

Profilování DNA

doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.
Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
LF UP a Fakultní nemocnice Olomouc



Cíl lekce

- Po této lekci byste měli:
 - znát vlastnosti DNA a genů
 - vědět, jak zjistit dědičné rozdíly mezi lidmi
 - znát postup genotypizace
 - znát diskriminační schopnost DNA.

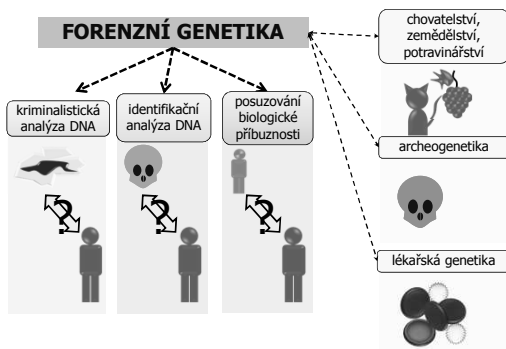
Osnova přednášky

- Genom
- Nepřímé a přímé testy
- Požadavky na genotypizační vyšetření
- Kdy se DNA profilování používá
- Procesní kroky DNA profilování

Historie

- 1920 Lansteiner (1901): krevní zkouška ABO
- 1930 další krevní systémy (Rh, Kell a Duffy)
- 1970 HLA
- 1980 Wyman AR, White R: RFLP marker
- 1985 Jeffreys A: multilokusové sondy pro minisatelity
- 1985 Mullis K: PCR
- 1988 FBI a DNA
- 1991 Edwards A: STR a mapování
- 1995 anglická databáze UK DNA
- 1998 americká databáze CODIS
- 2001 česká kriminalistická DNA databáze
- 201? český DNA zákon

FOREZNÍ GENETIKA



Mgr. Halina Šimková

DNA analýza

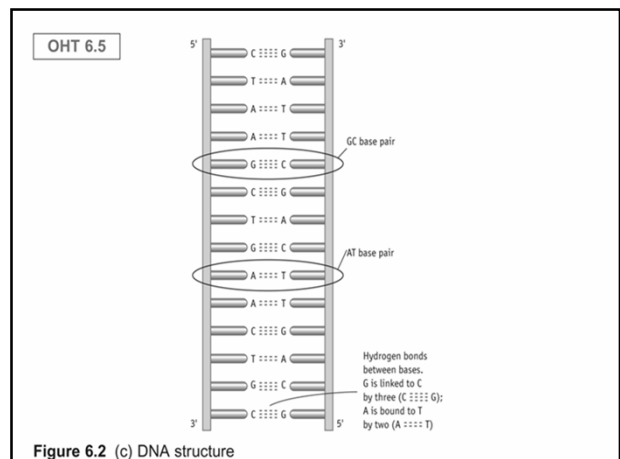
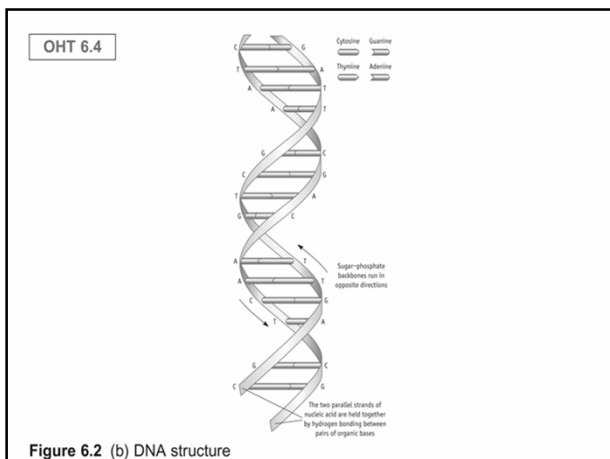
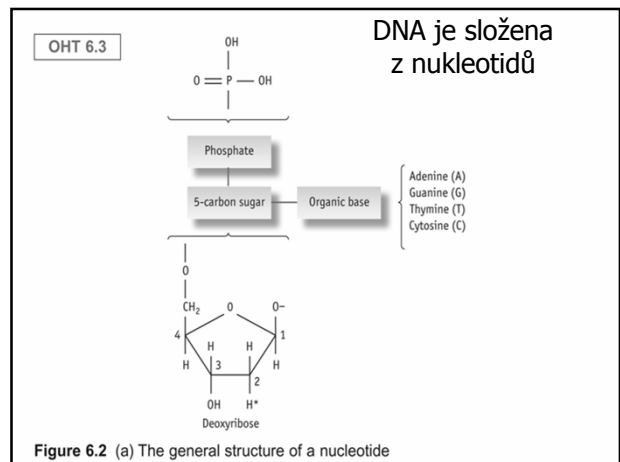
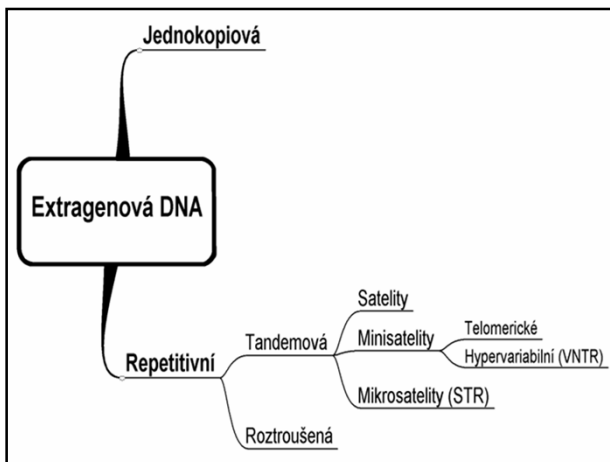
- Vysoká diskriminační schopnost
- Malé nároky na vzorek
 - každá buňka má stejný genom
- Malé nároky na odběr
- Standardní, citlivé metody
- Databáze
- Pravděpodobnostní modely.

Lidský genom

- Všechny molekuly DNA, které se vyznačují replikací a dědí se na potomstvo
- Kompletní soubor genů jedince, lokalizovaných v jádře (1n)
- $3 \cdot 10^9$ nukleotidů
- Geny a genové sekvence
- Extragenová DNA

Geny a genové sekvence

- Kódující oblasti
- Introny, promotory, pseudogeny, genové fragmenty



Nepřímé DNA testy

- Dva významy: 1. testování na úrovni proteinu vs 2. testování formy genu dle blízkého markeru na úrovni DNA
- Příklady pro 1. význam
 - Krevní skupiny (ABO, MNSs, Rh, Kell, Duffy, Kidd)
 - Proteiny krevní plasmy (PLG, Gm/Km, C3, Tf, Pi, Hp, Gc)
 - Enzymy červených krvinek (PGM, GPT, ACP, AK, ADA, EsD, PGD)
 - Major Histocompatibility Complex, HLA (HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1, -A, -B, -C).

HLA-DQA1

Různé úrovně rozlišení: sérologie → 7 alel → 23 alel

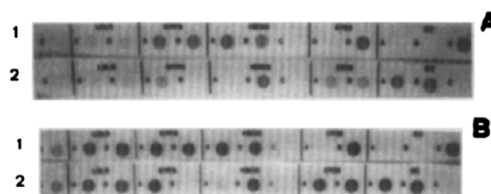
*010101/2	*030101	*0504
*010201/2	*0302	*0505
*0103	*0303	*060101/2
*010401/2	*040101/2	
*0105	*050101/2	
*0106	*0502	
*0201	*0503	

Přímé DNA Testy

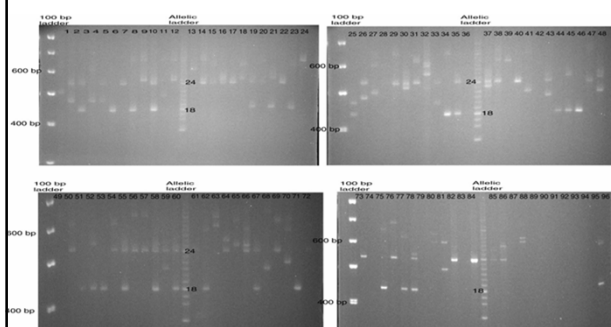
- Testování na úrovni DNA
 - RFLP
 - Multilokusové minisatelitové sondy
 - Polymarker
 - VNTR (např. D1S80)
 - STR
 - SNP
 - WGS.

Polymarker

- Multiplexní PCR (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC)
- Dotblot – hybridizace se sondami



VNTR D1S80



Restrikční štěpení

- Při analýze RFLP
- Molekulární nůžky



Restriktáza rozpoznávající „je“

DNA je totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



sonda



DNA

totiž dlouhá molekula, která

nustě namotaná.

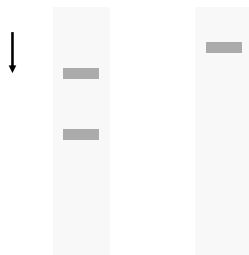
Druhá alela

totiž dlouhá molekula, která je hustě namotaná.

sonda

ztráta restriční místa

Výsledek po elektroforéze, přesátí a hybridizaci



RFLP

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

Satelity

Satelity jako text (restrikce)

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

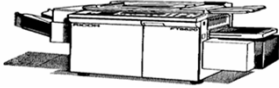


Alela 3: DNA je totiž dlouhá, dlouhá, dlouhá molekula, která je hustě namotaná.



Satelity 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.



Satelity jako bloky



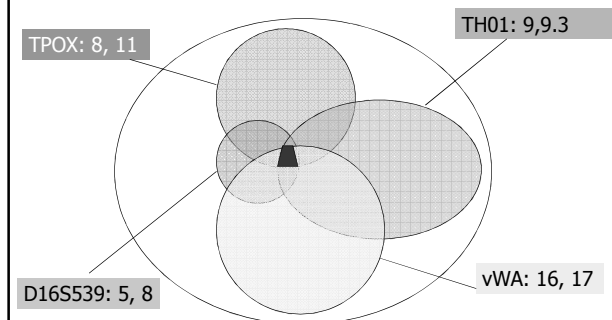
Sekvence mikrosatelitu TH01

```
TTATTTCCCTCATTCA TTCATTCA  
TTCATTCA TTCACCATggAgTCTg
```

Výhody mikrosatelitů

- Velká diskriminační schopnost

Mikrosatelity



Výhody mikrosatelitů

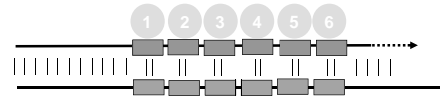
- Velká diskriminační schopnost
- Kompetitivní cena
- Snadná interpretace (ve srovnání s VNTR)
- Standardnost a zároveň rozmanitost
- Slučování testů (multiplexing)
- Citlivost (<1 ng DNA), směsi a degradované vzorky
- Používané mikrosatelity nejsou ve vazbě s nemocemi.

Zvláštnosti detekce mikrosatelitů

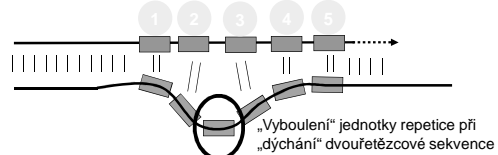
- Prokluz polymerázy
 - koktavé, zadržlé proužky (stutter)
- Extra adenin
- Mikrovarianty
- Nulové (tiché) alely

Prokluz

Bezchybná replikace



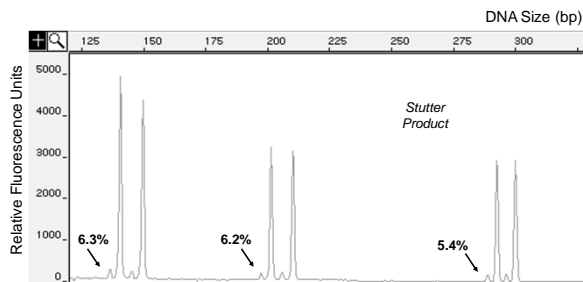
Chybová replikace s prokluzem



Walsh et al (1996) *Nucleic Acids Res.* 24: 2807-2812

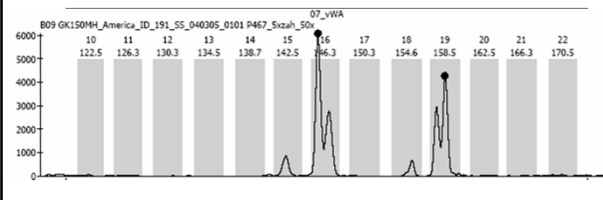
Zadržlé píky

Na horizontální elektroforéze vytváří amplicon proužky, při kapilární elektroforéze s laserovým odečtem vytváří vrcholy elektroferogramu.



Adenin z pilnosti

- Taq polymeráza přidává ještě jeden adenin navíc

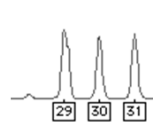


Mikrovarianty

- Alely, které nemají přesný násobek jednotky repetice anebo mají některou jednotku repetice s jinou sekvencí než ostatní
- Indel, záměna nukleotidu, 3 alely na osobu

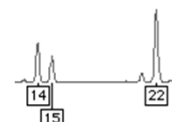
Tři alely na osobu

D21S11



Stejná výška vrcholů

D18S51

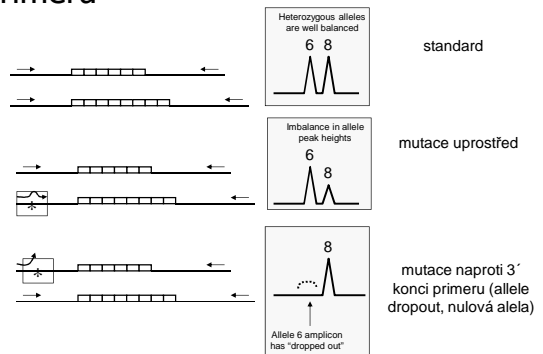


Součet výšek dvou vrcholů je roven výšce třetího vrcholu

Nulové alely

- Alely, které naší metodou nejsme schopni otypovat
- Polymorfismus v místě vazby primeru

Nulová alela: mutace v místě vazby primeru



Příklady mikrosatelitů

- Názvy: D3S1358
 - „D“ znamená, že není součástí genu
 - „3“ číslo chromosomu
 - „S“ jedinečná sekvence v rámci genomu
 - „1358“ identifikační číslo
- D3S1358: alely 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20
- Historické názvy – před konvencí
 - CSF1PO: 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15
 - TH01: 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11
 - TPOX: 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13

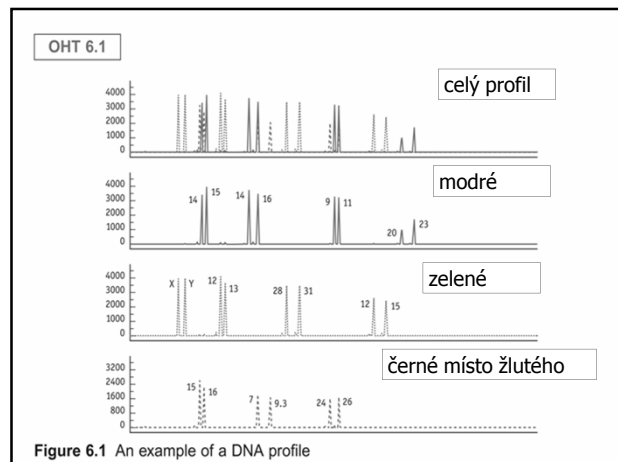
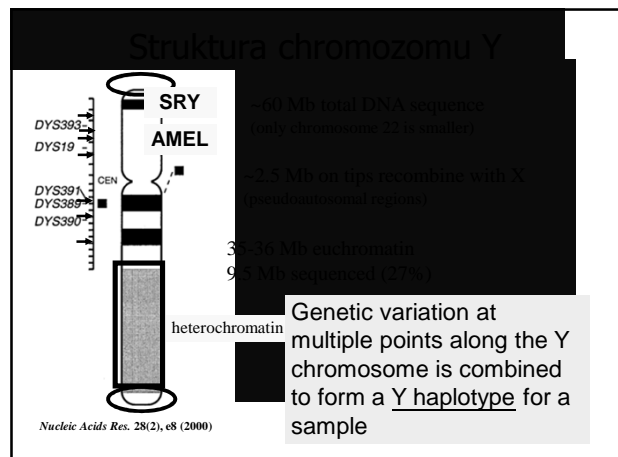


Figure 6.1 An example of a DNA profile

Chromozom Y

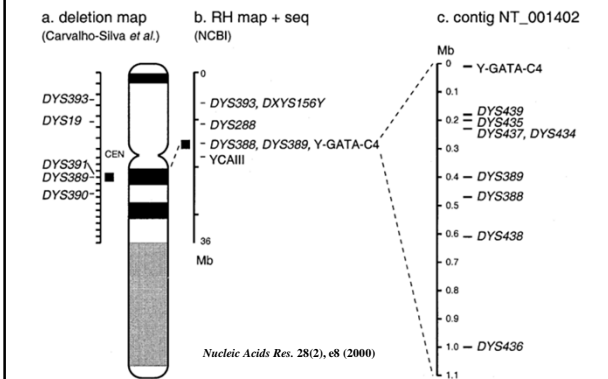
- Po meči
- Příjmení
- Nerekombinuje
- Znásilnění
- Cohen, Lemba, Jefferson T., „rodinné“ projekty



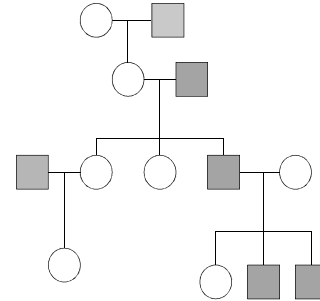
Genetic variation at multiple points along the Y chromosome is combined to form a Y haplotype for a sample

Nucleic Acids Res. 28(2), e8 (2000)

STR markery na chromozomu Y



Rodokmen se znaky na chromozomu Y



Mitochondriální DNA

- Kruhová, 16 569 bp
- Více mitochondrií na buňku, více kopií mtDNA na mitochondrii
- Bez reparačního systému
 - heteroplazmie
- Andersonova (cambridgská) sekvence
- Variabilita v D-loop (1000 bp)
 - HV1 a HV2 hypervariable regions (300 bp každý)
- Po přeslici (selektivní destrukce mužských mitochondrií v oplozeném vajíčku)
- Romanovci, hrob neznámého vojína (26 let po zabití ve Vietnamu identifikován jako Michael J. Blassie)
- Sekvencování, minisekvencování
- Cytochrom b pro rozlišení druhů.

OHT 6.17

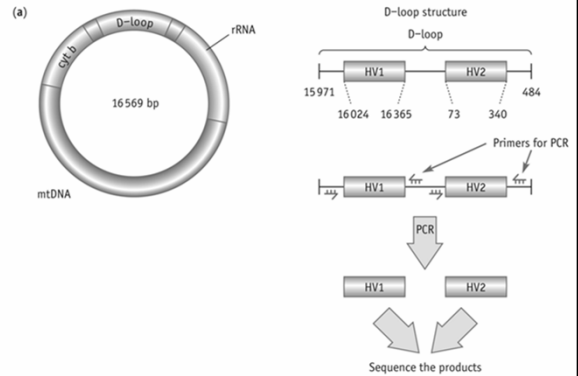


Figure 6.9 Mitochondrial DNA (mtDNA) (a) structure and analysis

OHT 6.18

(b) Maternal inheritance of mitochondria

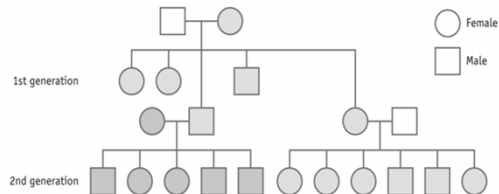
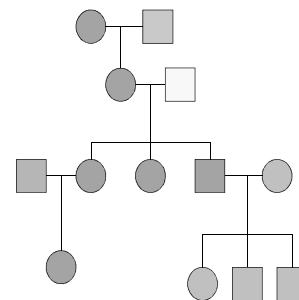


Figure 6.9 Mitochondrial DNA (mtDNA) (b) inheritance

Rodokmen s mtDNA



Zjednodušený zápis mtDNA sekvenčního výsledku

	16111	16126	16169	16261	16264	16278	16293	16294	16296	16304	16311	16357
Andersonova sekvence	C	T	C	C	C	C	A	C	C	T	T	T
Mitřvé tělo 1	T					T	G		T/A	C		
Mitřvé tělo 2			T	A								
Mitřvé tělo 3	T					T	G			C		
Přibuzný	T					T	G			C		

	73	146	195	263
Andersonova sekvence	A	T	T	A
Mitřvé tělo 1			C	G
Mitřvé tělo 2			C	G
Mitřvé tělo 3			C	G
Přibuzný			C	G

heteroplazmie

Požadavky na genotypizační vyšetření

- Mendelistická dědičnost
- Hardy-Weinbergova rovnováha
- Vysoká diskriminační schopnost
- Nízká frekvence mutací
- Neměnnost genu, nezávislost na prostředí
- Metodická robustnost

Genetika má obecné zákony

Mendelistická dědičnost

- Zákon o jednotce dědičnosti
 - Dědičné vlastnosti jsou určeny nedělitelnou jednotkou informace (genem), která má různé formy (alely)
- Zákon dominance
 - Alely jsou u každého jedince v páru, ale účinek jedné alely může být překryt jinou alelou
- Zákon segregace
 - Během tvorby gamet se každý pár alel rozejde (oddělí), takže libovolná gameta nese pouze jednu alelu z každého páru. Páry alel se obnovují při fertilizaci.
- Zákon volné kombinovatelnosti
 - Různé geny řídí různé fenotypické znaky a alely různých genů se kombinují navzájem nezávisle.

Výjimky mendelistické dědičnosti

- Na pohlaví vázané geny
- Mitochondriální dědičnost
- Vazba
- Multifaktoriální dědičnost
- Expanze trinukleotidových repeticí (dynamické mutace)
- Genomový imprinting
- Neúplná penetrance

OHT 6.9

Gamety jsou haploidní

For simplicity, only one chromosome is shown.

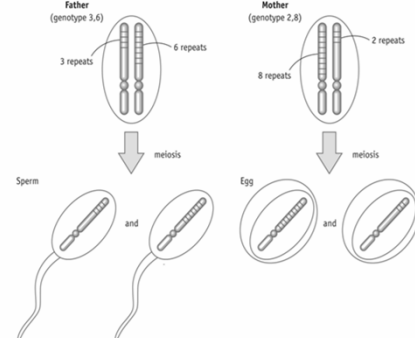
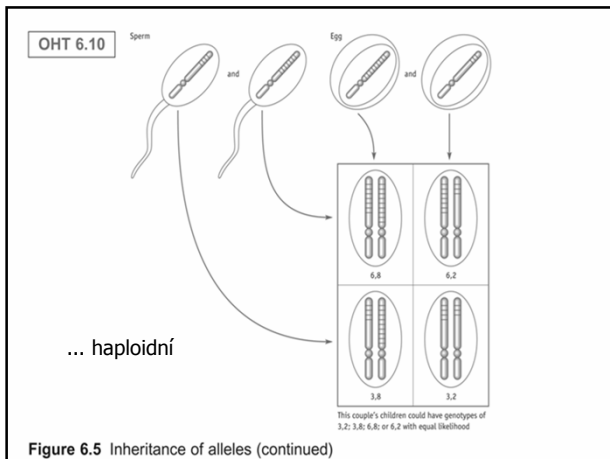


Figure 6.5 Inheritance of alleles [to be continued on next slide]



Hardy Weinbergova rovnováha (HWE)

- Vzorec popisující populaci v rovnováze
- Za splnění určitých podmínek (panmixie, velká populace, není migrace populace) se po jedné generaci fixují genotypové frekvence jako funkce alelických frekvencí.

Hardy Weinbergova rovnováha

Počet alel	Názvy alel	Frekvence alel	Frekvence genotypů <i>Genotypy</i>
2	P, Q	p, q	$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ <i>PP+PQ+QQ</i>
3	P, Q, R	p, q, r	$(p+q+r)^2 = p^2 + 2pq + 2qr + 2pr + q^2 + r^2$ <i>PP+PQ+QR+PR+QQ+RR</i>
4	P, Q, R, S	p, q, r, s	$(p+q+r+s)^2 = p^2 + 2pq + 2qr + 2pr + 2ps + 2rs + 2qs + q^2 + r^2 + s^2$ <i>PP+PQ+QR+PR+PS+RS+QS+QQ+RR+SS</i>

Mutace

- Změna v DNA sekvenci
 - v zárodečné linii
 - somatická.

Frekvence mutací a rekombinací

- SNP, indel M: $1/10^8$ meióz
- Mikrosatelity M: $1/10^3$ meióz
- Minisatelity MR: $1/10^2$ meióz
- HLA R: $1/10^2$ meióz

Low copy number (LCN), Low template DNA (LTDNA)

- Malé množství DNA, které při standardním postupu poskytuje nespolehlivé výsledky se stochastickými efekty
- Zvýšení citlivosti pomocí zvýšení počtu cyklů PCR
- 1981 zavražděna 14-tiletá Marion Crofts ve Fleet, Hampshire, UK; 2002 Tony Jasinskyj odhalen a odsouzen jako násilník
- 1995 John Anthony Cook se vykálel po vraždě, Birmingham, UK; 2002 odhalen a odsouzen.

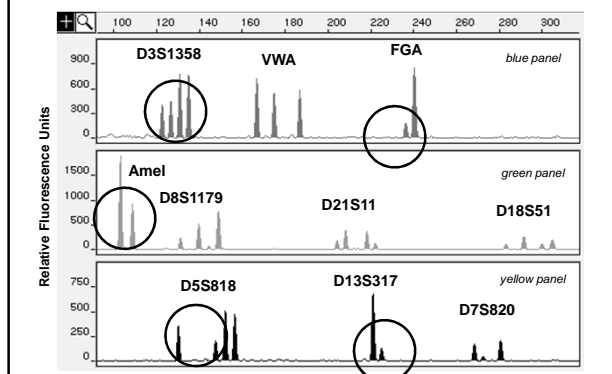
Případ Joseph Kappen

- 1973 znásilněny a zavražděny 3 šestnáctileté slečny v Jižním Walesu
- 2001 low copy number DNA
 - úplná shoda nebyla nalezena v databázi
 - neúplná shoda může ukazovat na příbuzného vraha (nalezeno 100 potenciálně příbuzných)
 - v roce 1991 Joseph Kappen zemřel na rakovinu plic
 - 2002 exhumace potvrdila shodu.

Vývoj ohledně LCN/LTDNA

- LCN/LTDNA by se neměla ve forenzně-genetické praxi používat (Budowle)
- Vs.
- Ke stochastickým efektům dochází i při dostatečném množství DNA ve vzorku, proto by se k LCN/LTDNA mělo přistupovat stejně jako k jiným vzorkům nebo opačně: i k vzorkům s dostatečným množstvím DNA by se mělo přistupovat stejně přísně, jako k LTDNA (Gill)
 - Expertní systémy (STRmix, TrueAllele)

Směs



Neměnnost genu, nezávislost na prostředí - nesplňují

- Expanze trinukleotidových repeticí (dynamická mutace)
- TCR, imunoglobuliny

Metodická robustnost

- Množství vzorku
- Kvalita vzorku
- Stabilita v čase
- Obrátkovost

Kontrola kvality

Kontrola kvality DNA typizace

- Dokumentace od prvního kroku (získání stopy)
 - každé otevření zkumavky je před svědky a zapsáno
- Dodržování antikontaminačních opatření
- Pozitivní a negativní kontrola při každé analýze
- Kontrola softwarového určení délky a přiřazování jmen alel k délkám ampliconu
- Použití objektivních standardů
- Účast v externí kontrole kvality (zaslepené vzorky)
- Expertní systémy
- Akreditace dle normy ISO17025.

Kdy se DNA profilování používá?

- Identifikace (ztotožnění)
 - kriminální případy: důkaz a podezřelý
 - historické a evoluční studie
 - určení živočišného druhu, posmrtného stadia zmizelé osoby
 - ztracené osoby, hromadná neštěstí: puzzle
 - vojenská psí známka
 - databáze zločinců
 - vyšetření rodičovství, příbuznosti.

Kognátní případy

Kriminální případy

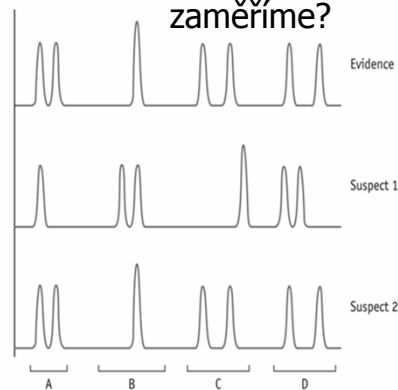
Otázky



- Je to důkaz pro anebo proti podezřelému?
- Jak silný je to důkaz?
- Otázku „Který podezřelý to byl?“ odpovídá soud

OHT 6.2

Na kterého podezřelého se zaměříme?



Hromadná neštěstí

- Letecké havárie
- WTC
- Tsunami

Tsunami

- 26.12.2004
- 228 429 obětí
- Identifikace obětí
 - označit číslem
 - věci na sobě (hodinky, řetízky, mobil)
 - tetování
 - chrup
 - pitva (s RTG)
 - DNA
- Faktory
 - tropické počasí
 - cena (Čiřani zdarma?)
 - management
 - referenční materiál (celé rodiny)

Předchozí neštěstí o stejné škále

- Irák 1985: 180 000 Kurdů
- Irák 1992: 150 000 Šiitů
- DNA analýza?

Forezní zpracování DNA

- Získání vzorku
- Izolace a kvantifikace DNA
- Namnožení pomocí PCR
- Elektroforéza
- Detekce a určení genotypu
- Interpretace, výpočet, referování výsledku
- <http://projects.nfstc.org/pdi/>

Každý krok je důležitý

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

O. J. Simpson

- Orenthal James „O. J.“ Simpson, s přezdívkou „džus“ je bývalý hráč amerického fotbalu a odsouzený kriminálník.
- V roce 1985 se dostal do Síně slávy amerického fotbalu a slavil úspěchy jako herec a sportovní komentátor
- V roce 1995 byl v trestním soudním procesu the People vs Simpson osvobozen z obvinění, že zavraždil svou bývalou manželku Nicole Brown Simpson a jejího přítele Ronalda Goldmana
- V roce 1997 byl v civilním soudním procesu shledán vinným. Jako trest měl zaplatit 33,5 milionů \$, což zatím neučinil.
- V roce 2007 byl zatčen v Las Vegas, Nevada a obviněn z loupeže a únosu.
- V roce 2008 byl odsouzen k 33 letům vězení s možností být propuštěn na podmínku nejdříve po 9 letech. Sedí v the Lovelock Correctional Center in Lovelock, Nevada.

Získání vzorku

- Včasnost
- Značení
- Kontaminace
- Záměna (nechtěná, záměrná)
- Bezpečnost
- Kontrolní vzorky
- (viz ohledání)

Kontrolní vzorek

- Krev do EDTA (zdravotnické zařízení)
- Sliny: Oragene plivátko
- Bukální výtěr: štětečkem/kartáčkem SOBIMA nebo Bode
- (Ejakulát)

Odběr vzorků dřívě

- §42e odst.1 písm. e „policista je oprávněn u osob obviněných ze spáchání trestného činu, nebo u osob nalezených, po nichž bylo vyhlášeno pátrání a které nemají způsobilost k právním úkonům v plném rozsahu, odebírat biologické vzorky umožňující získat informaci o genetickém vybavení“, navíc zákon č.239/2000 Sb. o integrovaném záchranném systému
- Bukální stěr SOBIMA
- Vymahatelnost proti vůli dotyčné osoby - pokuta do 30 000 Kč (50 000 Kč při zajišťování stop trestného činu).

Odběr vzorků dnes

- Zákon 321/2006 Sb.
 - Oprávněnost násilných odběrů
 - Způsob překonání odporu musí být přiměřený jeho intenzitě
 - Obviněný nebo podezřelý musí být poučen dle §114 odst. 5 tr.ř. o oprávněnosti překonat odpor

Sběrná výbava

- Páska k ohraničení území
- Fotoaparát
- Tužky, papír, podložka pro nakreslení scény
- Jednorázové ochranné oblečení, masky, rukavice
- Baterka, laser, UV, infračervené světlo, lupa
- Pinzeta a vata
- Souprava pro otisky prstů (karty, argentorát, luminol, káfr, kyanokrylát, inkoust, páska)
- Souprava pro značení vzorků
- Souprava pro zviditelnění latentních stop (luminol)
- Souprava pro sběr biologických stop (štětečky, kartáčky, zkumavky)
- Souprava pro stopy po znásilnění
- Souprava pro odlévání stop (Lukopren)
- Hazmat souprava
- Sérologická souprava
- Entomologická souprava
- Papírové a plastové sáčky

Zdroj DNA

- Bílé krvinky
- Semeno
- Tkáň, zuby, kosti
- Výtěr bukální sliznice
- Kořínky vlasů a chlupů, nehty
- Žvýkačka, poštovní známka, zubní kartáček, špaček, balzám na rty, moč

Kvalita zdroje DNA

- Semeno > krev, vlasy s kořínky, vaginální sekret, nosní sekret > potní skvrny, moč > lupy, vypadané vlasy, lejno (mtDNA).

Izolace DNA

Postup

- Uvolnit DNA z jádra buňky
- Zbavit se
 - proteinů
 - tuků
 - RNA
 - inhibitorů PCR.

Trestné činy proti lidské důstojnosti v sexuální oblasti

- Zákon č. 40/2009 Sb., trestní zákoník, Hlava III
- § 185 Znásilnění
- § 186 Sexuální nátlak
- § 187 Pohlavní zneužití
- § 188 Soulož mezi příbuznými
- § 189 Kuplířství
- § 190 Prostituce ohrožující mravní vývoj dětí
- § 191 Šíření pornografie
- § 192 Výroba a jiné nakládání s dětskou pornografií
- § 193 Zneužití dítěte k výrobě pornografie
 - § 193a Účast na pornografickém představení
 - § 193b Navazování nedovolených kontaktů s dítětem
- Přitěžující: bezbrannost, závislost, finanční prospěch, postavení pachatele a z něho vyplývající důvěryhodnost nebo vliv, dítě mladší 15 let, se zbrání, způsobení újmy na zdraví nebo smrti, na místě s omezenou svobodou, nejméně se dvěma osobami, v organizované skupině, opětovně

Kontaminace

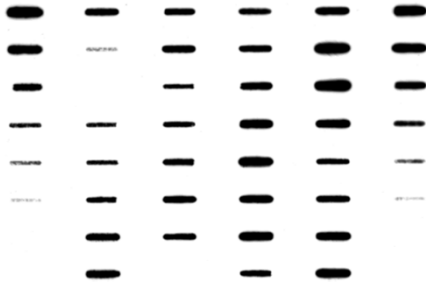
- Nutné zlo PCR laboratoře?



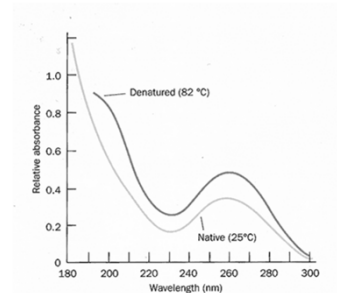
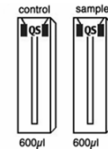
Kvantifikace DNA

- Změření množství a čistoty
- Inhibitory PCR
 - indigo
 - huminové kyseliny
 - hem
- Spektrofotometricky, fluorescenčně, kolorimetricky, qPCR.

Dot-blot radiograficky



Spektrofotometricky

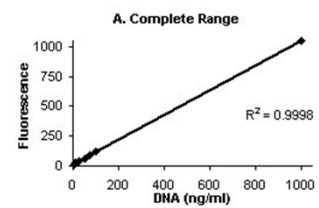


Spektrofotometricky

- Absorbance OD=1 při 260 nm v 1 cm kyvetě odpovídá 50 µg/ml dsDNA
- Poměr absorbcí A_{260}/A_{280} 1,8 až 2,0 znamená čistou DNA.

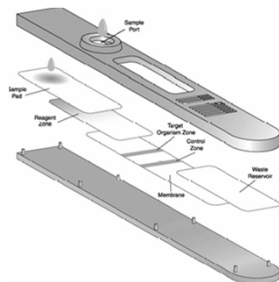
Fluorimetricky

- Hoechst 33258, PicoGreen, SybrGreen



Kolorimetricky

- Dipstick



Pomocí kvantitativní PCR (qPCR)

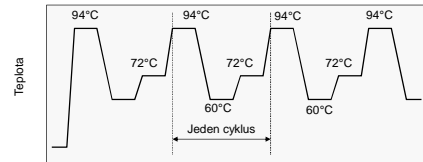
- Real-time PCR
- Nejpřesnější metoda kvantifikace DNA



PCR amplifikace

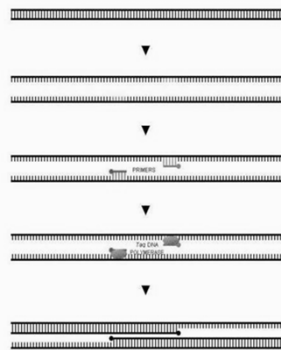
- Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
- Namnožení úseku DNA pomocí cyklických změn teplot v programovatelném termostatu (cykléru)

Cyklické střídání teplot



Vlastní PCR

- Denaturace
- Hybridizace
- Extenze



Složení PCR směsi

- Templát
- Primery (značené)
- Nukleotidy
- Polymeráza
- Pufr s hořčíkem
- Vše v nadbytku



OHT 6.14

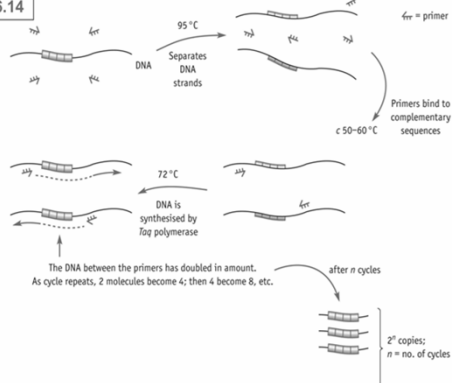
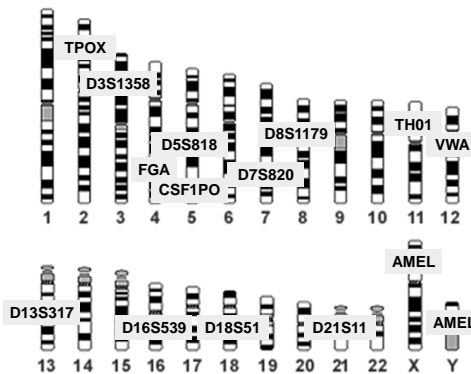


Figure 6.7 The polymerase chain reaction (PCR) (a) the basis of the process

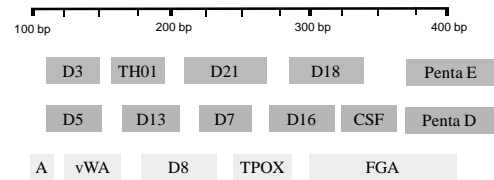
Multiplexní PCR směsi

- PowerPlex™16 (Promega)
- Profiler (Applied Biosystems)
- Identifier (Applied Biosystems)
- Minifiler (Applied Biosystems)
- Součástí setů je test na amelogenin X a Y

13 lokusů CODIS STR



PowerPlex16



OHT 6.15

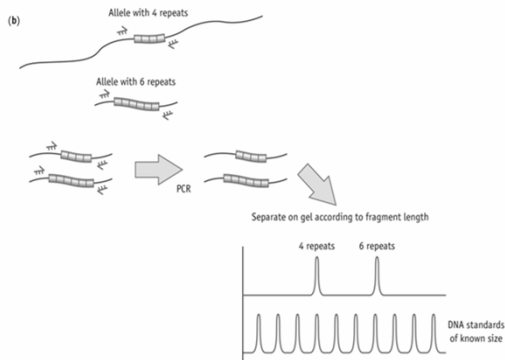


Figure 6.7 The polymerase chain reaction (PCR) (b) STR analysis using PCR

Elektroforéza

- DNA je záporně nabitá



Elektroforetický gel

- Agaróza
 - rychlé, levné
- Polyakrylamid
 - větší rozlišovací schopnost
- Performance-optimized polymer
 - kapalina v kapiláře

Gelová elektroforéza

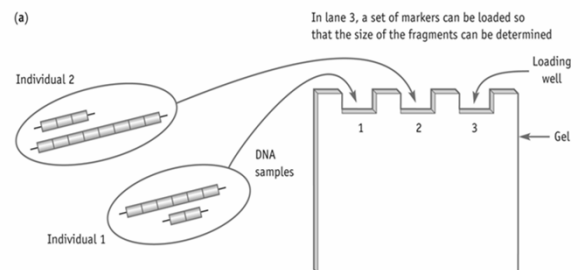


Figure 6.6 Separating DNA molecules according to their length: gel electrophoresis (a) loading the gel

Pohyb DNA v gelu

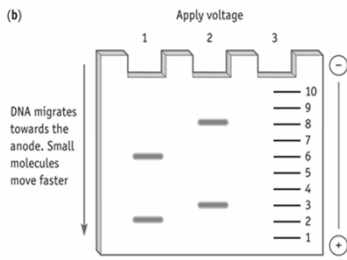


Figure 6.6 Separating DNA molecules according to their length: gel electrophoresis (b) DNA migration

Gel

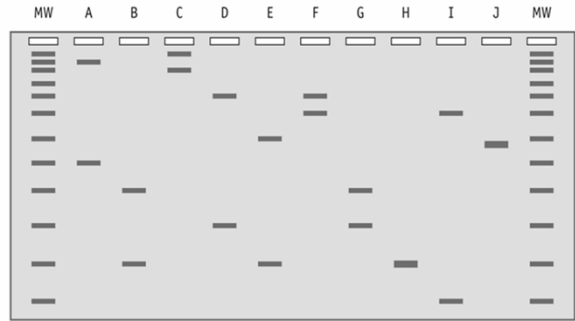


Figure 6.10 Agarose gel electrophoresis of PCR amplifications of an STR from individuals A to J

Tři osoby

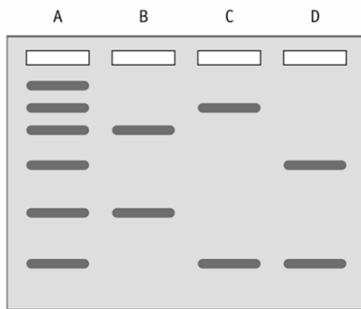
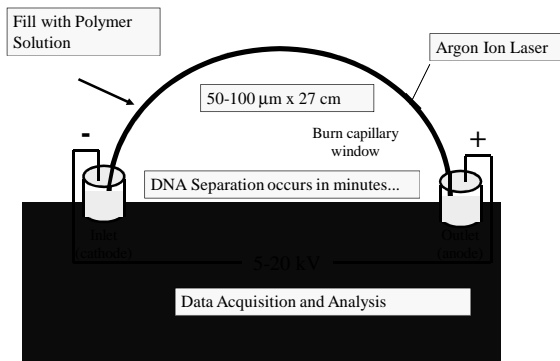


Figure 6.11 Agarose gel electrophoresis of PCR amplifications of DNA from three individuals B, C and D. Lane A carries the molecular size standards.

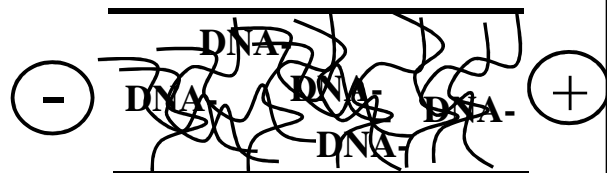
Kapilární elektroforéza

- Vstříknutí
 - příprava vzorku (denaturace)
 - elektrokineticky
- Separace
 - kapilára
 - POP-4 polymer
 - pufr
- Detekce
 - fluorescenční barviva s nepřekrývajícími se emisními délkami
 - filtry (skutečné a virtuální).

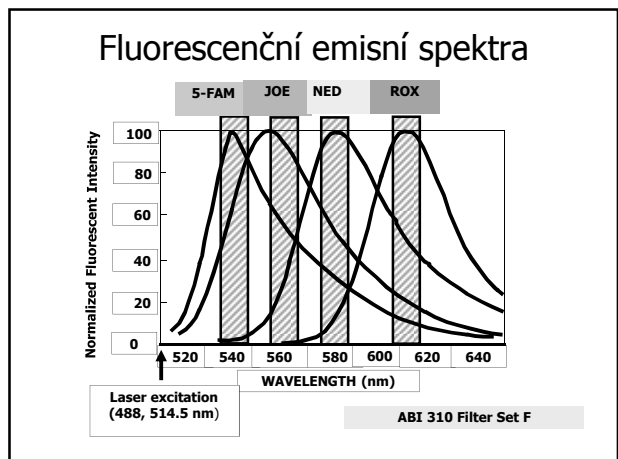
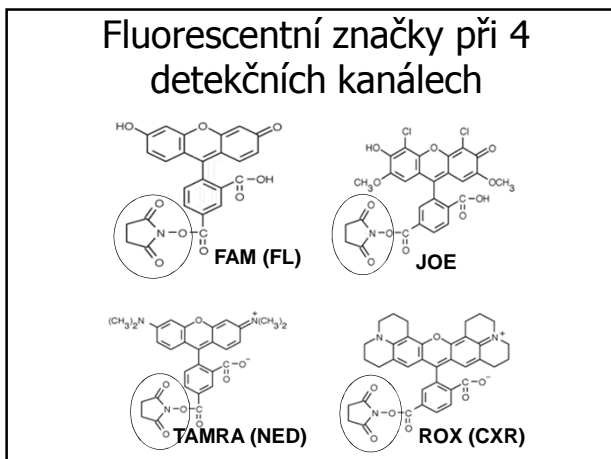
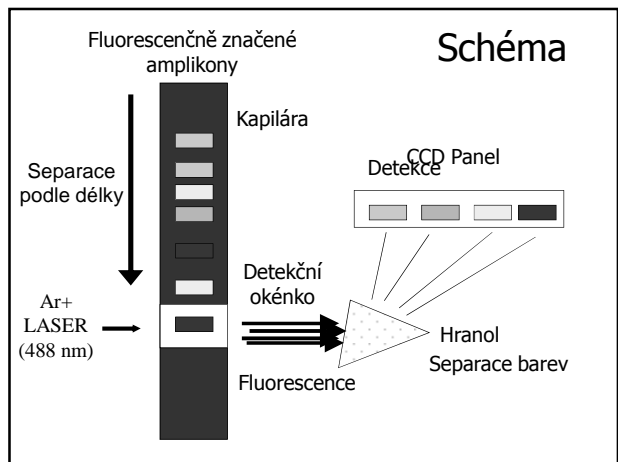
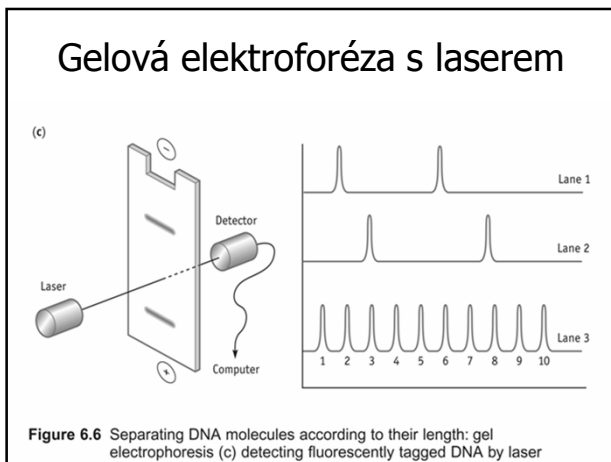
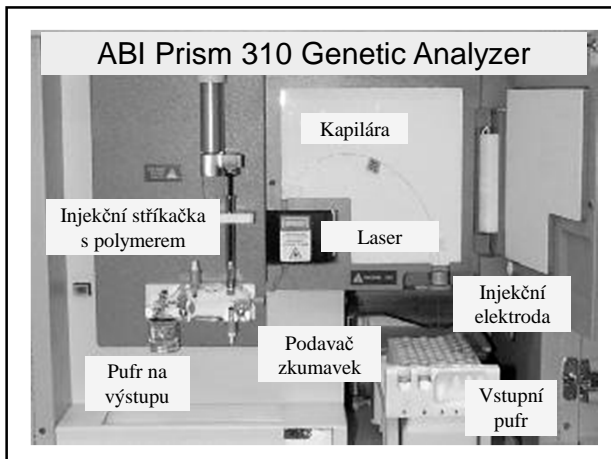
Kapilární Elektroforéza (CE)



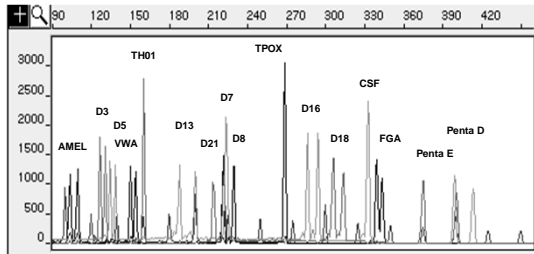
Mechanismus separace DNA



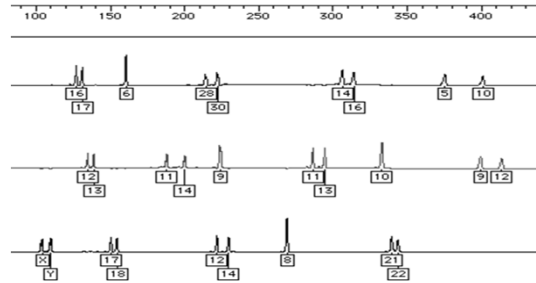
- Zamotaná vlákna polymerů zpomalují pohyb DNA v závislosti na délce molekuly (náboji)
- Polymer (gel) je tekutý, bez příčných vazeb (které jsou u plochých gelů), není připojen ke stěně kapiláry
- Polymer lze vypumpovat po každém běhu
- Separační charakteristiky jsou dány koncentrací polymeru a délkou vláken



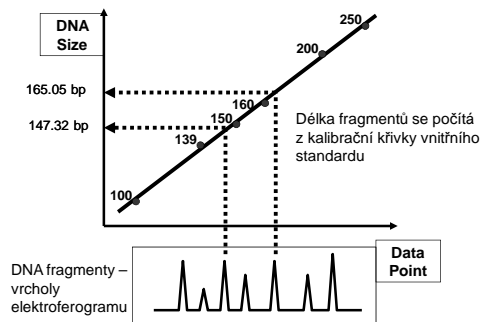
Elektroforeogram (elektroferogram)



Jednotlivé barevné kanály

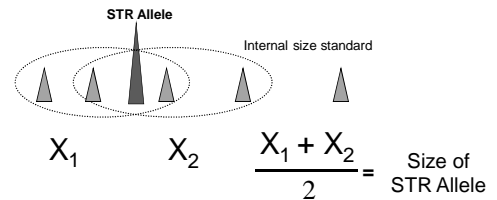


Kalibrační křivka z vnitřního standardu



Algoritmus výpočtu délky fragmentu

- Lokální Southernova metoda používá 2 vrcholy standardu delší než náš fragment a 2 vrcholy kratší než náš fragment



Vnitřní standardy

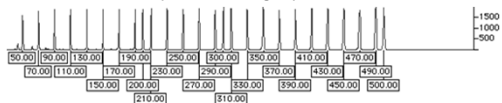
GS500 ROX (Applied Biosystems)



ILS600 CXR (Promega)



LTI 50-500 ROX (Life Technologies)



OHT 6.16

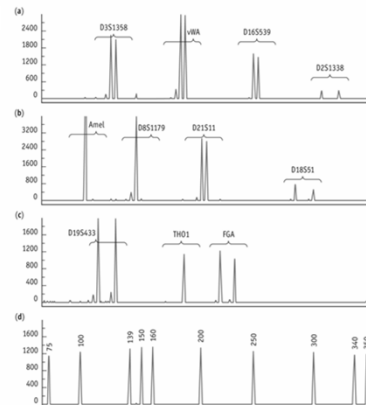


Figure 6.8 A modern DNA profile

Detekce a určení genotypu

- Ethidiumbromid × stříbření × laserové odečítání
- Srovnání se standardem
- Lidský faktor

Databáze zločinců

Informace v databázích

- Kdo lže, ten krade, ...?

Databáze

- NDNAD National DNA Database (UK)
 - nevyřešené případy
 - podezřelí
 - odsouzení
 - obžalovaní neviní
- CODIS Combined DNA Index System (USA)
 - NDIS National DNA Index System (k prosinci 2013 10733600 profilů delikventů, 1736300 profilů zatčených a 531900 profilů stop. 230900 shod, které pomohly ve 221600 vyšetřováních)
- Národní databáze DNA 2001 (2002) (Česká republika)

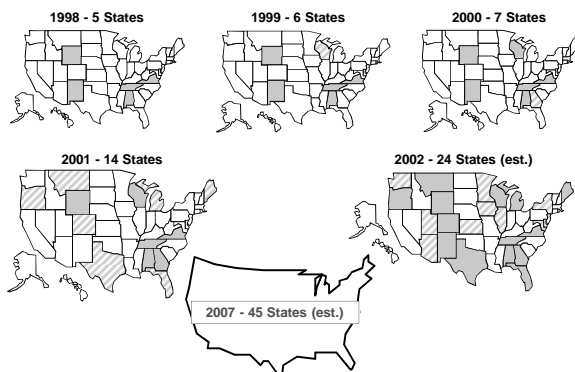
FBI's CODIS DNA Database

Combined **D**NA **I**ndex **S**ystem

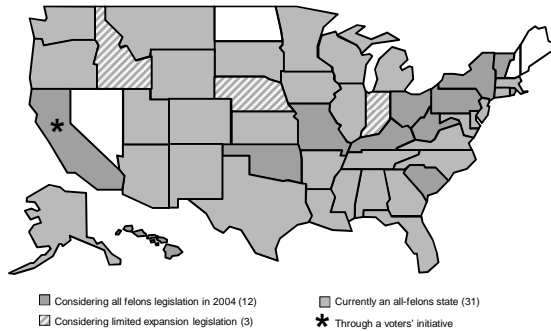
- Used for linking serial crimes and unsolved cases with repeat offenders
- Launched October 1998
- Links all 50 states
- Requires >4 RFLP markers and/or 13 core STR markers
- Current backlog of >600,000 samples



Vývoj databází zločinců v USA



2004: DNA Database Expansion Bills



Národní databáze DNA

- ND DNA 2001 Andy Williams ve fci twinnera projektu PHARE
- Rozhodnutí padlo v rezoluci Rady Evropy č.193/1997, spolupráce Interpol, European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI)
- Kriminalistický ústav Praha, Policie České republiky (ISO9000, QA), Závazný pokyn policejního prezidenta k používání databáze květen 2002
 - 3-letá lhůta
 - věk 80 let u odsouzených
- CODIS bezplatně (za přístup)
- Zákon č.101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů
- Euronovela zákona o policii č.60/2001 Sb.
- Pomocná informační databáze INFO-DNA, propojená 15-místným kódem
- Zabezpečení vůči neoprávněnému vstupu do databáze, zálohování.

Photofit

- Dle dědičných znaků usuzovat na fenotyp (vzhled)
 - Rusovlasost
 - Ušní maz
 - Plešatění
 - Etnogeografický původ – ancestry informative markers (AIM)

Další informace vytěžitelná z nukleových kyselin

- Methylace DNA (a RNA)
- Mediátorová RNA
- MikroRNA, lncRNA
- Časování
 - Fáze dne
 - Stáří stopy

Děkuji vám za pozornost!