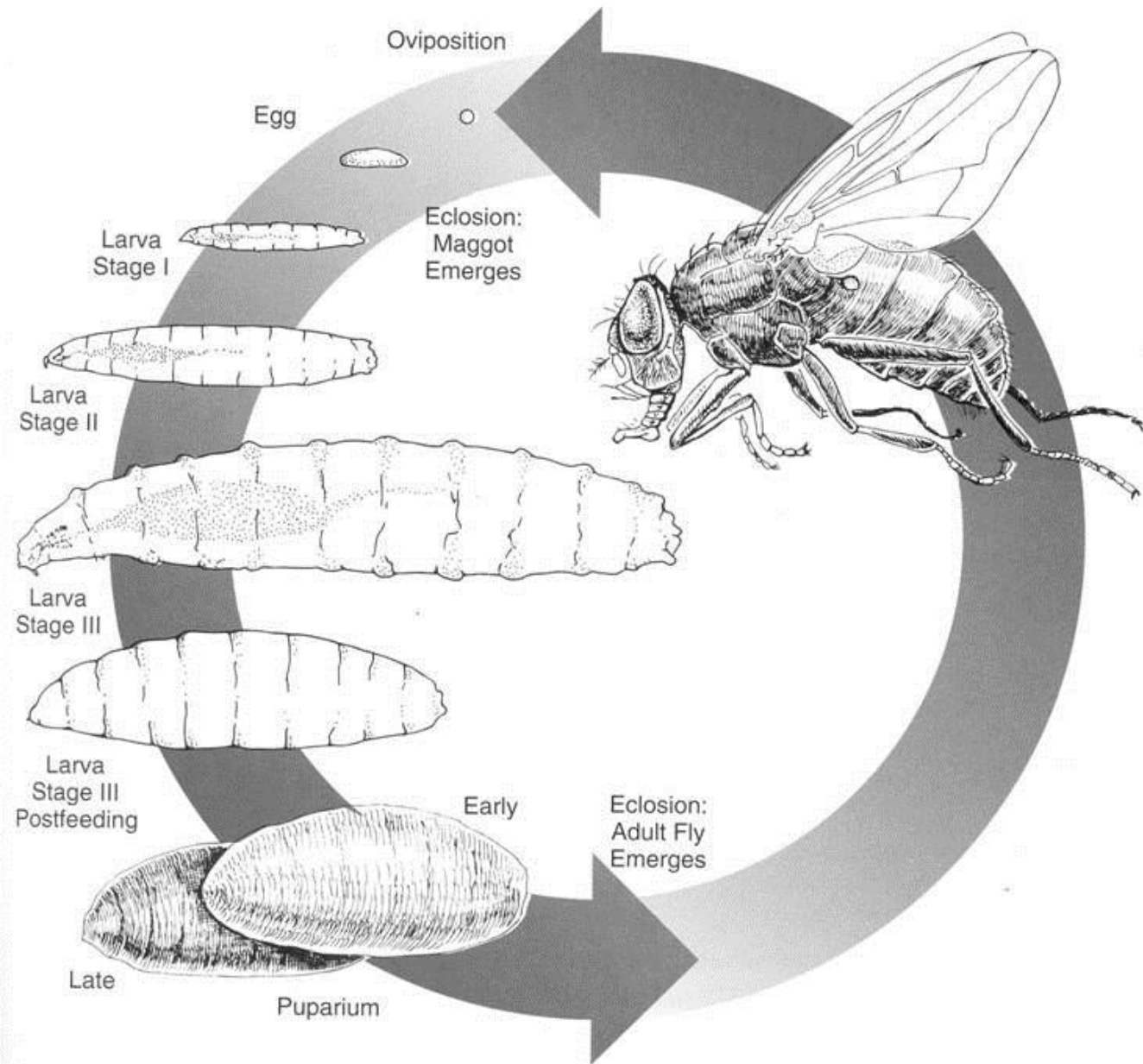
# Účel DNA profilování

- Propojení individuální osoby se zločinem nebo místem zločinu (pochází stopy ze stejného zdroje?)
  - Dítě vzešlé ze zločinu
  - Pohřešované a unesené osoby
  - Stopa a podezřelý
  - Stopa a databáze zločinců
- Vyvinění podezřelých
  - Innocence project
- Identifikace obětí hromadných a válečných neštěstí
  - 9/11
  - Tsunami
  - Vojenská psí známka.

## Další použití?

- Populační a evoluční studie
- Určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby

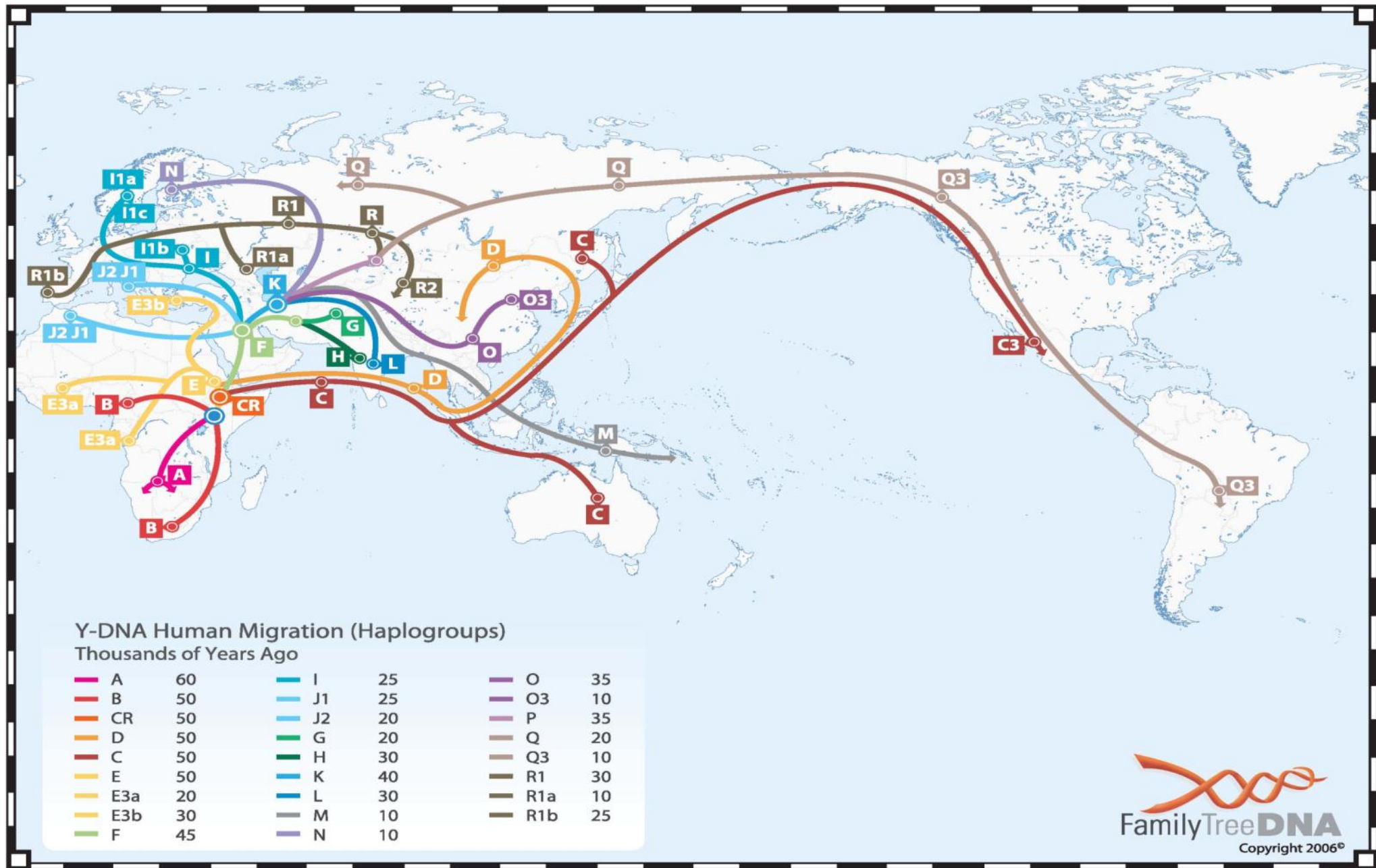
# Životní cyklus holometabolní mouchy



## ... použití?

- Populační a evoluční studie
- Určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby
- Vyšetření otcovství a příbuznosti, historická genealogie

# Přesuny populací dle chromozómu Y





# Carská rodina Romanovců se před bolševiky nezachránila

Table 1 STR genotypes<sup>a</sup> for the nine skeletons

| Skeleton    | HUMVWA/31        | HUMTH01         | HUMF13A1        | HUMFES/FPS       | HUMACTBP2        |
|-------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| 1 (servant) | <del>14,20</del> | <del>9,10</del> | <del>6,16</del> | <del>10,11</del> | ND               |
| 2 (doctor)  | <del>17,17</del> | <del>6,10</del> | 5,7             | <del>10,11</del> | <del>11,30</del> |
| 3 (child)   | 15,16            | 8,10            | 5,7             | 12,13            | 11,32            |
| 4 (Tsar)    | 15,16            | 7,10            | 7,7             | 12,12            | 11,32            |
| 5 (child)   | 15,16            | 7,8             | 5,7             | 12,13            | 11,36            |
| 6 (child)   | 15,16            | 8,10            | 3,7             | 12,13            | 32,36            |
| 7 (Tsarina) | 15,16            | 8,8             | 3,5             | 12,13            | 32,36            |
| 8 (servant) | <del>15,17</del> | <del>6,9</del>  | 5,7             | <del>8,10</del>  | ND               |
| 9 (servant) | <del>16,17</del> | <del>6,6</del>  | <del>6,7</del>  | <del>11,12</del> | ND               |

|                                     | VWA              | TH01               | F13A1            | FES/FPS          | ACTBP2           |
|-------------------------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tsar (Skeleton 4) <sup>a</sup>      | 15,16            | 7,9,3 <sup>b</sup> | 7,7              | 12,12            | 11,32            |
| Tsarina (Skeleton 7) <sup>a</sup>   | 15,16            | 8,8                | 3,2,5            | 12,13            | 32,36            |
| Anna Anderson<br>(intestine sample) | <del>14,16</del> | <del>7,9,3</del>   | <del>3,2,7</del> | <del>11,12</del> | <del>15,18</del> |

|                                                        |                  |     |                         |                     |
|--------------------------------------------------------|------------------|-----|-------------------------|---------------------|
| Servant 1 (?)                                          | Femur skeleton 1 | 760 | . . . . . C . . . . .   | . . . . . G C C C   |
| Servant 2 (?)                                          | Femur skeleton 8 | 742 | . . . . . C . . . . .   | . . . . . G . . C   |
| Servant 3 (?)                                          | Femur skeleton 9 | 650 | . . . T . T G . . . .   | . . . C G . . C     |
| Royal Physician<br>Dr Botkin (?)                       | Femur skeleton 2 | 736 | . . . . . T . . . . .   | . . . C . G C C C   |
| Daughter 1 of Tsar/Tsarina (?)                         | Femur skeleton 3 | 755 | T . . . . . . . . . .   | C . . . . G . . C   |
| Daughter 2 of Tsar/Tsarina (?)                         | Femur skeleton 5 | 634 | T . . . . . . . . . .   | C . . . . - G . . C |
| Daughter 3 of Tsar/Tsarina (?)                         | Femur skeleton 6 | 760 | T . . . . . . . . . .   | C . . . . G . . C   |
| Tsarina Alexandra (?)                                  | Femur skeleton 7 | 744 | T . . . . . . . . . .   | C . . . . G . . C   |
| Duke of Edinburgh (Grand<br>nephew of Tsarina)         | Blood sample     | 760 | T . . . . . . . . . .   | C . . . . G . . C   |
| Tsar Nicholas II (?)                                   | Femur skeleton 4 | 782 | . C Y . . . . T T . . . | . G . . G . . C     |
| Gt. Gt. grandson of Louise<br>of Hesse-Cassel          | Blood sample     | 781 | . C T . . . . T T . . . | . G . . G . . C     |
| Gt. Gt. Gt. granddaughter<br>of Louise of Hesse-Cassel | Blood sample     | 782 | . C T . . . . T T . . . | . G . . G . . C     |

## ... použití?

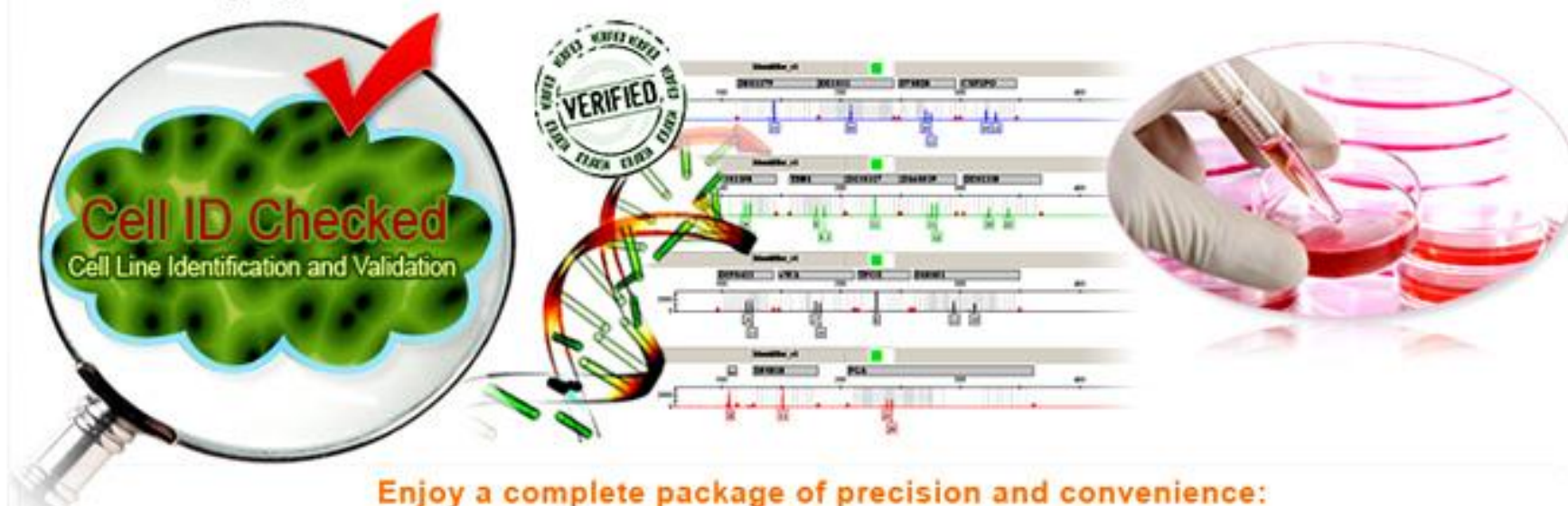
- Populační a evoluční studie
- Určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby
- Vyšetření otcovství a příbuznosti, historická genealogie
- Kontrola pravosti buněčných linií



# Krize identity buněčných linií

## The Solution to the Cell Line Identity Crisis

Cell line authentication testing prevents misidentification and cross-contamination, satisfying NIH recommendations.

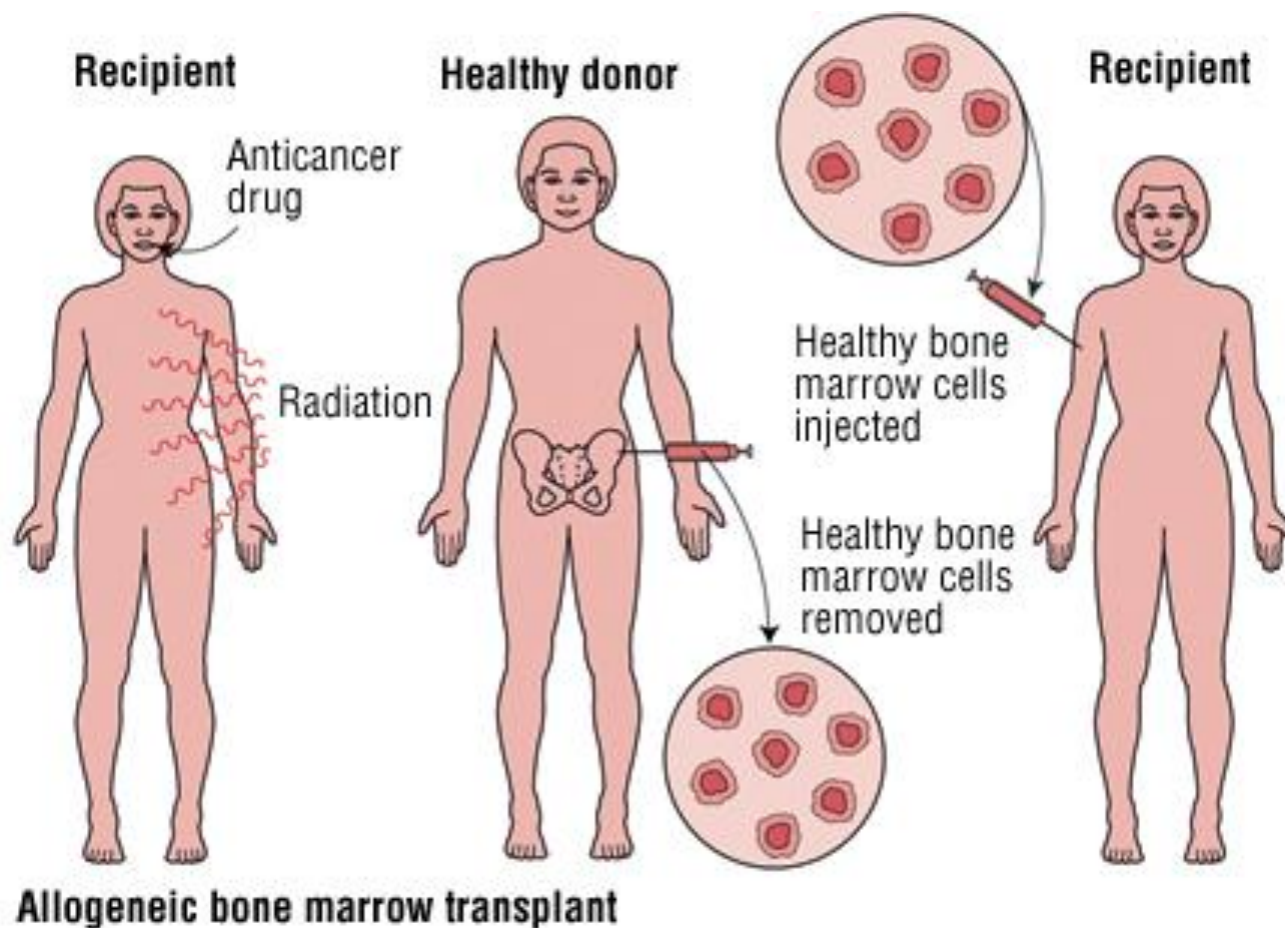


- Detect mycoplasma contamination
- Detect viral contamination
- Detect known mutations and analyse candidate genes
- Detect intra- and inter-species contamination
- Enjoy multiple-platform technology in accredited facilities
- Consult with expert scientific staff free of charge
- Receive rapid and reliable results in two days
- Pay as little as \$95/sample

## ... použití?

- Populační a evoluční studie
- Určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby
- Vyšetření otcovství a příbuznosti, historická genealogie
- Kontrola pravosti buněčných linií
- Monitorování po transplantaci kostní dřeně

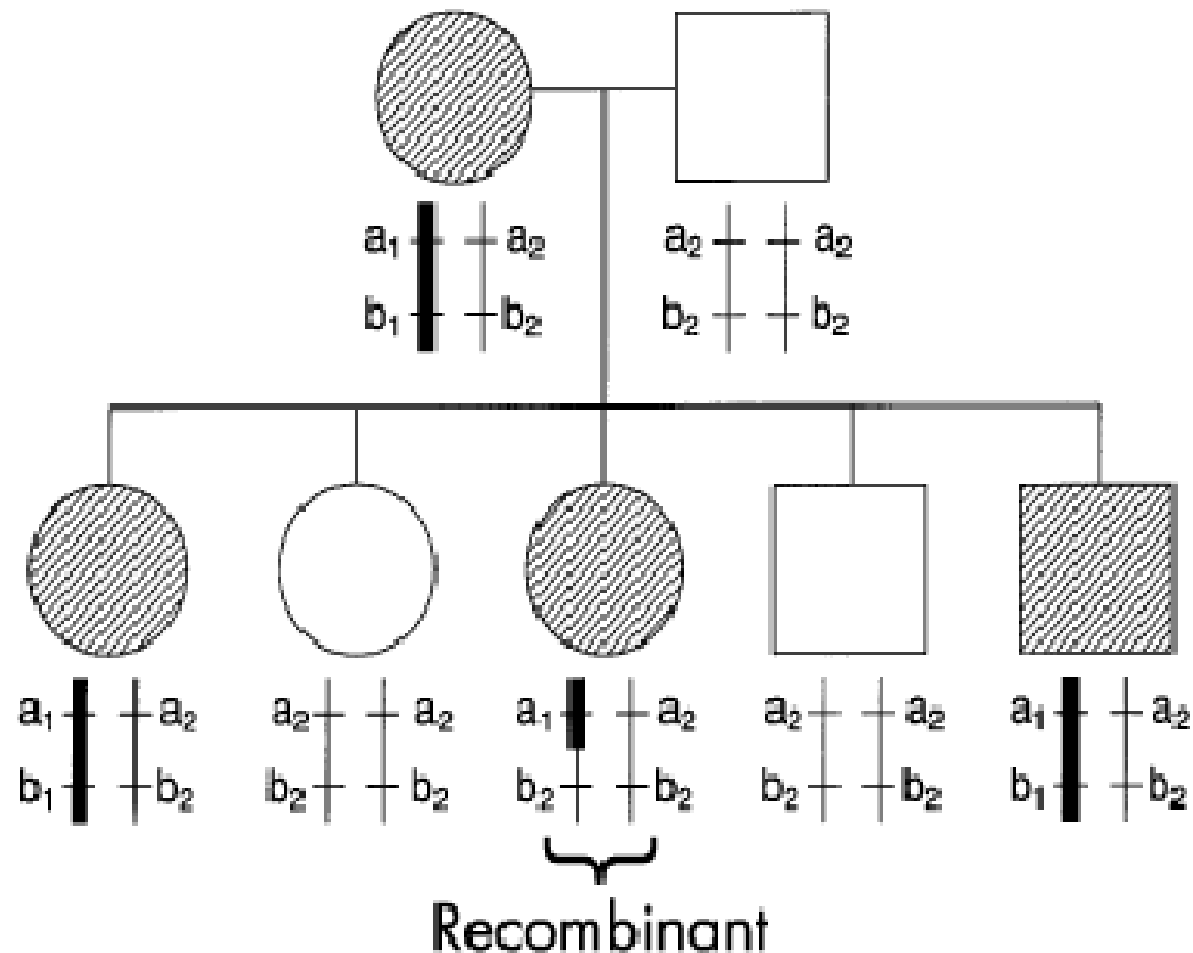
# Monitorování úspěšnosti transplantace kostní dřeně



## ... použití?

- Populační a evoluční studie
- Určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby
- Vyšetření otcovství a příbuznosti, historická genealogie
- Kontrola pravosti buněčných linií
- Monitorování po transplantaci kostní dřeně
- Mapování dědičných chorob.

# Mapování dědičných chorob



# Jak to začalo

## Frank and Ernest



Copyright (c) by Thaves. Distributed from [www.thecomics.com](http://www.thecomics.com).



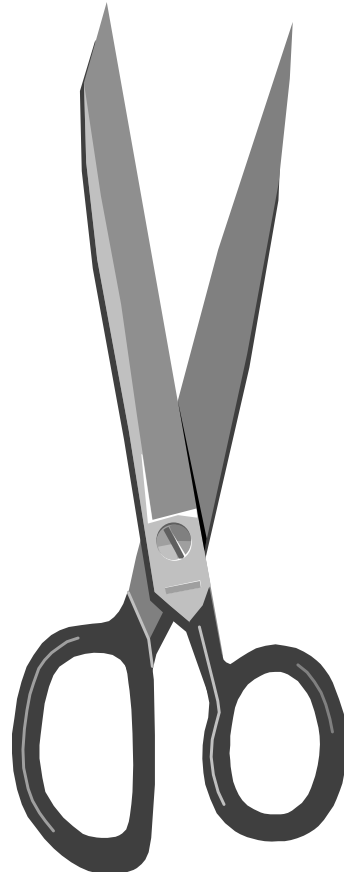
# Osmdesátá léta: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



Sir Alec Jeffreys

- Využíváno pro genetické mapování
- Změna v rozpoznávacích místech pro štípací enzym restriktázu vede ke změně spektra délek restričních fragmentů

# Restrikční štěpení



# RFLP

- Polymorfismus v délce restrikčních fragmentů
- gDNA naštěpíme restriktázou
- Fragmenty rozdělíme elektroforeticky
- Z gelu je přesajeme na membránu
- Membránu hybridizujeme se sondou
- Navázanou sondu detekujeme

# Restriktáza rozpoznávající „je“

DNA je totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



# Sonda pro: „kula, která je hustě“

DNA je totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



# Standardní alela po naštěpení

DNA j

e totiž dlouhá molekula, která j

e hustě namotaná.



# Mutantní alela

DNA je totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



The diagram shows a horizontal yellow bar representing a DNA molecule. In the center, there is a small white triangle pointing upwards, which is a mutation. A black arrow points from the text below to this triangle.

ztráta restrikčního místa  
(nezabrání vazbě sondy)



A small icon of a pair of scissors, indicating a restriction site.

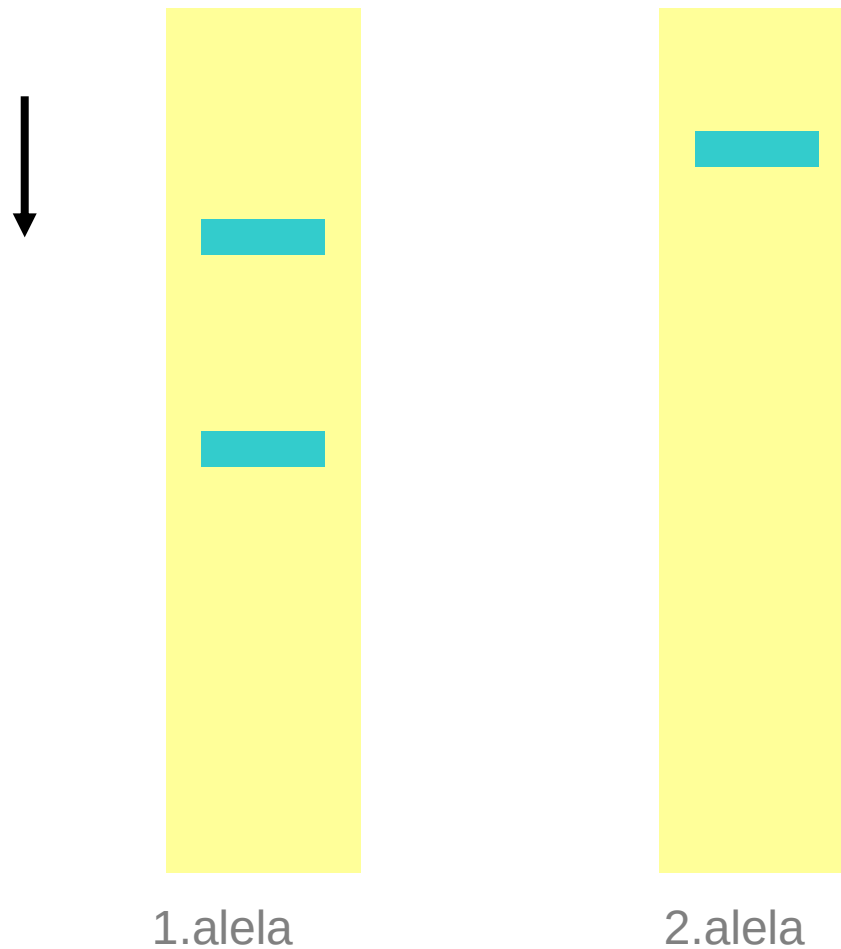
# Mutantní alela po naštěpení

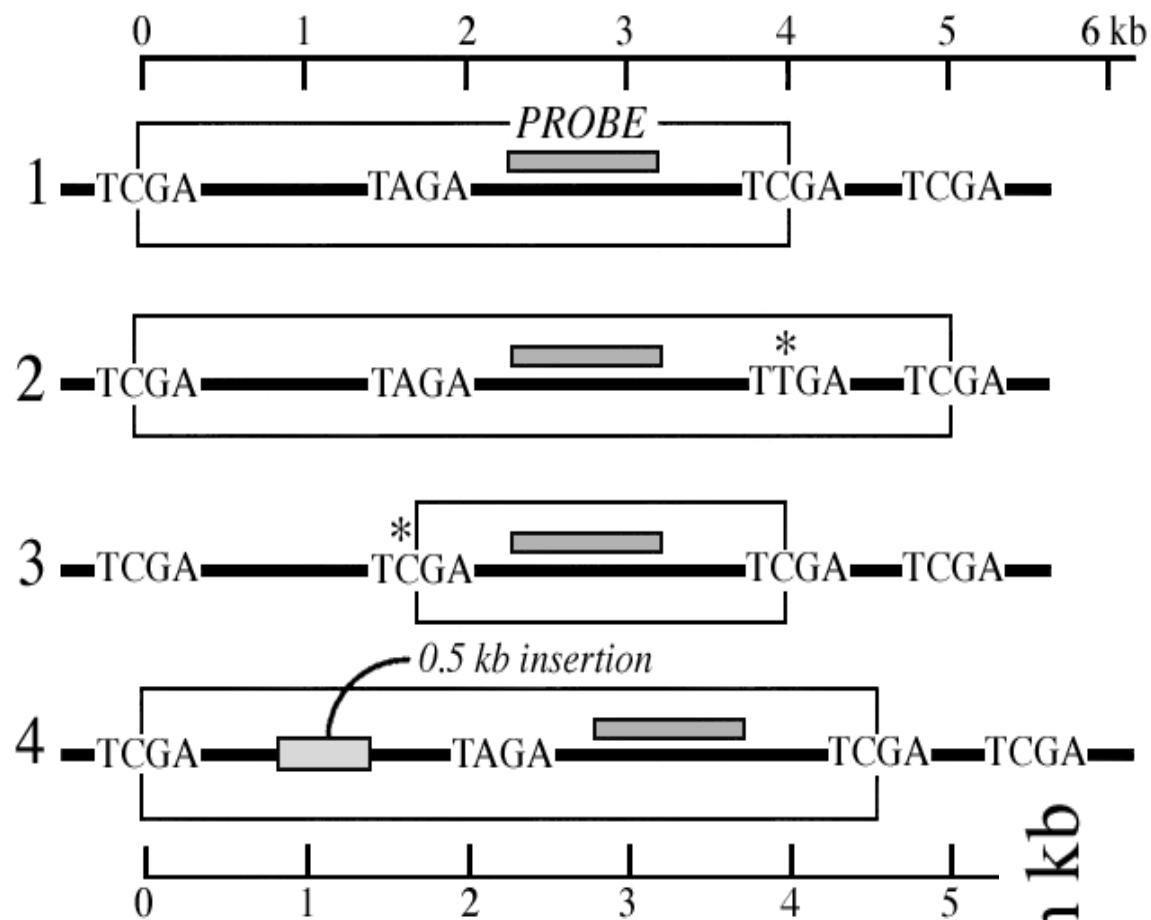
DNA j



e totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.

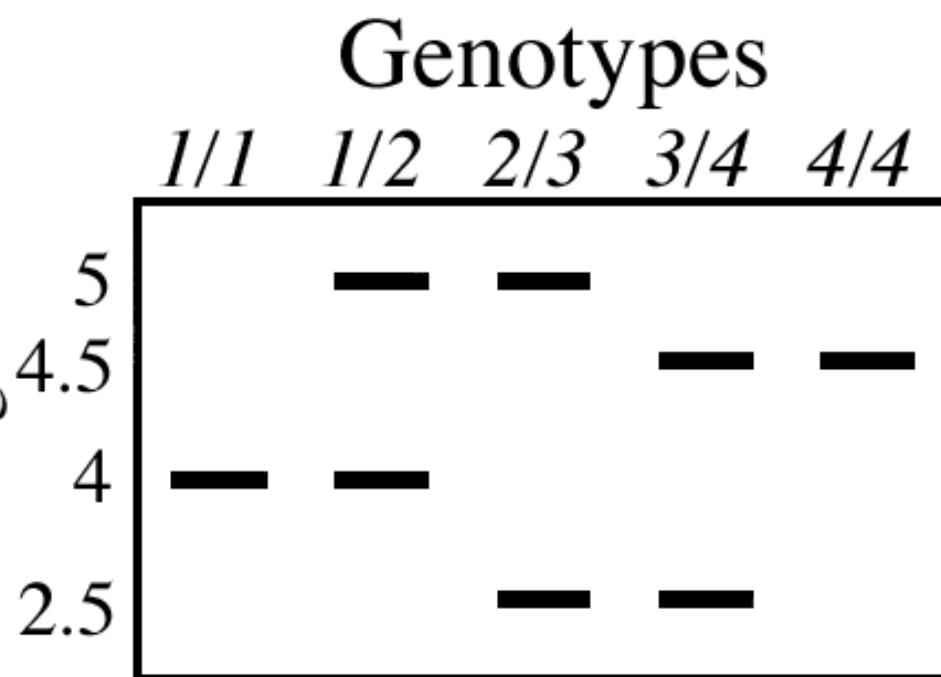
# Po elektroforéze, přesátí a hybridizaci (Southern blotting)





## RFLP – detekční krok

Size of fragments in kb





Vladimír Renčín

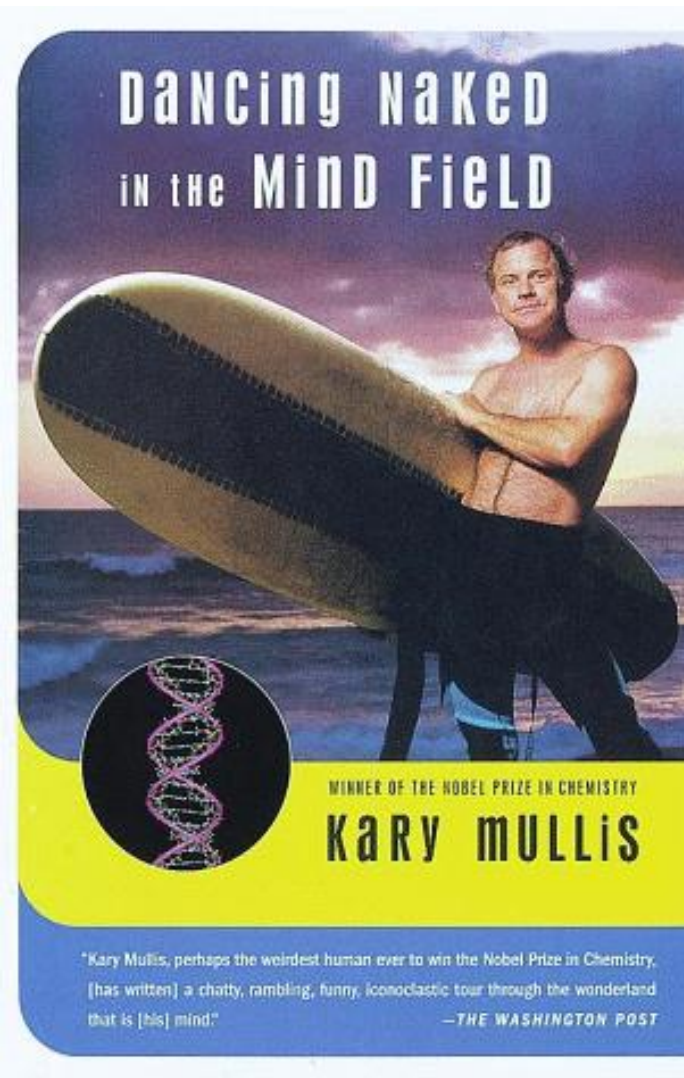
# Případ Colin Pitchfork (1983 a 1986)



- Dvě slečny znásilněny a zavražděny v hrabství Leicestershire v Anglii
- Mentálně zaostalý mladík Richard Buckland, který nahlásil nález druhého těla, se přiznal k zavraždění této dívky
- Na základě RFLP vyloučen
- 5 000 místních mužů bylo požádáno o vzorek krve nebo bukální stěr
- Pekař exhibicionista Colin Pitchfork za sebe k odběru poslal (za 200 liber) kamaráda Iana Kellyho, který se tím pochlubil v hospodě
- První omilostnění a první obvinění pomocí DNA důkazů.

# Nevýhody RFLP

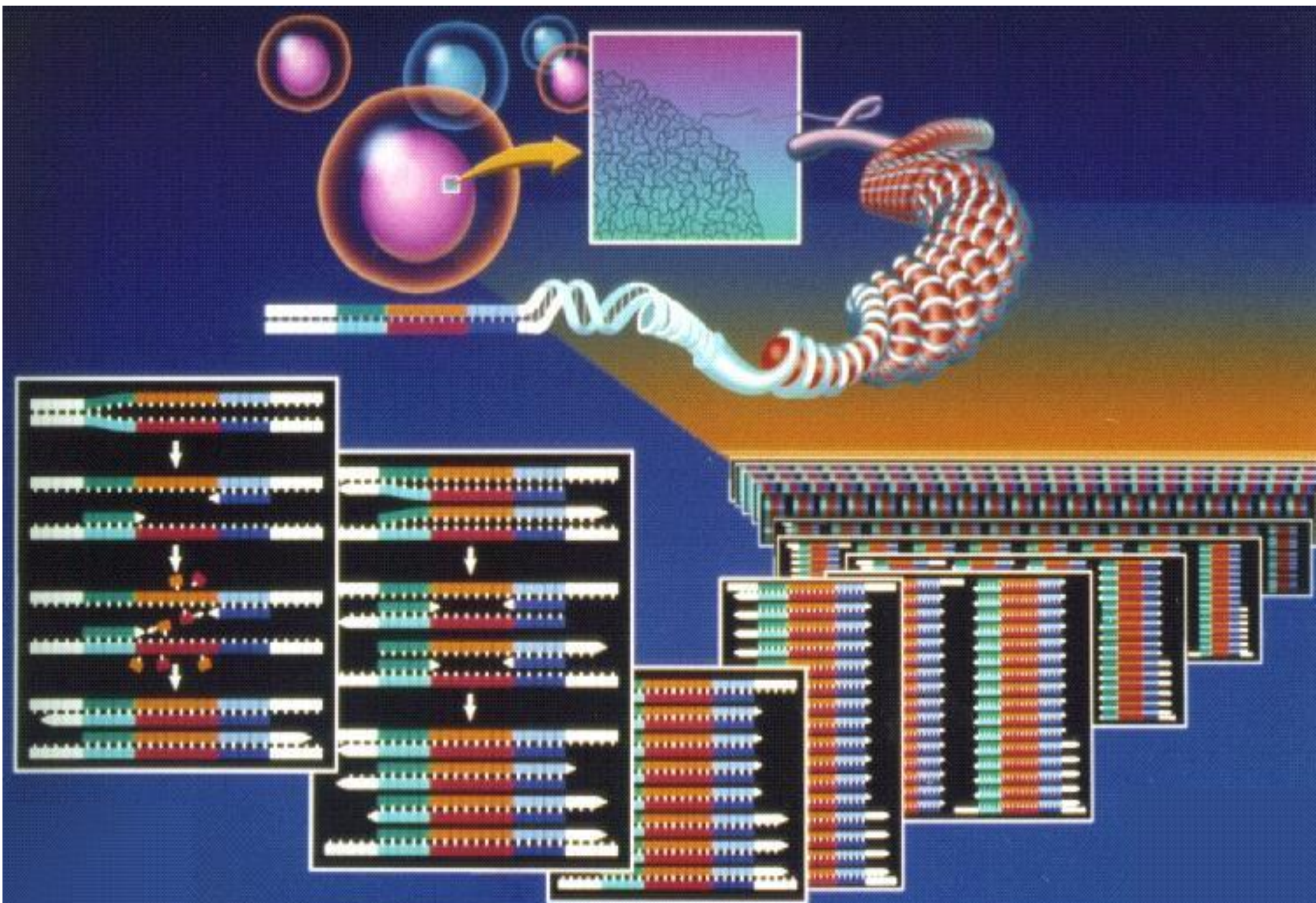
- Požadavek velkého množství intaktní DNA (50 ng odpovídá ~ 10 000 buněk)
- Metoda málo robustní (interpretační potíže)



## Nástup molekulární kopírky - PCR

- Polymerase Chain Reaction - Polymerázová řetězová reakce
- Zacyklované tři teplotní kroky v programovatelném termostatu – termocykléru
- Replikace (amplifikace) chtěného DNA fragmentu





# PCR

- První forenzní aplikace PCR byla amplifikace HLA-DQA1 (bodové polymorfismy)
- Dalším krokem byl multiplex Polymarker™ (DQA1 součástí) při použití hybridizační metody ve formátu dot-blot
- Pro PCR vystačuje menší množství templátové DNA (1-2ng), která může být fragmentovaná
- Diskriminační síla ještě není dostatečná pro kriminalistické databáze.

# **Současný standard: autozomální mikrosatelity (Short Tandem Repeats, STRs)**

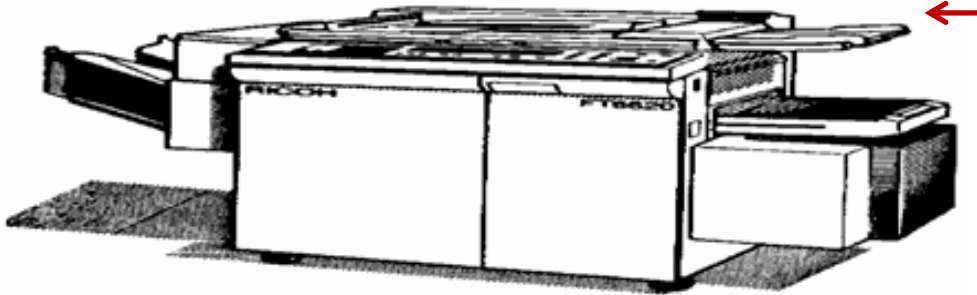
- Nekódující čtyřnukleotidové, tandemově se opakující repetice.  
Variabilita v populaci je délková, daná počtem repetice.



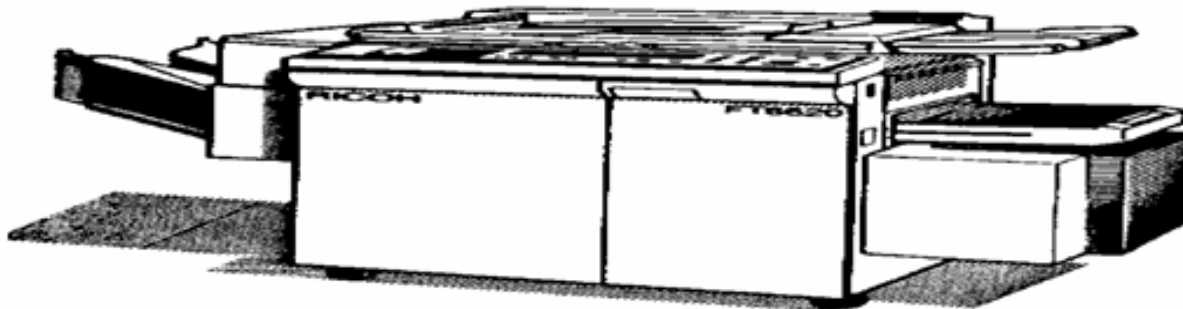
# Mikrosatelity jako text (PCR)



Alela 2: DNA je totiž dlouhá, dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



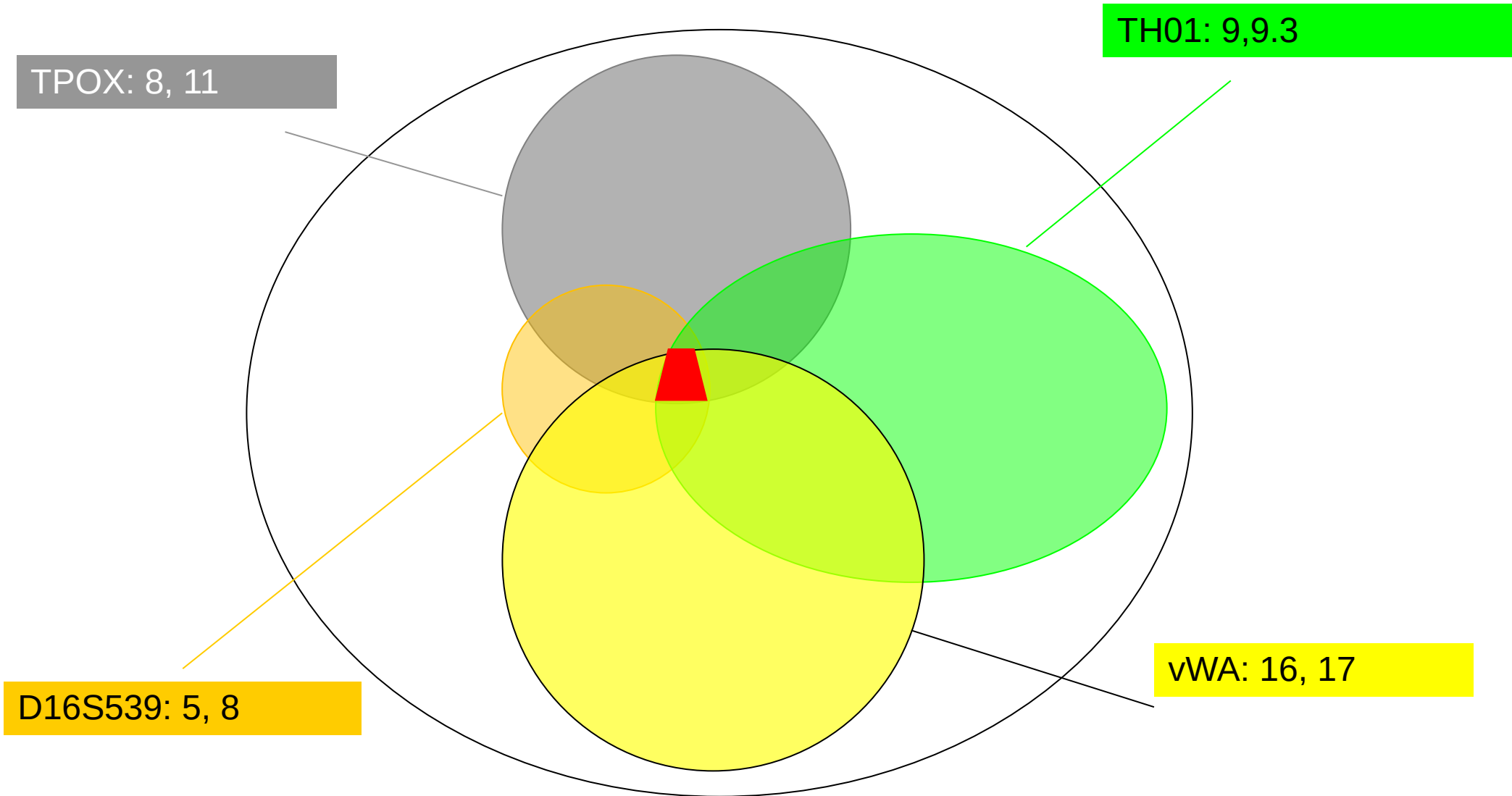
Alela 3: DNA je totiž dlouhá, dlouhá, dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



# Sekvence mikrosatelitu TH01

TTATTTCCCTCATTCAATTCATTCA  
TTCATTCAATTCACCATggAgTCTg

# Mikrosatellity



# Výhody mikrosatelitů

- Vysoká diskriminační schopnost (vystačuje pro databázování), pravděpodobnostní modely
- Kompetitivní cena
- Snadná interpretace
  - za splnění předpokladů
- Standardnost (databáze) a zároveň rozmanitost
- Slučování testů (multiplexing)
- Citlivost (<1 ng DNA), směsi a degradované vzorky
- Používané forenzní mikrosatelity nejsou ve vazbě s nemocemi
- Malé nároky na odběr a na vzorek.

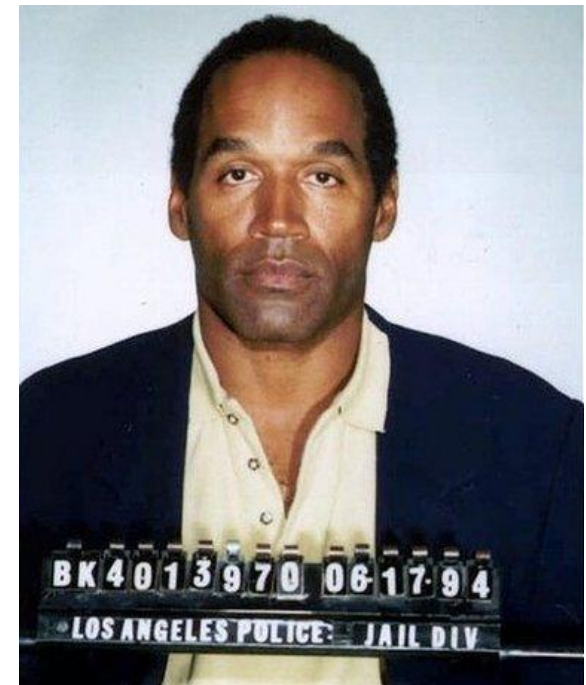
# Forenzní zpracování DNA

- Získání vzorku, přesuny vzorku (a zápis)
- Izolace a kvantifikace DNA (a zápis)
- Namnožení pomocí PCR (a zápis)
- Elektroforéza (a zápis)
- Detekce a určení genotypu (a zápis)
- Interpretace, výpočet, referování výsledku (protokol, svědčení u soudu)



## Každý krok je důležitý

- Obhájci O. J. Simpsona a jiných bohatých prominentů prokázali, že zaváhání v jakémkoliv kroku forenzního využití DNA je možno úspěšně napadnout.



# Kontrola kvality



# Akreditace dle ISO17025

- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba

# Akreditace dle ISO17025

- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu

# Akreditace dle ISO17025

- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu ve vhodné laboratoři

# Akreditace dle ISO17025

- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu ve vhodné laboratoři za použití kalibrovaných přístrojů a validovaných metod

# Akreditace dle ISO17025

- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu ve vhodné laboratoři za použití kalibrovaných přístrojů a validovaných metod; výsledky interpretuje dle odborných doporučení.

# Akreditace dle ISO17025

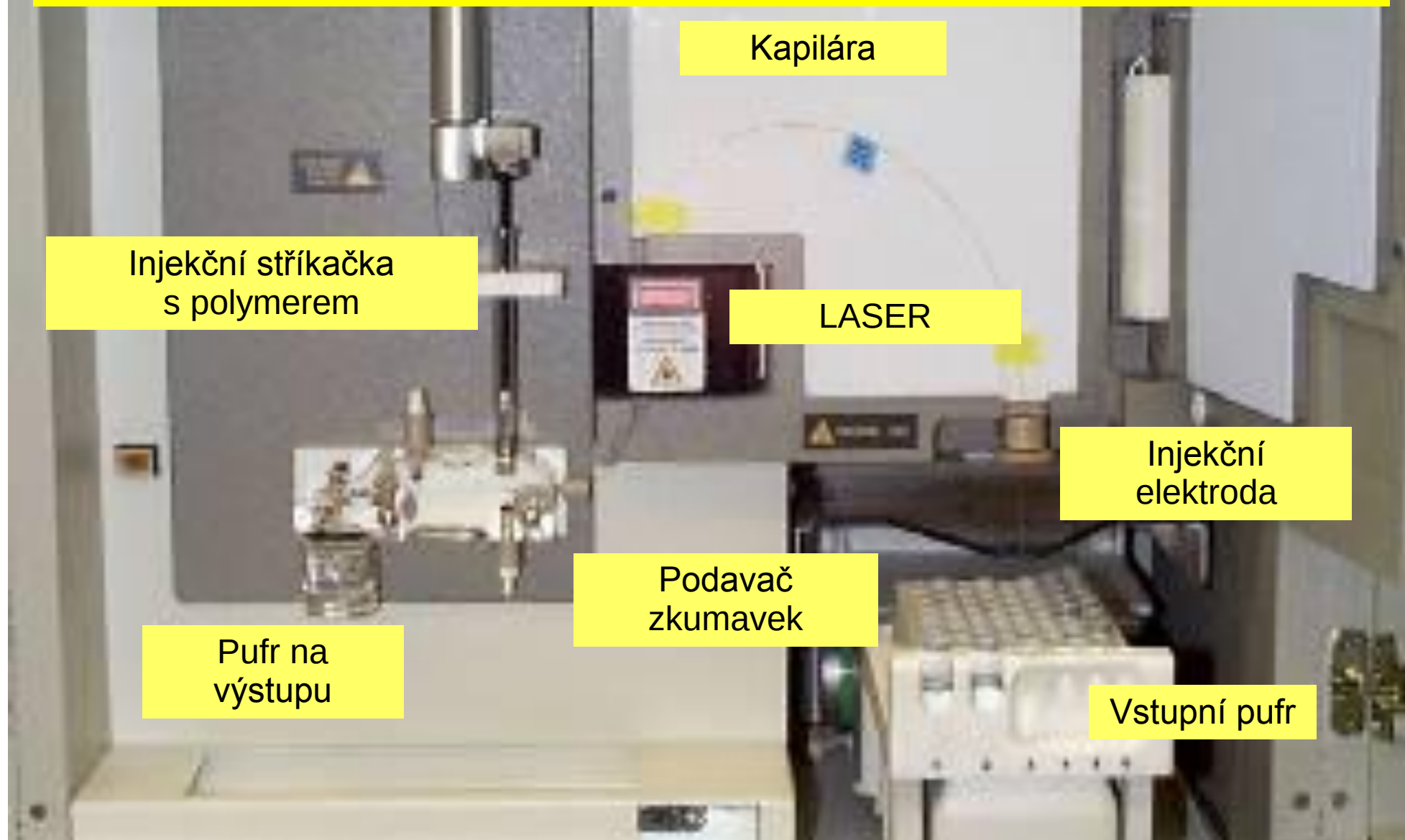
- Vyšetření vzorku provádí proškolená a externě kontrolovaná osoba dle standardního operačního protokolu ve vhodné laboratoři za použití kalibrovaných přístrojů a validovaných metod; výsledky interpretuje dle odborných doporučení.



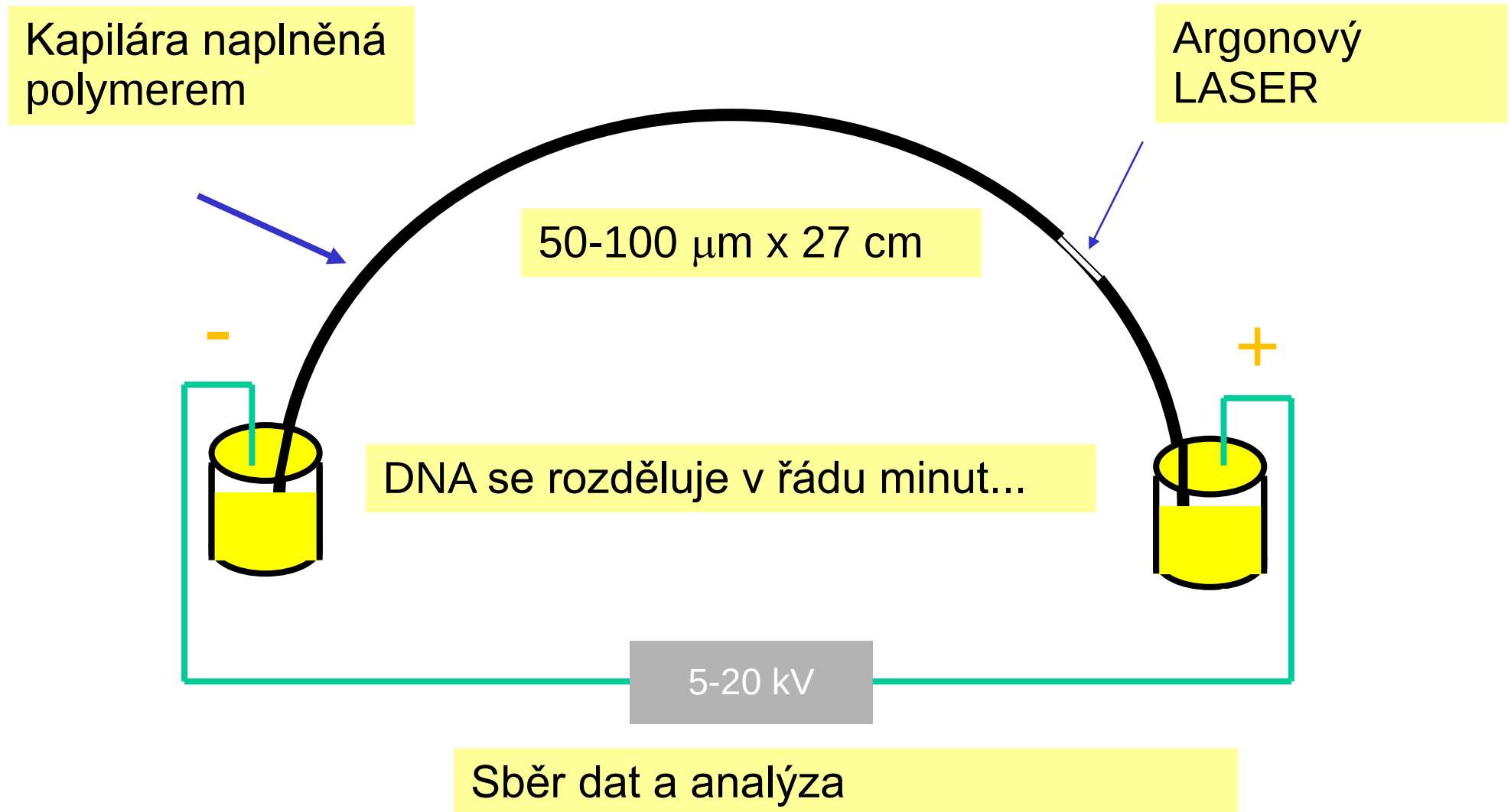
# Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer



# Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer



# Schéma kapilární elektroforézy (CE)

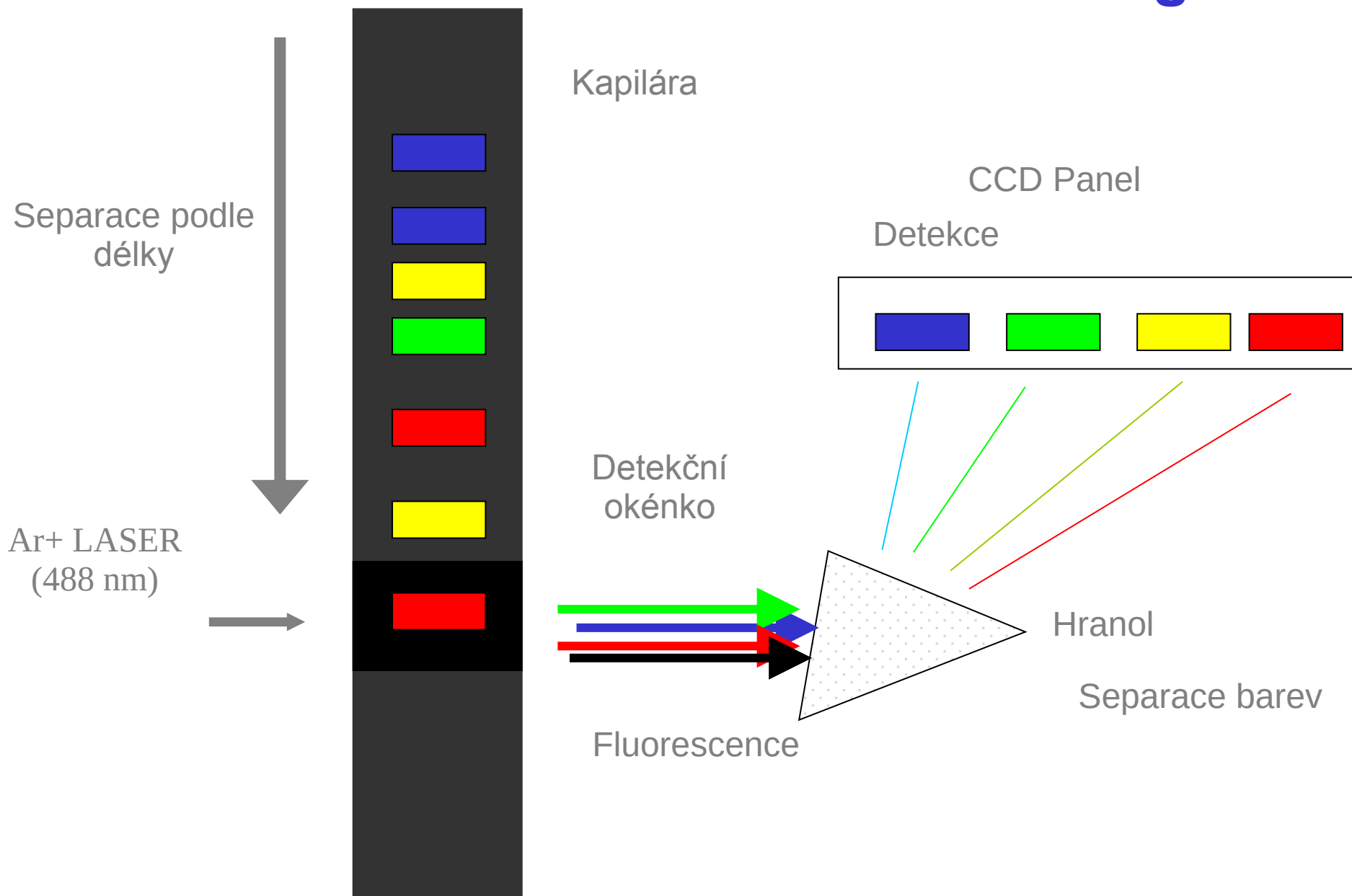


# Kapilární elektroforéza

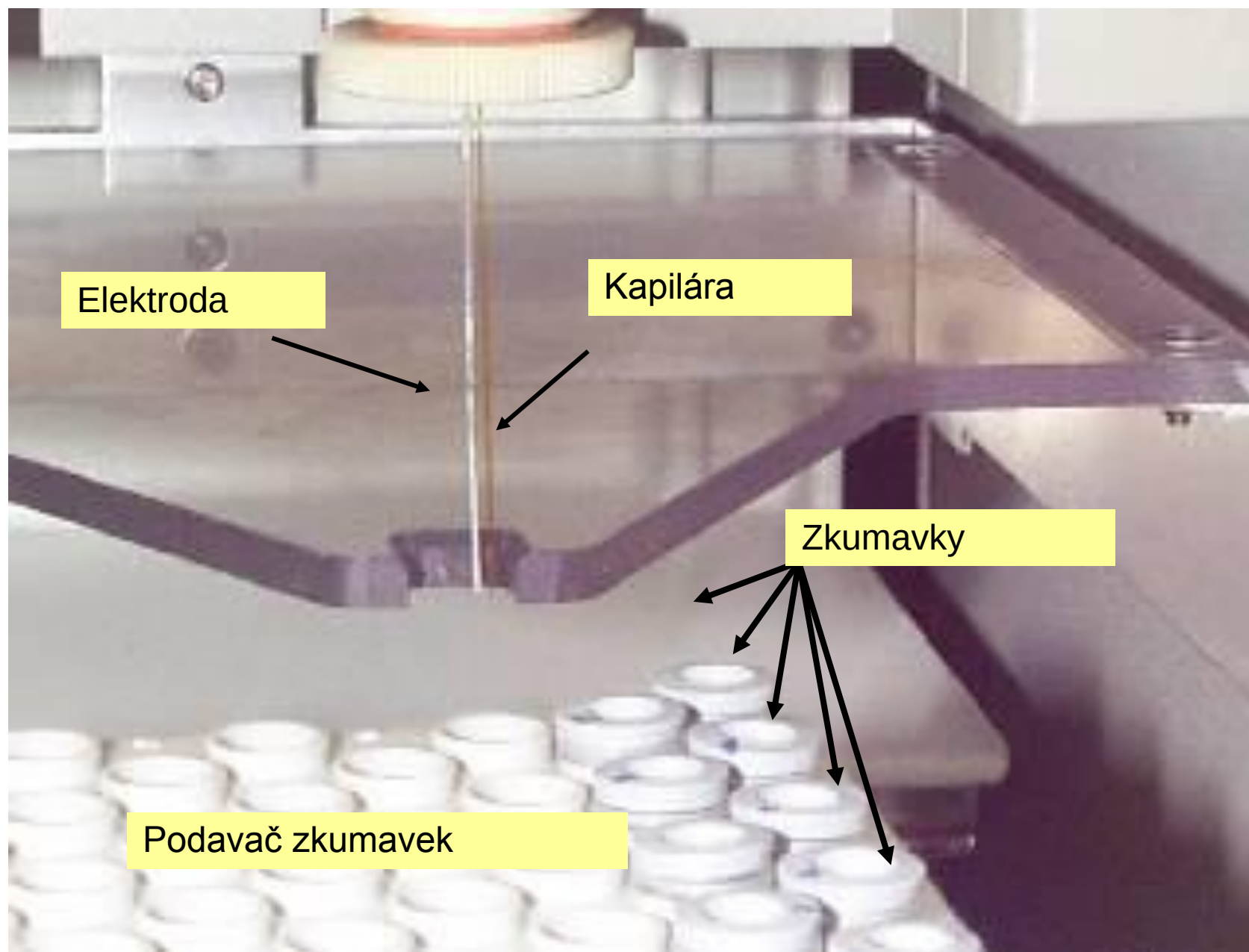
- Amplikony se elektrokineticky vstříknou do kapiláry a elektroforeticky putují (DNA je záporně nabitá)
- Při průchodu okénkem kapiláry jsou osvětleny laserem
- Fluorescenční značení se laserem excituje a vydá signál, který se nahrává a převádí softwarově na vrcholy křivky (píky).

# Schéma odečtu signálu

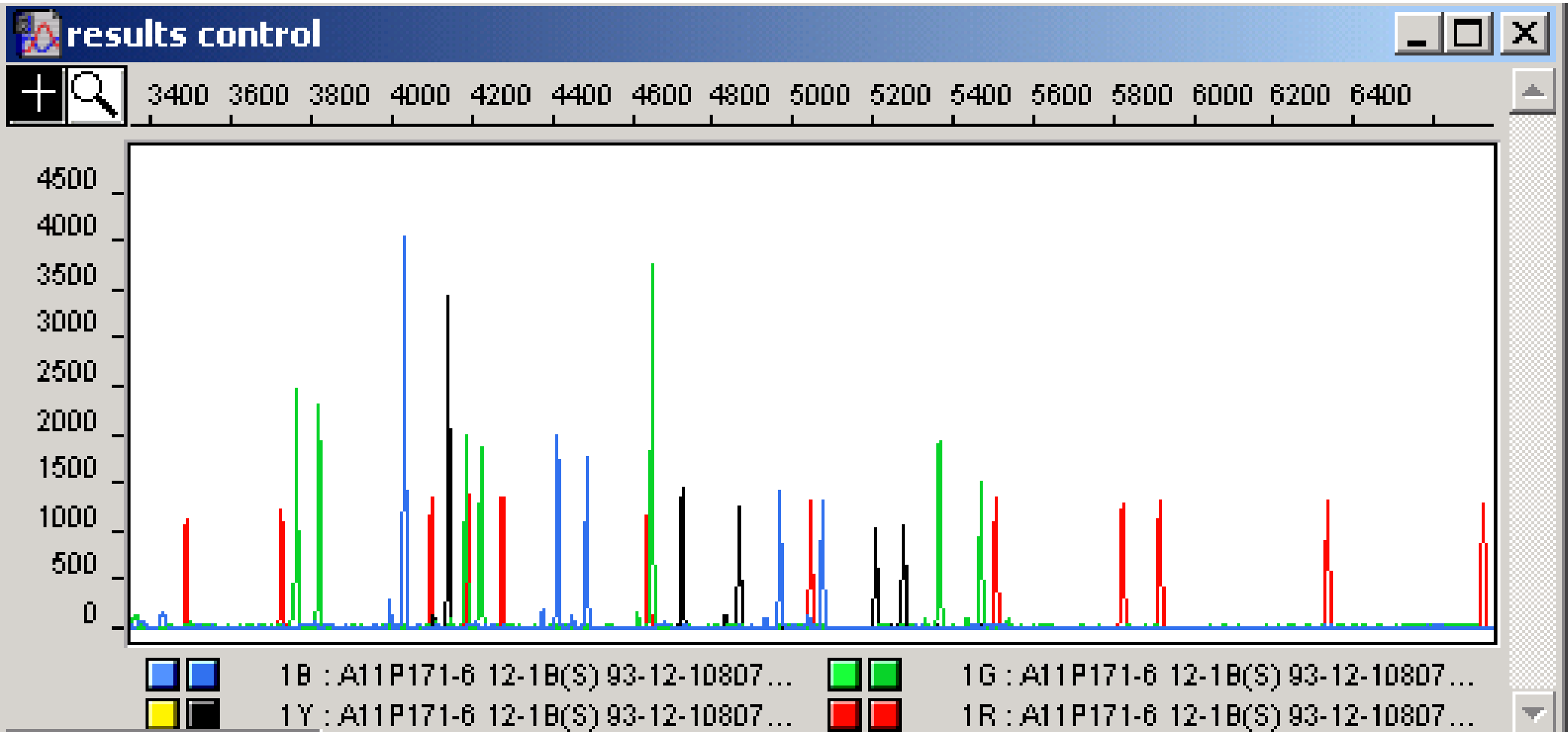
Fluorescenčně značené  
amplikony



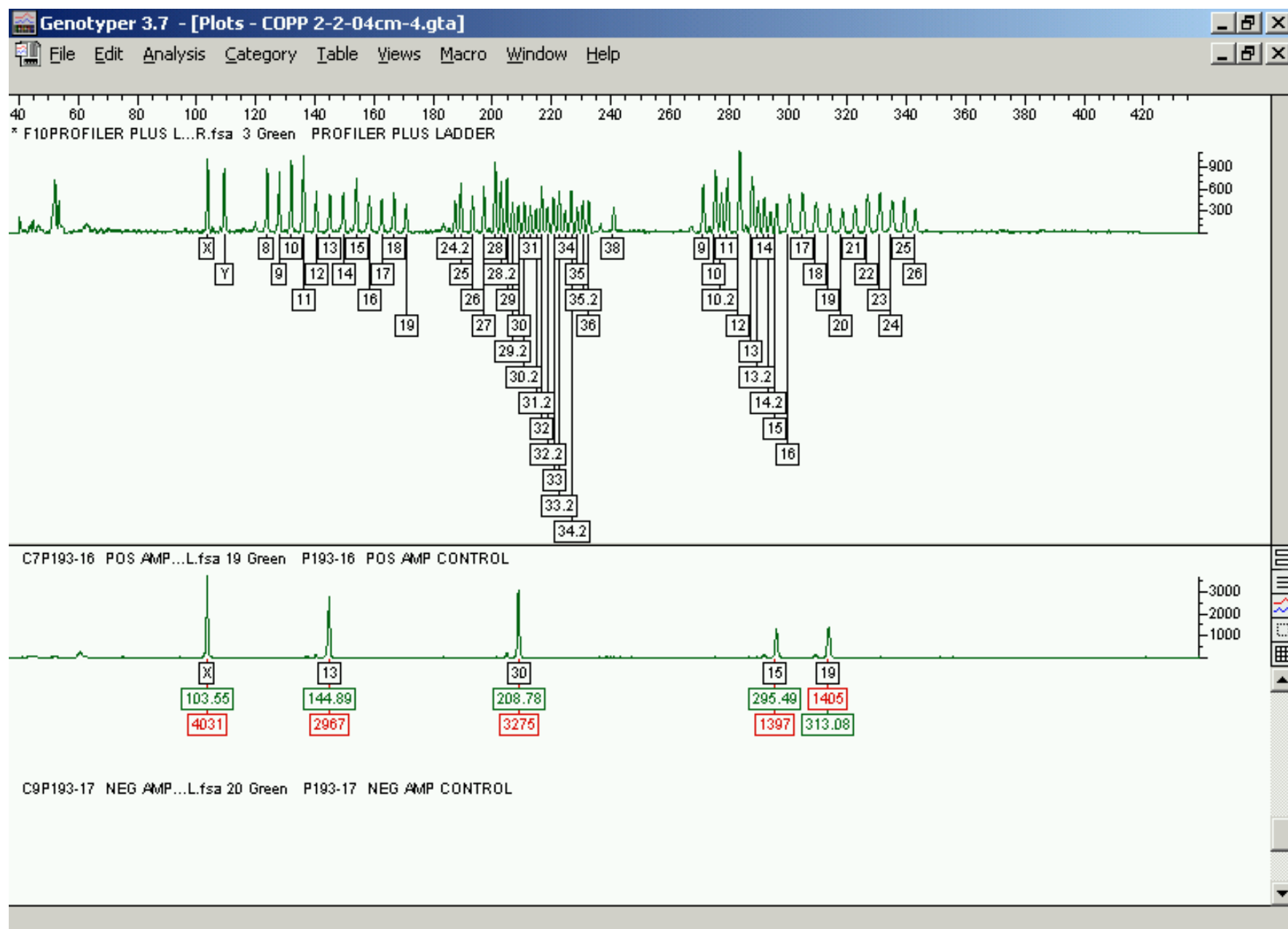
# Zaostřeno na podavač zkumavek



# STR data



# ...STR data s alelickým žebříkem





# ...STR data převedeny na čísla

## STR TYPING SUMMARY SHEET

| Date:     |      |         | DNA Analyst / Serial #: |        |         |             |        |        |         | DR #:       |         |      |       |
|-----------|------|---------|-------------------------|--------|---------|-------------|--------|--------|---------|-------------|---------|------|-------|
| 9/24/1999 |      |         | MATTHIES V9780          |        |         |             |        |        |         | 00-00-00001 |         |      |       |
| Item #    | AMEL | D3S1358 | vWA                     | FGA    | D8S1179 | D21S11      | D18S51 | D5S818 | D13S317 | D7S820      | D16S539 | TH01 | TPOX  |
| 25(S)     | X, Y | 17      | 15, 17                  | 23, 26 | 14, 15  | 26          | 12, 15 | 10     | 9, 13   | 8, 10       | 9, 10   | 8, 9 | 9, 10 |
|           | X, Y | 17      |                         |        |         |             |        |        |         | 8, 10       |         |      |       |
| 25(E)     | X    | 15, 17  | 16, 18                  | 19, 26 | 15      | 28,<br>32.2 | 14, 16 | 8, 13  | 12      | 11          | 11, 12  | 7, 8 | 11    |
|           | X    | 15, 17  |                         |        |         |             |        |        |         | 11          |         |      |       |
| VICTIM    | X    | 15, 17  | 16, 18                  | 19, 26 | 15      | 28,<br>32.2 | 14, 16 | 8, 13  | 12      | 11          | 11, 12  | 7, 8 | 11    |
|           | X    | 15, 17  |                         |        |         |             |        |        |         | 11          |         |      |       |
| SUSPECT   | X, Y | 17      | 15, 17                  | 23, 26 | 14, 15  | 26          | 12, 15 | 10     | 9, 13   | 8, 10       | 9, 10   | 8, 9 | 9, 10 |
|           | X, Y | 17      |                         |        |         |             |        |        |         | 8, 10       |         |      |       |

# The Combined DNA Index System (CODIS)

- Mohutný nástroj prevence a represe závažných trestných činů
- Databáze DNA profilů kriminálníchků a stop z míst činu
- Americký software, používaný i u nás
- DNA zákon se liší mezi USA státy, u nás chybí
- The National DNA Index (NDIS) má více než 10,269,778 DNA profilů kriminálníchků a 399,071 profilů stop (říjen 2011).
- CODIS poskytl 164,000 zásahů a pomohl při 158,000 vyšetřování (říjen 2011).

# Komplikace

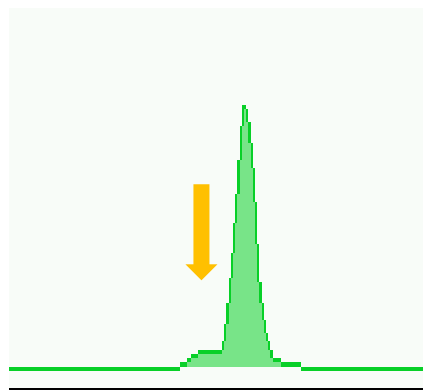
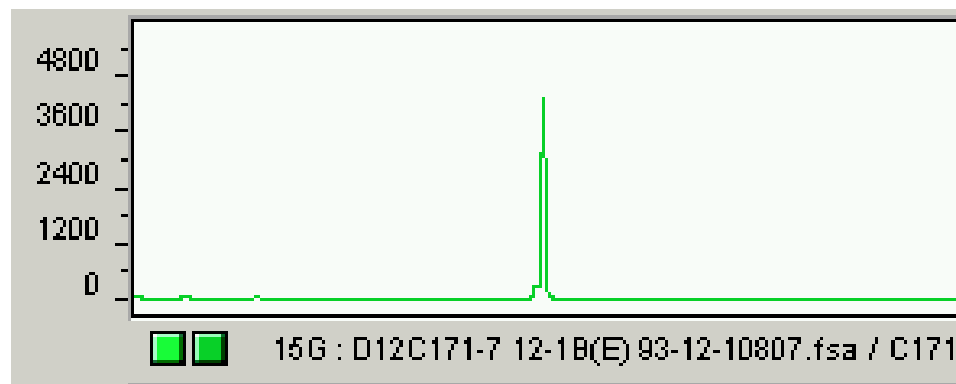
# Kontaminace



-A

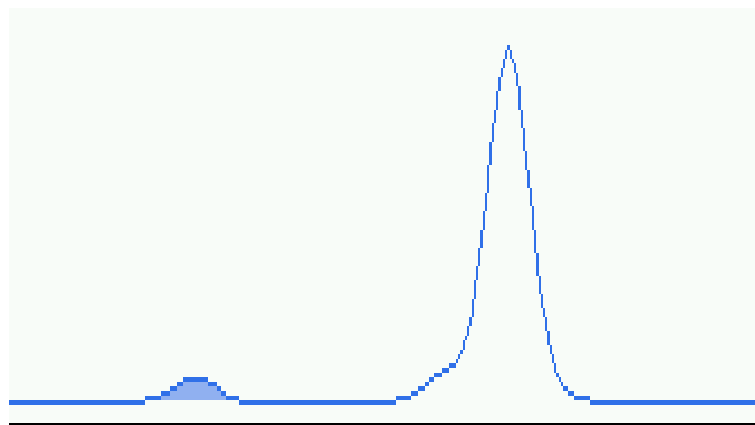
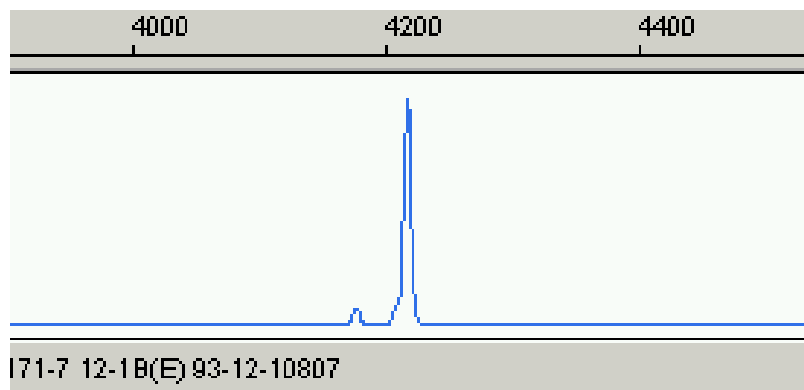
## Pík bez adeninu

- Nedokonalé přidání beztemplátového adeninu (adeninu z pilnosti)





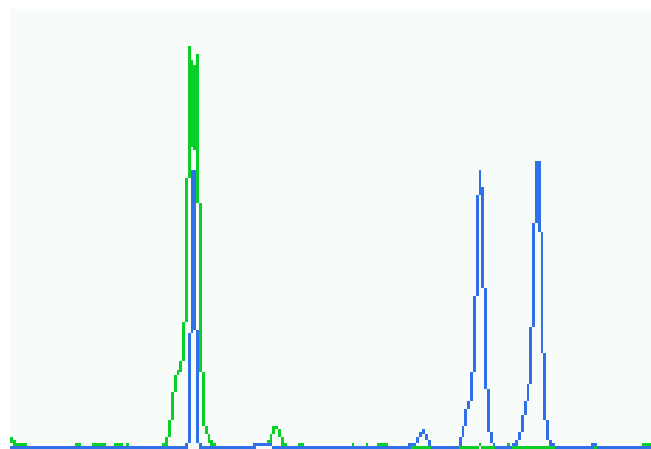
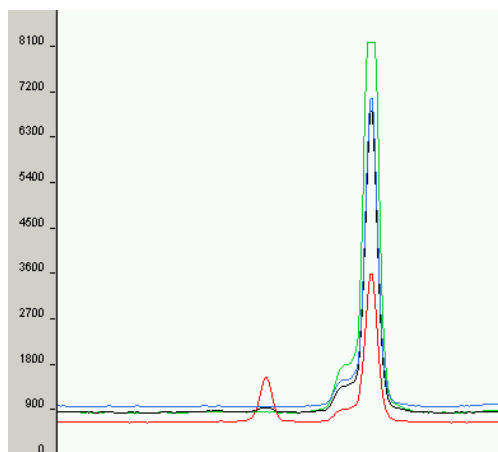
# Prokluz polymerázy (stutter)



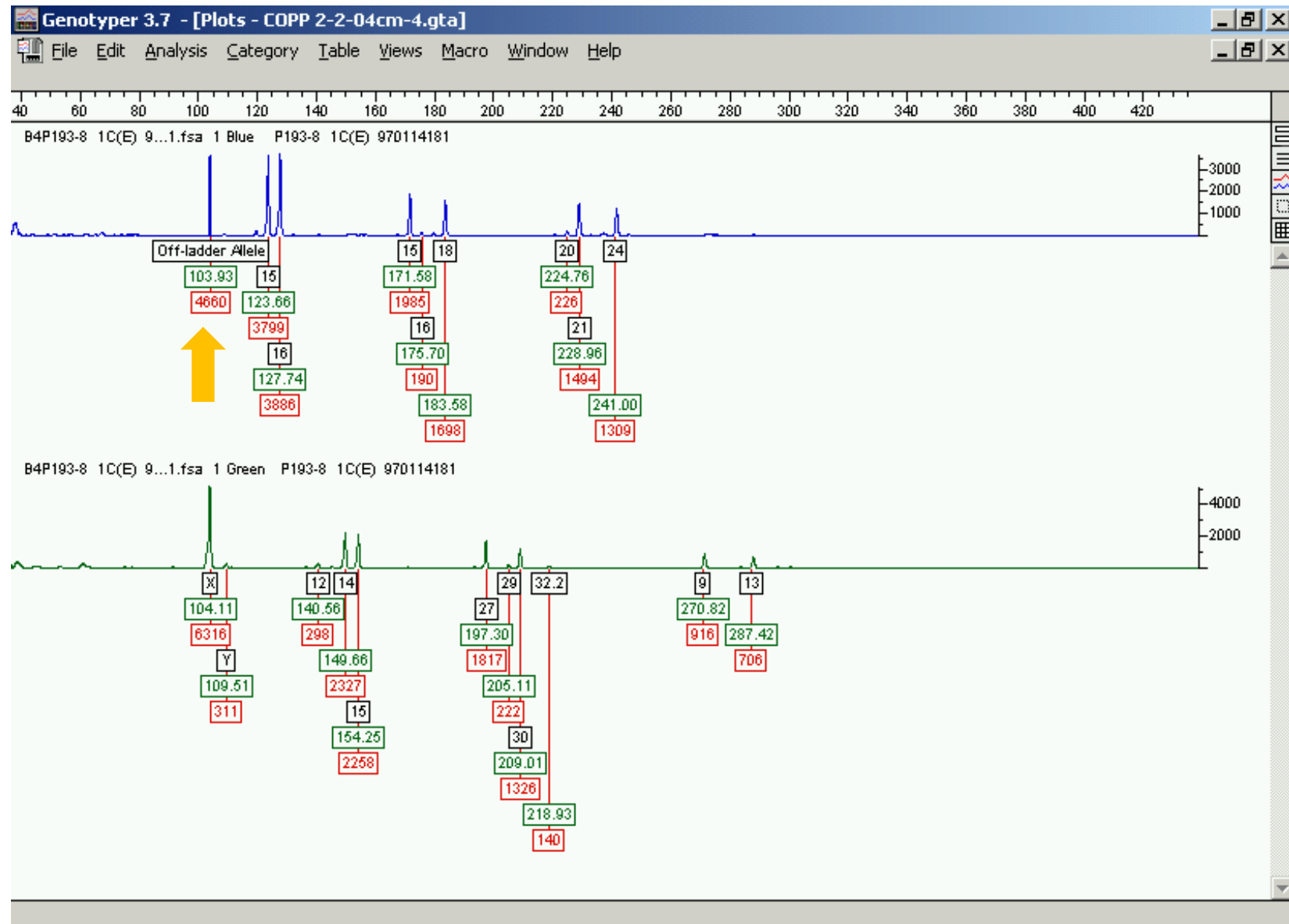


## Přetečení (pull-up)

Nedokonalá softwarová filtrace spektrálního překryvu fluorescenčních barviček v detekčním systému.



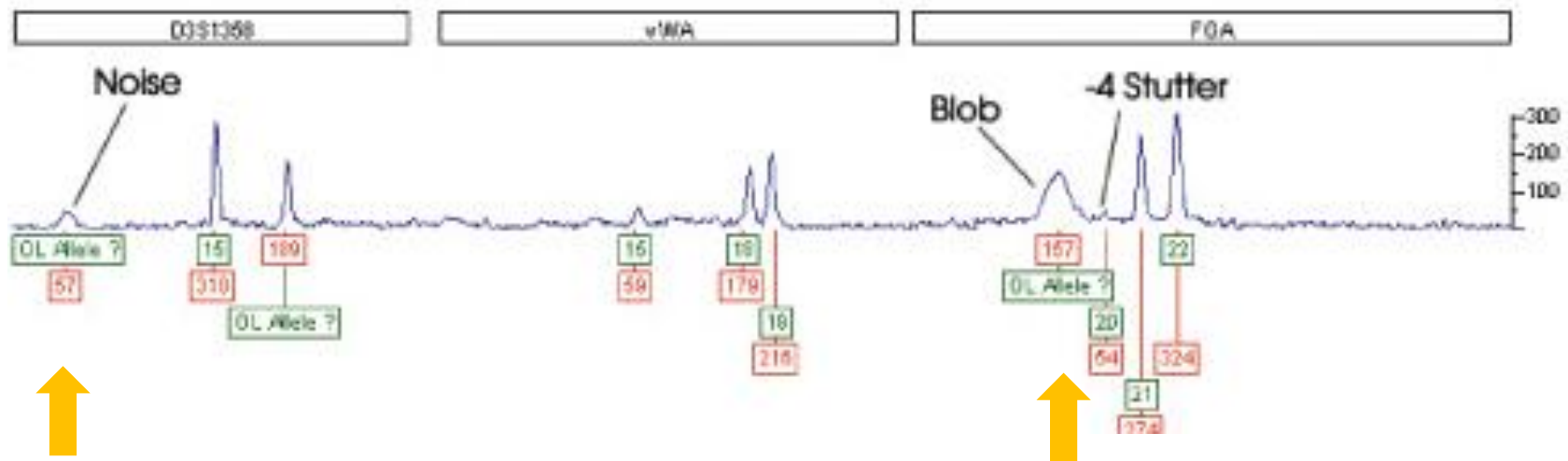
# ...přetečení







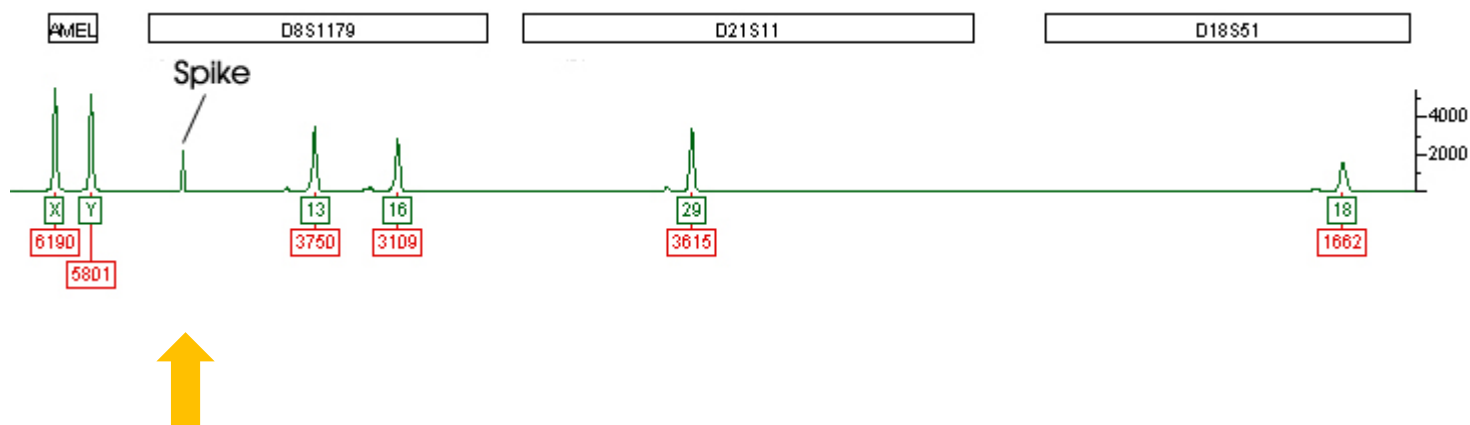
# Šum (noise) a kaňky (dye blobs)



<http://www.bioforensics.com>



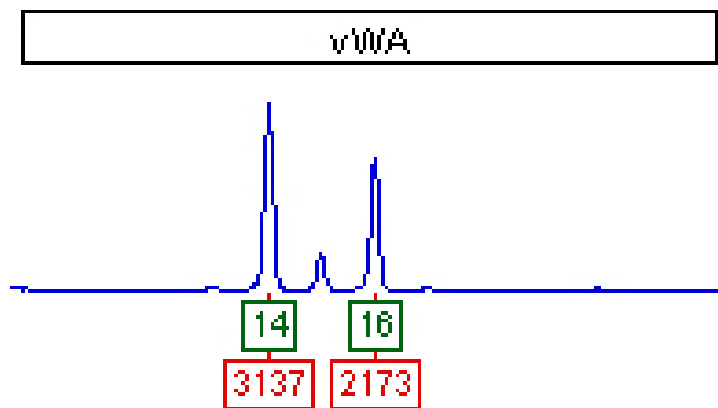
# Elektrický výboj (spike)



<http://cafe419.daum.net/>



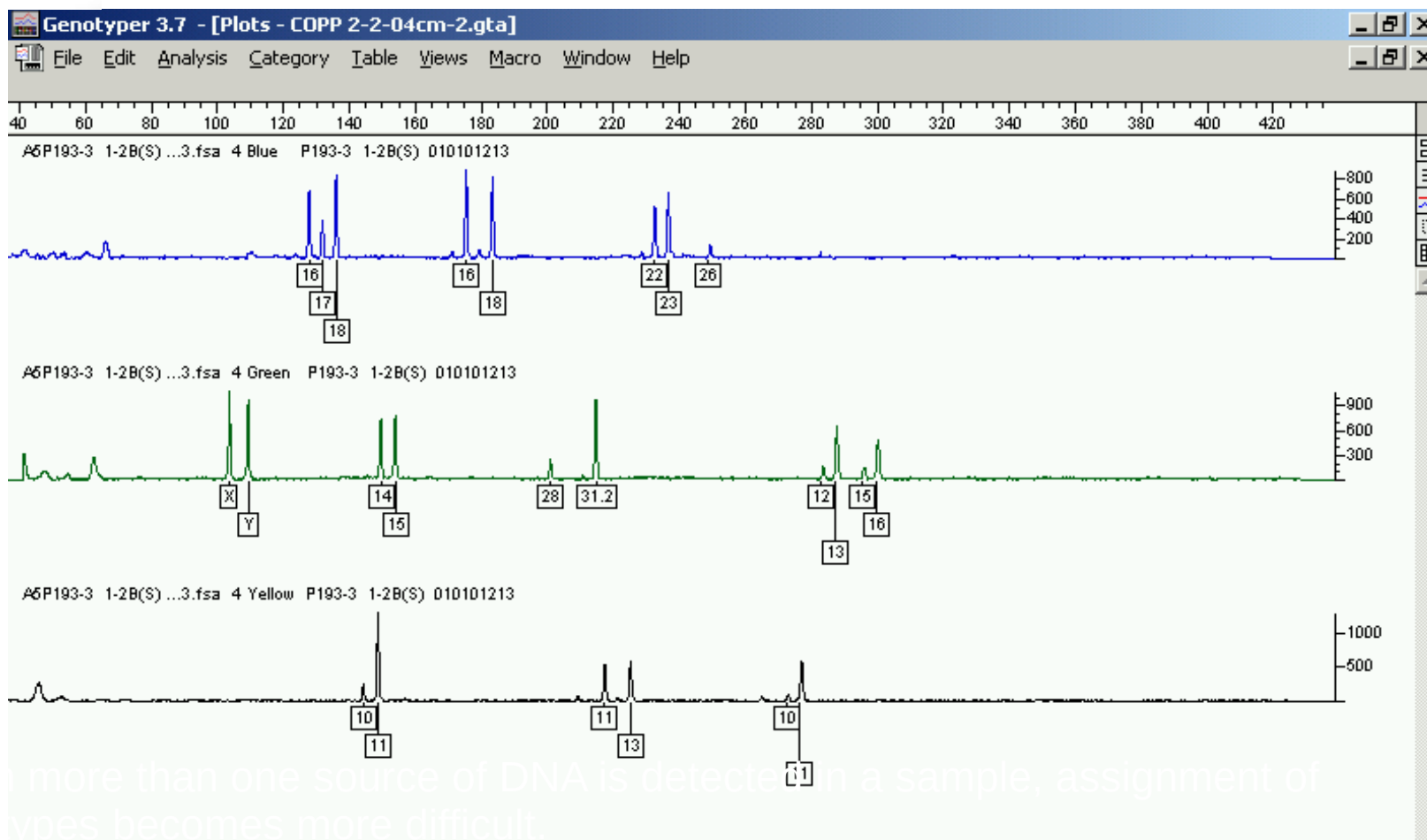
# Nevyvážené píky



<http://cafe419.daum.net/>



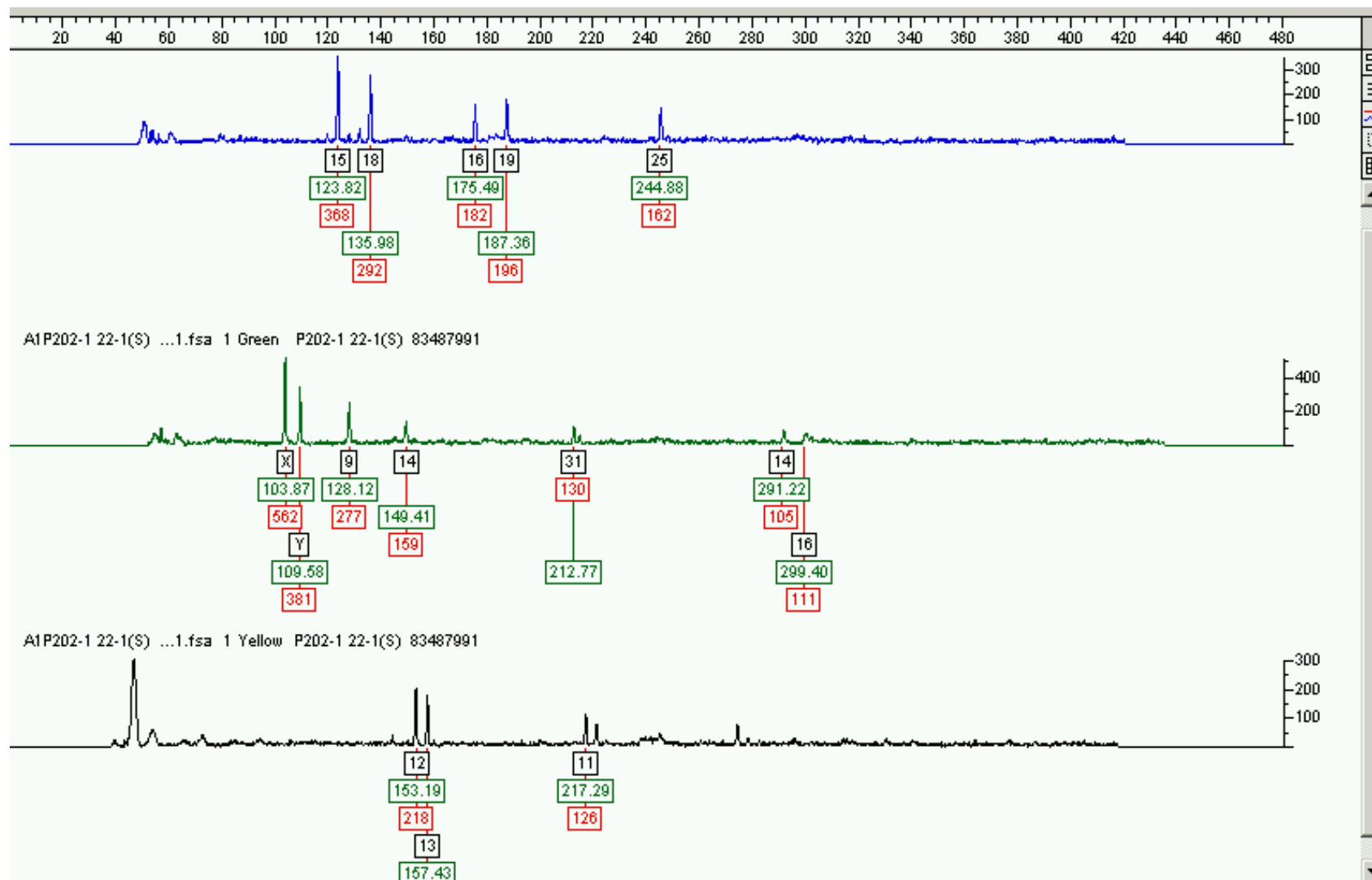
# DNA směsi



Na více lokusech jsou více než dva píky



# Degradované stopy



ski slope, allele drop out, allele drop in

# Interpretace



- Principy
  - Pro zhodnocení nejistoty tvrzení je nutné zvažovat nejméně jedno alternativní tvrzení.
  - Interpretace je založena na otázce: Jaká je pravděpodobnost důkazu za předpokladu platnosti tvrzení?
  - Interpretace je podmíněná nejen soutěžícími tvrzeními, ale také zarámováním do konkrétních podmínek.

# Interpretace

- Jedná se o důkaz, který podporuje verzi obžaloby nebo verzi obhajoby?
- Jak silný je to důkaz?



# Síla důkazů se vyjadřuje věrohodnostním poměrem

Pravděpodobnost důkazu (DNA profilů vyšetřovaných osob) za předpokladu prvního tvrzení (první verze, první hypotézy, verze obžaloby)

---

Pravděpodobnost důkazu za předpokladu druhé verze (verze obhajoby)

Verze (hypotézy) se navzájem vylučují.

•Pozn.: Nevypadá to záludně, ale často se plete, co je hypotéza a co důkaz.



# Logický trik: záměna podmínky a důsledku

Tvrzení, že  $P(\text{důkazu}/H) = P(H/\text{důkazu})$ , což není pravda

Př.1:  $P(\text{zvíře má čtyři nohy}/\text{zvíře je pes}) \neq$

$P(\text{zvíře je pes}/\text{zvíře má čtyři nohy})$



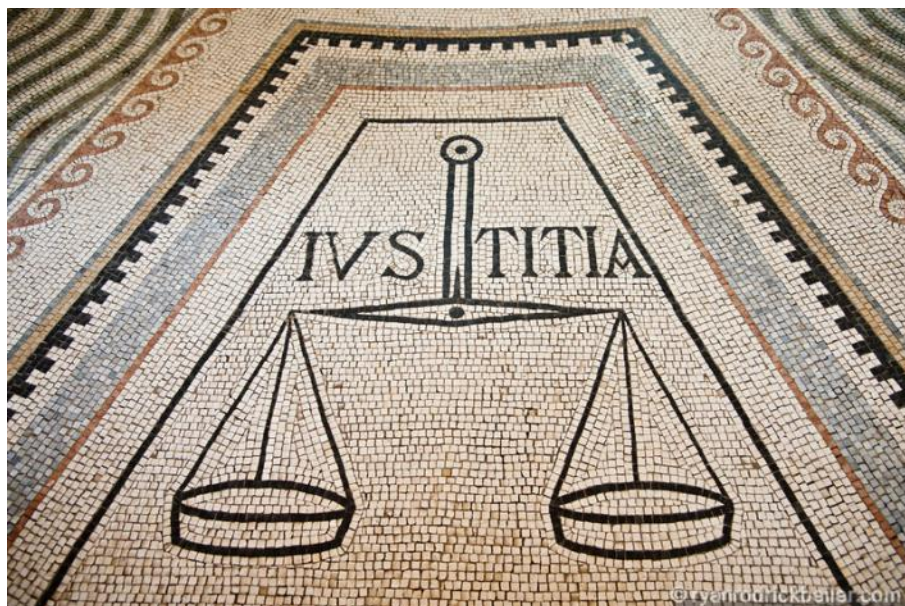
# Soud za pomoci znaleckého posudku určuje,

- jaká je pravděpodobnost, že nevyloučený nařčený
  - je biologickým otcem dítěte - probanda
  - spáchal souzený zločin

## ...a provádí to podle Bayesovy věty

Aposteriorní podíl šancí = apriorní podíl šancí x  
věrohodnostní poměr

Jednotlivé důkazy se skládají



<http://www.ryanrodrickbeiler.com>



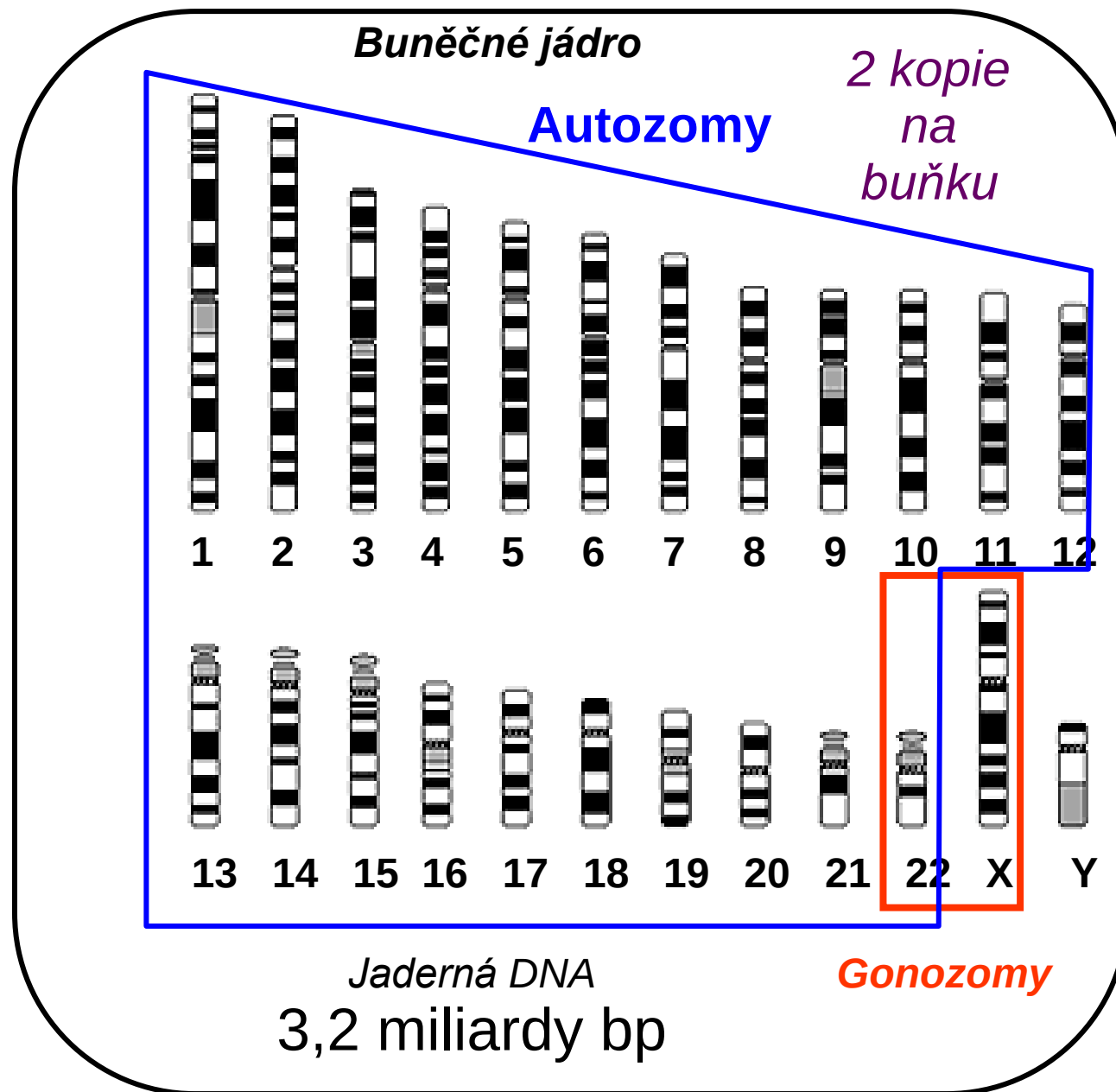
# Jenom soud nakonec

- ... rozhoduje, zda tato pravděpodobnost dostačuje pro vynesení rozsudku „vinen“ nebo zda je žalovaný vyloučen z kruhu podezřelých.
- Pozor: stopa na místě činu nemusí znamenat „vinen“, nepřítomnost stopy na místě činu nemusí znamenat „nevinen“.

## Další typy markerů

- mtDNA
- Y-STRs
- SNPs

# Lidský genom: 23 párů chromozomů + mtDNA



**Mitochondrie**  
(přítomny  
v cytoplasmě  
v mnoha kopiích)

mtDNA  
16,569 bp

**Mitochondriální  
DNA**

**Stovky kopií mtDNA  
v mitochondrii**

# Mitochondriální DNA (mtDNA)

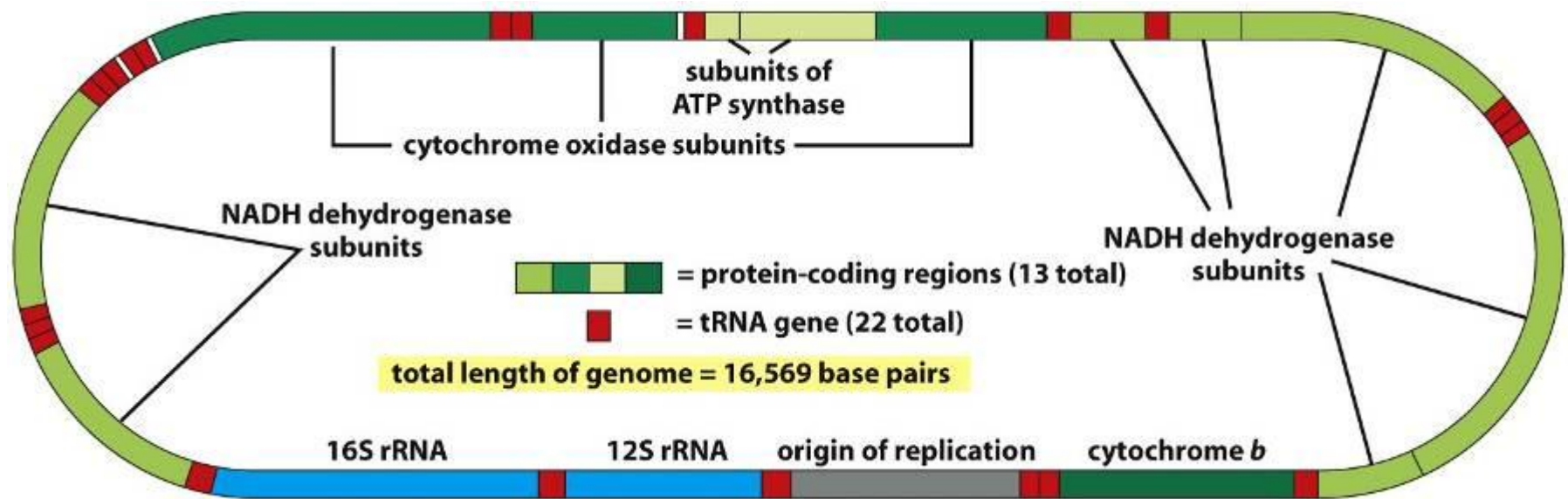


Figure 14-60 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



# Po přeslici, matrilineárně, matroklinně

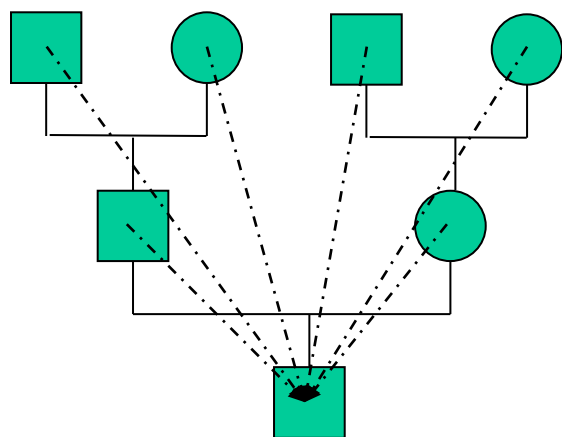


<http://www.old-picture.com/europe/Spinning-Spinner-Irish-Wheel>



# Srovnání dědičnosti markerů

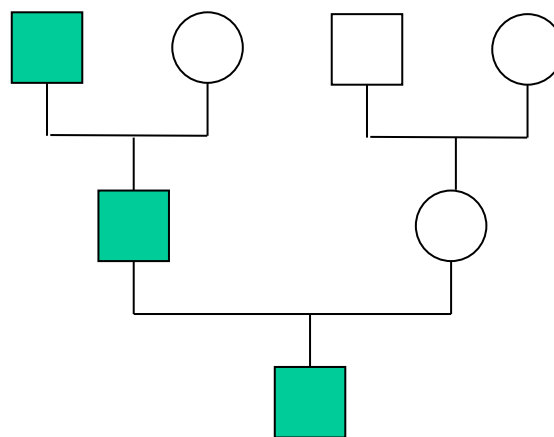
## CODISové STR markery



### Autozomy

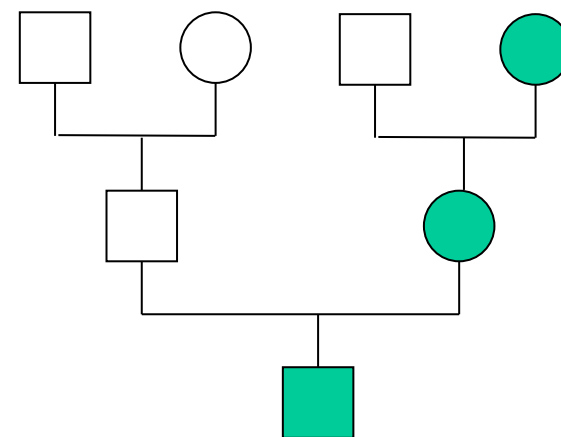
(přenáší se z generace na generaci od otce i od matky polovina)

## Rodokmenové markery



### Chromozom Y

(přenáší se z generace na generaci vše, ale jen z otce na syna)



### mtDNA

(přenáší se z generace na generaci vše, ale jen matkami)

# Mitochondriální DNA (mtDNA)

- Výhody
  - Citlivost na úrovni jediné buňky, protože každá buňka má stovky mitochondrií a každá mitochondrie má desítky mtDNA
  - Použitelné i u vlasů, spálených těl
- Nevýhody
  - Riziko kontaminace
  - Heteroplazmie
  - Matroklinní dědičnost
  - Sekvenování metodou volby
  - Kvalita databází

# Y-STRs

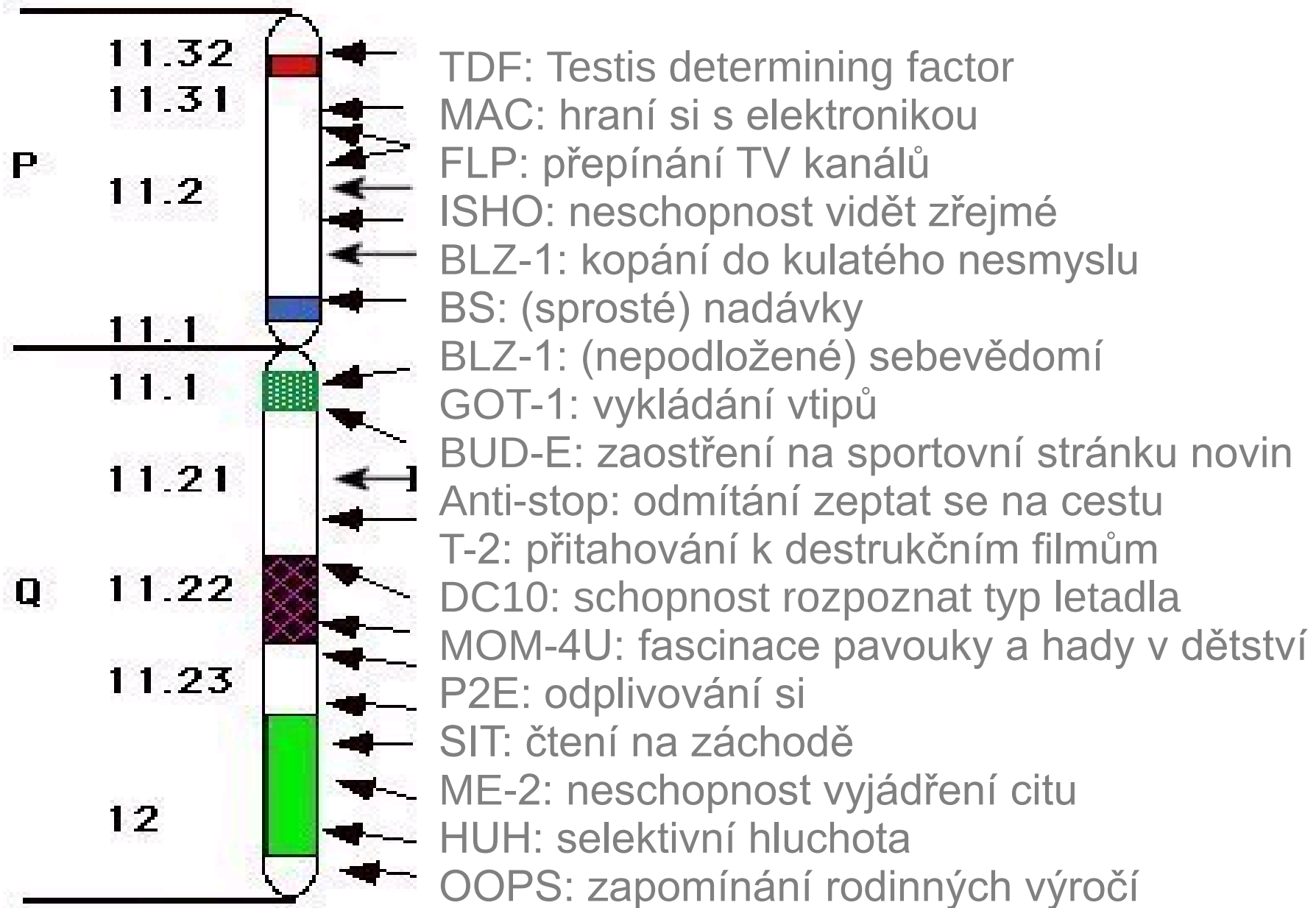
- Výhody
  - Testováním znaků přítomných jen v mužském biologickém materiálu lze řešit problém směsí po znásilnění, kde je ve stopě víc ženského materiálu
- Nevýhody
  - Jednotlivé markery jsou ve vazbě, vytvářejí haplotyp
  - Nižší diskriminační síla (wicked uncle Ernie, Čingischánův haplotyp C3)



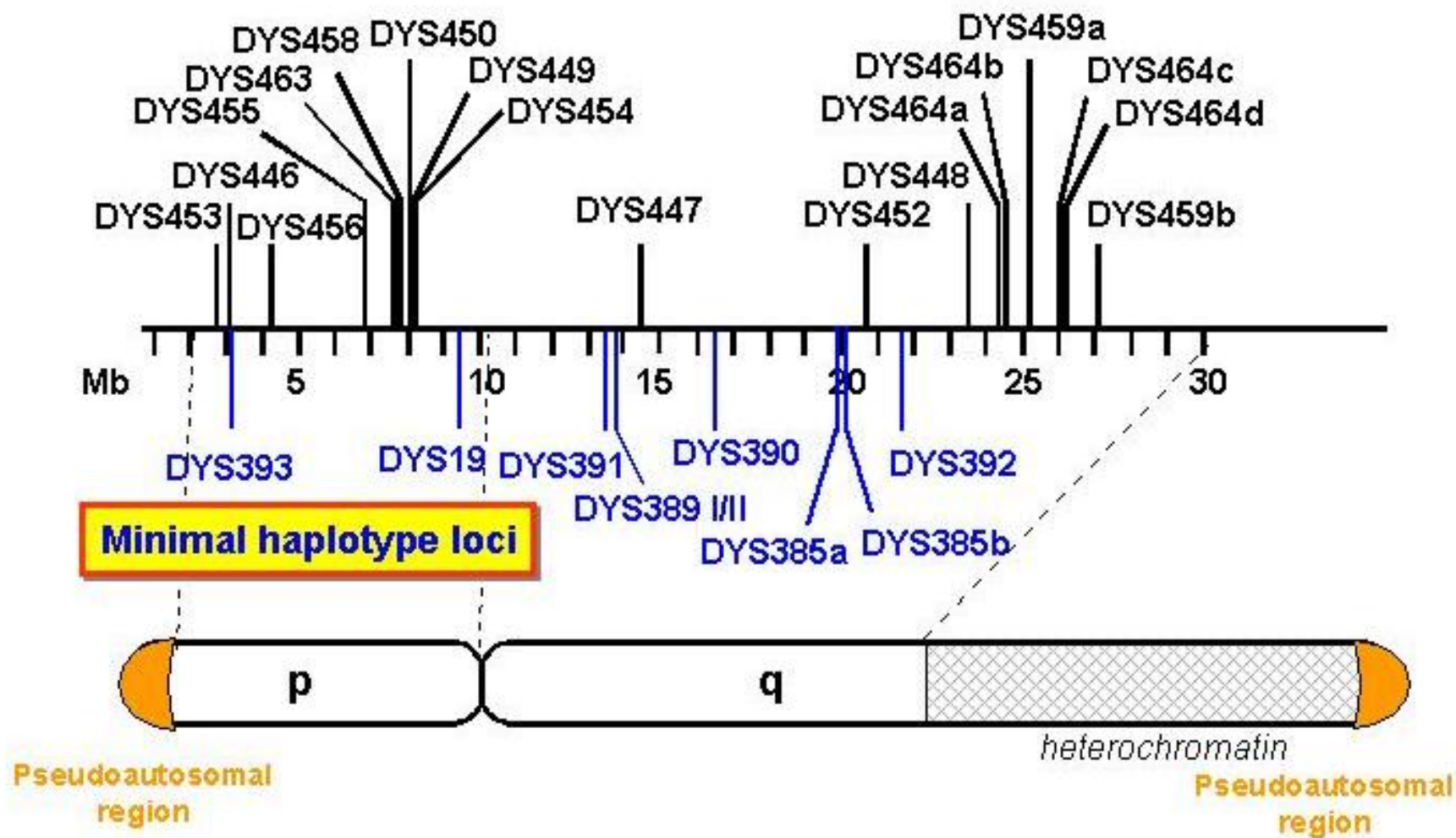
# Po meči, patrilineárně, agnátsky



# Genetická mapa chromozómu Y



# STR markery na chromozomu Y

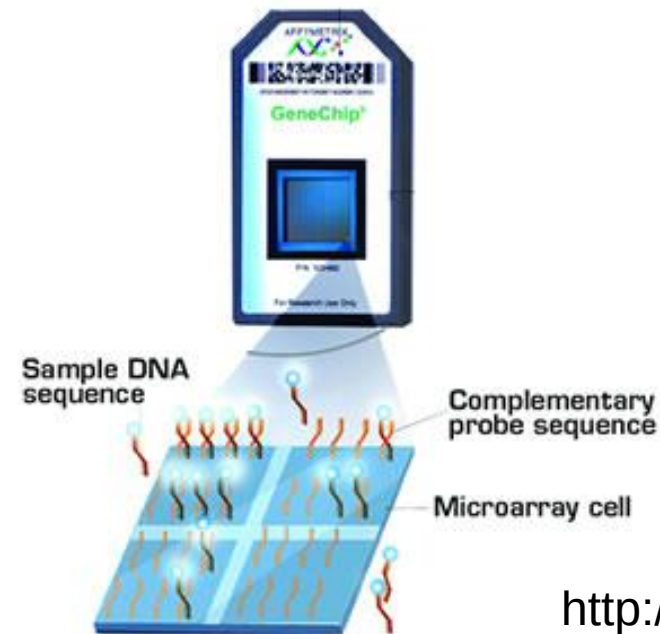


# Pro nadšence

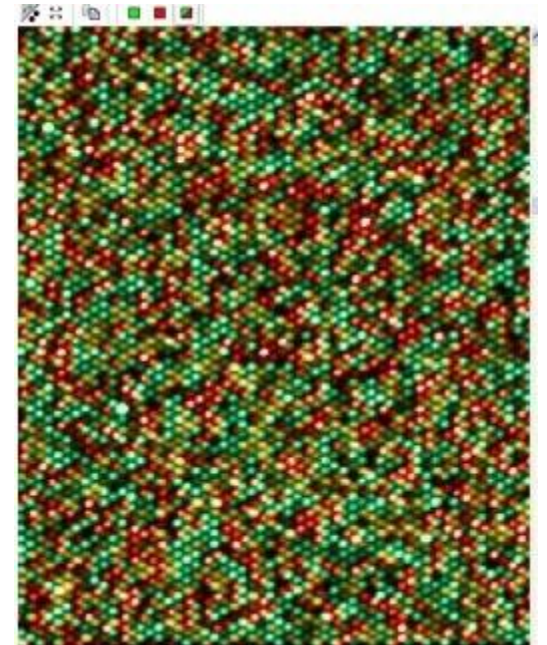
- [www.ysearch.org](http://www.ysearch.org) (chromozóm Y)
- [www.mitosearch.org](http://www.mitosearch.org) (mtDNA)
- [www.dna.ancestry.com](http://www.dna.ancestry.com)

# Bodové mutace - Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

- Záměna jednoho nukleotidu (A, C, T, G) za jiný
- dbSNP Database of Short genetic variation  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- Detekovány mikročipovou technologií



<http://www.hematology.org/>





# SNPs

- Výhody
  - Snadná automatizace
  - Milióny jednotlivých markerů
- Nevýhody
  - 50 SNPs poskytuje diskriminační sílu stejnou jako 15 STR
  - Nelze použít u směsí
  - Vyžaduje více DNA
  - Některé SNP mají diskriminační potenciál pro určení etnicity a jsou asociovány s nemocemi
  - Nejsou ve forenzních databázích

# Poděkování

- CZ.1.07/1.1.00/14.0016
- Lída Zajoncová, John Butler, Harry Klann, Carl Matthies etc.
- Vám za pozornost!