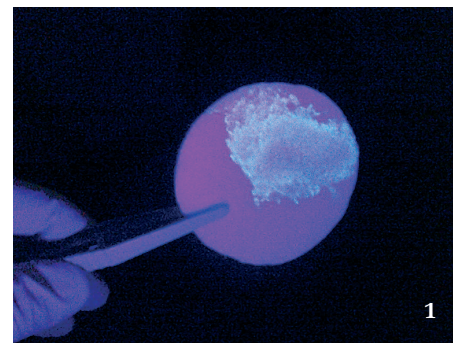


Genetika jako identifikační nástroj ve službách kriminalistiky



Tradiční oblastí, ve které se uplatňuje věda v právním prostředí, jsou rekonstrukce, jež se snaží stanovit, co se stalo, kde, kdy a kdo se podílel. Pokud používáme nějakou vědeckou disciplínu také pro zodpovězení otázky proč, z jakého důvodu k události došlo, přidáváme adjektivum forenzní (česky = soudní), což znamená, že zjištěné poznatky mohou být přijatelné jakožto důkazní prostředek pro soudní dvůr. Aplikaci poznatků z oboru molekulární biologie a genetiky pak nazýváme forenzní genetikou.

Forenzní genetika je jako vědní obor poměrně mladá. Na rozdíl od jiných kriminalistických disciplín, jako je trasologie, mechanoskopie nebo elektrochemie, známe přesně den a místo jejího zrodu. Vznikla v pondělí 10. září 1984 v laboratoři pro studium DNA Aleca Jeffreysa na univerzitě v Leicesteru. Metoda rozlišení osob na základě analýzy DNA byla v následujícím roce publikována v prestižním vědeckém časopise Nature pod názvem Hypervariable minisatellite regions in human DNA (Hypervariable minisatellite oblasti v lidském genomu) a dodnes byl tento článek více než 2 660× citován. Díky této převratné metodě se nejprve podařilo určit identitu malého chlapce z Ghany a poté byla v r. 1986 objasněna vražda dvou mladých dívek v britském hrabství Leicestershire.

Zavedení analýzy DNA převratným způsobem zlepšilo schopnost forenzních labo-

ratůř jednoznačně identifikovat jednotlivce. Sérologické metody, které se používaly téměř od počátku 20. stol., sice dokázaly určit krevní skupinu osoby, od níž pocházel biologický materiál, či stanovit, zda jde o lidský vzorek, ale rozhodně nebylo možné hovořit o individuální identifikaci. První genetické analýzy prováděné v policejních a soudních laboratořích byly založeny na metodice RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – délkové polymorfismy restrikčních fragmentů). Tento postup měl však řadu omezení, zejména z hlediska časové náročnosti, použití radioaktivních sond a citlivosti. Pomocí této metody bylo možné zpracovat pouze biologické stopy, ze kterých by se dalo získat alespoň 500 nanogramů DNA, tím byl velmi omezen rozsah použití. Technologický pokrok v oblasti molekulárně biologických metod přinesl za posledních

1 Vzorek spermatu po ozáření UV světlem fluoreskuje. Uvedeného jevu se využívá při vyhledávání tohoto typu biologických stop. Foto z archivu autora

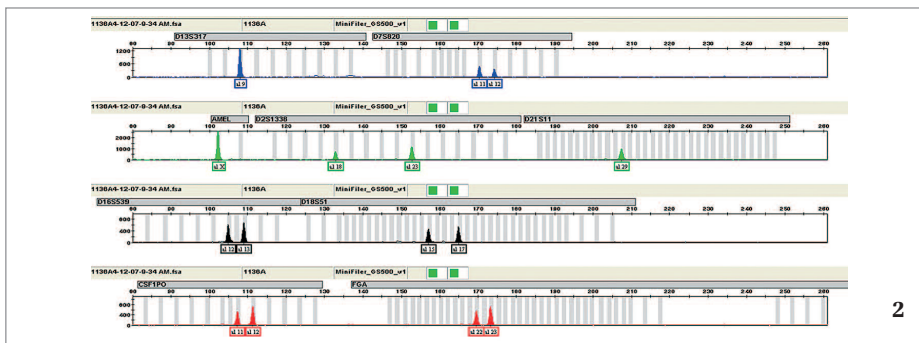
2 Příklad softwarově zpracovaného výstupu ze sekvenátoru. Jednotlivé polymorfnní oblasti jsou definované barvou a velikostí píků. Získaný profil DNA může sloužit pro identifikaci osoby, od níž pocházel biologický materiál, popř. lze porovnáním profilů DNA zjistit příbuzenský vztah. Orig. z archivu autora

20 let mnohá vylepšení v procesu analýzy DNA pro identifikační účely a v současné době je možné rutinně zpracovávat vzorky s koncentrací pouhých 50 pikogramů DNA (jde přibližně o DNA z 9 lidských buněk). Technologie využívající PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) a polymorfnní oblasti STR (Short Tandem Repeat – krátké tandemové repetice) jsou sice extrémně citlivé, přinášejí ale také spoustu problémů s kontaminací, ať už během zajišťování vzorků na místě činu, při transportu nebo při zpracování v laboratoři.

Metody analýzy DNA nabízejí ve srovnání s dřívějšími systémy mnoho výhod. Jednou z nich je, že tyto testy jsou založeny přímo na genetickém materiálu jedince, tedy na DNA. Sérologické a proteinové testy zjišťovaly genový produkt a mohly být proto pouze nepřímým odrazem složení

Tab. 1 Schéma běžné analýzy krátkých tandemových repetit (STR, blíže v textu) jaderné DNA z forenzních stop

Úkon	Poznámka
Zajištění vzorku na místě činu	Pokud není nalezen vhodný vzorek, nelze metody analýzy DNA použít
Transport do laboratoře	Během transportu musí být vzorek zabezpečen před nepříznivým působením fyzikálních, chemických a biologických vlivů
Sérologické průkazy krve, spermatu, slin	Sérologickými metodami lze vyhledat místa s výskytem tělních tekutin a provést orientační a specifické testy
Odběr pro analýzu DNA	Z předmětů zaslaných na zkoumání se odebírají v laboratoři vzorky pro analýzu DNA
Izolace DNA	Ze vzorků biologického materiálu se získává čistá DNA
Kvantifikace DNA	Zjišťuje se kvalita (stupeň degradace) a koncentrace izolované DNA
Multiplexová PCR	Amplifikace (namnožování) polymorfnních oblastí lidského genomu
Fragmentační analýza	Namnožené amplikony (fragменты DNA vzniklé amplifikací určité oblasti v genomu) STR jsou separovány v sekvenátoru podle elektroforetické mobility
Analýza výsledků ze sekvenátoru	Získaná data se musí normalizovat pomocí vnitřního standardu (molekulové hmotnosti fragmentů DNA známé délky) a dále se porovnávají se vzorkem obsahujícím známé alely daného STR lokusu; podle míry shody jsou zkoumaným píkům přiřazeny číselné hodnoty odpovídající alelám ze standardu známých alel (tzv. žebříčku). Výsledkem je profil DNA
Analýza databáze	Profil DNA je vložen do databáze a porovnán s ostatními záznamy
Statistika	Shoda mezi profily DNA musí být statisticky vyhodnocena
Znalecký posudek	Výsledky analýzy DNA pro soudní účely se většinou zpracovávají ve formě znaleckého posudku
Uložení stop a vzorků	Vzorky a stopy se musí uložit pro případné další nezávislé ověření správnosti analýzy



2

DNA. Metody DNA se vyhýbají jakýmkoli komplikacím s dominancí a recesivností. DNA je také stabilnější než proteiny a je ji možno identifikovat dlouho po smrti, např. u egyptských mumií (Pääbo 1985, Lawlor 1991) nebo dokonce u vyhynulých mamutů (Johnson 1985). Protože se nachází téměř ve všech buňkách lidského těla, může testovaný materiál pocházet z jakéhokoli zdroje buněk. Z forenzního hlediska je velice důležité, že individuální variabilita v DNA je mnohem větší, než může být odhalena pomocí sérologických a proteinových markerů, a proto je velice nízká pravděpodobnost, že by dvě nepřibuzné osoby měly shodný profil DNA (Weir a Buckleton 1996).

Po prvotním opojení, kdy soudy okamžitě přijímaly výsledky této metodiky, byly DNA metody a výsledky získané jejich použitím někdy odmítány jako nevěrohodné. Ačkoli většina soudů důkazy na základě analýzy DNA přijímala, soudy vyšší instance změnilы výsledek několika známých procesů, a to s odůvodněním výskytu nedostatků v testování DNA. Během tohoto období se značně zlepšily technické standardy forenzního testování DNA a databáze používané pro statistické vyhodnocení nalezené shody se staly rozsáhlejšími a reprezentativnějšími. Protože komunita forenzních genetiků striktně dbá na kvalitu své práce (např. Presley 1996) a publikovala mnoho ověřovacích studií, jež zkoumají chování identifikačních souprav v limitních situacích, jako je podkritické množství DNA, přítomnost inhibitorů PCR reakce, degradovaná DNA apod. (např. Schumm 1996), staly se techniky analýzy DNA obecně přijatelnými pro soudy. V r. 1996 došel americký National Research Council ve své studii k závěru, že stav DNA identifikačních technologií a metod pro odhad frekvencí a statistické vyhodnocení postupily do bodu, kdy přijatelnost správně shromážděných a analyzovaných dat nemůže být zpochybněna.

Jak probíhá forenzní analýza DNA?

Proces forenzní identifikace biologického materiálu zajištěného na místě činu zahrnuje celou řadu kroků, které na sebe navazují a jejichž bezchybné provedení je nezbytné pro získání věrohodných výsledků. U některých je nutné, aby analytik správně rozhodl, např. vybral vhodnou metodu izolace DNA z buněk. Chyba při rozhodování může vést k falešně negativním nebo falešně pozitivním výsledkům, a to zejména u mikroskopických stop, kde není možné použít zlaté pravidlo o ponechání nejméně poloviny stopy nebo vzorku pro ověření výsledku.

Tab. 2 Typy vzorků a průměrný výtěžek DNA. Každá diploidní lidská buňka obsahuje ~6,6 pg DNA.

Optimální množství DNA pro jednu polymerázovou řetězovou reakci (PCR) je 0,5–1 ng.

Typ vzorku	Množství jaderné DNA
Tekutá krev	20 000–40 000 ng/ml
Krevní stopa 1 cm ²	200–500 ng
Krevní stopa 1 mm ²	2–5 ng
Seminální tekutina (sperma)	120 000–300 000 ng/ml
Postkoitální poševní výtěr	10–3 000 ng/stěr
Vytržený vlas s kořínkem	1–700 ng/vlas
Vypadlý vlas s kořínkem	0,1–12 ng/vlas
Sliny	až 5 000 ng/ml
Moč	1–20 ng/ml
Kost	nejvýše 10 ng/mg
Tkáň	50–500 ng/mg
Ústní stěr	100–2 000 ng/stěr

Jaké vzorky je možné v laboratoři pro DNA zpracovat?

Takřka všechny buňky lidského těla obsahují genetickou informaci ve formě jaderné DNA. Výjimkou jsou zralé červené krvinky, které postrádají jádro a nejsou proto pro forenzní analýzu DNA použitelné. V laboratoři je zpracovatelný jakýkoli vzorek biologického materiálu, z něhož lze získat dostatečné množství DNA. V tab. 2 jsou uvedeny nejběžnější typy zpracovávaných vzorků a množství jaderné DNA, jež z nich lze získat. Data jednoznačně dokazují, že běžné stopy obsahují dost materiálu pro celou škálu genetických analýz. Pokud se laboratoři nepodaří získat z takových, optimálně zajištěných stop dostatek materiálu, jde spíše o důkaz nesprávného provádění laboratorních úkonů. Zpracovatelné jsou ale třeba i fragmenty vlasů bez kořínku. I když tento typ vzorků neobsahuje jadernou DNA, je možné provést analýzu sekvence D-smyčky (místo, kde začíná replikace) mitochondriální DNA. Pro forenzní účely využitelná oblast DNA-smyčky je přibližně 1 050 bází dlouhá. Výsledná informační hodnota je sice mnohem nižší než při stanovení profilu DNA v autozomových STR systémech, ale výsledek lze použít k jednoznačnému vyloučení osob, od nichž nemohl biologický materiál pocházet.

Při zpracování většího množství vzorků je možné vyhodnotit úspěšnost analýzy DNA pro jednotlivé typy vzorků a v případě zaznamenání větší negativní odchylky od předpokládaných dat je nutné zjistit příčinu. Samozřejmě je úspěšnost přímo úměrná podmínkám uložení stopy od doby vzniku do okamžiku zpracování v laboratoři. Rozhodující je také zvolení správných metod zpracování a používání odpovídající přístrojové techniky. Většina laboratoří DNA dosahuje téměř 100% účinnosti při práci s běžnými vzorky, jako je např. tekutá krev nebo stěr sliznice ústní dutiny. V případě obtížně zpracovatelných vzorků, jako jsou kosti, moč nebo vzorky tkáně fixované formalínem a zalité v parafínu však můžeme zaznamenat odlišnou úspěšnost různých pracovišť.

Forenzní genetik a školství

Forenzní genetik není dosud v rámci vysokých škol v ČR akreditována jako samostatný studijní obor nebo zaměření. Podle dostupných informací probíhají semestrální přednášky tohoto předmětu pouze na katedře antropologie a genetiky člověka Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Informace o forenzní genetice jsou zařazeny také do některých předmětů na 2. lékařské fakultě UK a na Policejní akademii. Zcela výsadní postavení mezi středními školami má pražské Gymnázium Nad Alejí, kde byla v rámci projektu Genetika do škol aneb biologie trochu jinak vybudována první standardní středoškolská laboratoř pro DNA. Studenti mají možnost provádět sami praktická cvičení z genetiky a třeba se na krátký čas stát forezními vědci, jež s pomocí základních molekulárně-biologických metod řeší otázku „Kdo je vinen?“. Kromě kriminalistických případů se studenti zabývají i úlohami zaměřenými na odhalení genetických modifikací rostlin, transformaci bakterií, detekci protilátek pomocí testů ELISA nebo barvení různých typů buněk (doplňující informace o tomto projektu najdete na www.EDUGEN.cz).

Research. Together.

Výukové kity v oblasti molekulární biologie a genetiky

BIO-RAD

Bio-Rad spol. s r.o., Ned Oštrovem 1119/7, 147 00 Praha 4
bio-rad@bio-rad.cz, 241 430 532