UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Katedra antropologie a genetiky člověka

Lenka Dvořáková

Využití metod PCR ve forenzní genetické analýze
Use of PCR in forensic genetic analysis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Halina Šimková

Praha 2011

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2011 ….....

Lenka Dvořáková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce, paní Mgr. Halině Šimkové, za cenné rady a připomínky při psaní a tvorbě mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu a vypracovávání práce.

ABSTRAKT

Polymerase **C**hain **R**eaction neboli PCR je molekulárně genetická metoda sloužící k amplifikaci daného fragmentu DNA. V dnešní době je to jedna z nejpoužívanějších a nejúspěšnějších molekulárně genetických metod, která se využívá v mnoha vědeckých i aplikovaných oborech. PCR má mnoho modifikací odvozených od klasického schématu reakce – například multiplex PCR, inverzní PCR, nested PCR, asymetrická PCR a plno dalších. Ve forenzní genetické analýze se PCR využívá především jako metoda amplifikace studovaných lokusů při fragmentové analýze, jako součást sekvenace a dále pak v kvantifikaci jako real-time PCR.

Cílem této práce je shrnout využití polymerázové řetězové reakce ve forenzní praxi a nastínit metody, při kterých se PCR používá.

Klíčová slova:

PCR, forenzní analýza, amplifikace DNA, STR, mtDNA

ABSTRACT

Polymerase **C**hain **R**eaction or PCR is molecular genetic method used to amplify the DNA fragment. Today it is one of the most popular and successful molecular genetic methods, which is used in many scientific and applied fields. PCR has many modifications derived from the classical scheme of reactions - for example multiplex PCR, inverse PCR, nested PCR, asymmetric PCR, and a lot more. The forensic genetic analysis is mainly used as a PCR amplification method of the studied loci for fragment analysis, as part of the sequencing and then quantified as a real-time PCR.

The aim of this paper is to summarize the use of polymerase chain reaction in the forensic practice, and outline the methods in which PCR is used.

Key words:

PCR, forensic analysis, DNA amplification, STR, mtDNA

OBSAH

Seznam zkratek……. 7
1. Úvod……. 8
2. Historie PCR……. 9
3. Princip PCR…….. 10
3.1. Denaturační fáze……..... 11
3.2. Anelace s primery…….. 11
3.3. Syntetická fáze……... 12
4. Složení PCR směsi…… 12
4.1. Templátová DNA……... 12
4.2. Pufr……. 12
4.3. Primery…… 13
4.4. dNTPs……. 13
4.5. Dvojmocné kationty…… 13
4.6. DNA polymeráza……..... 14
4.7. PCR voda…… 15
4.8. Aditiva a minerální olej…….. 15
5. Termocykler……... 15
6. Modifikace PCR…… 16
6.1. Hot start PCR……. 16
6.2. Multiplex PCR…… 16
6.3. Inverzní PCR…….. 17
6.4. Asymetrická PCR…… 18
6.5. Nested PCR……. 18
6.6. Miniprimer PCR……. 18
6.7. Methylation – specific PCR…… 19
6.8. Alelově specifická PCR……. 19
6.9. RT PCR…….. 19
6.10. RACE PCR……... 20
6.11. PCR in situ…… 21
6.12. Real-time PCR…….. 21
7. Aplikace PCR…… 22
8. Využití PCR ve forenzní genetice……. 23
8.1. STR polymorfizmus…… 23
8.2. Fagmentová analýza STR lokusů…… 25
8.3. mtDNA polymorfizmus……... 26
8.4. Analýza mtDNA……. 27
8.4.1. Sangerova metoda sekvenování…… 28
8.4.2. Primer exension…… 28
8.4.3. Allele-specific hybridization…… 29
8.5. Real-time PCR kvantifikace…… 29
9. Příklady kazuistik s využitím PCR v jednotlivých oblastech forenzní genetiky… 30
9.1. Kriminalistická genetika……. 30
9.2. Identifikační genetika……. 30
9.3. Kognativní genetika……. 31
9.4. Biomolekulární archeologie a paleogenetika……. 31
9.5. Genogeografie…… 31
9.6. Genogenealogie…….. 32
10. Závěr…… 32
11. Seznam literatury……. 33

SEZNAM ZKRATEK

A	Adenin
ATP	Adenosintrifosfát
bp	Pár Bází
C	Cytosin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CODIS	Combined DNA Index System
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
dTTP	Deoxytymidintrifosfát
dUTP	Deoxyuridintrifosfát
EDNAP	European DNA Profiling Group
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes
G	Guanin
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
HVR	Hypervariable Region
IPC	Internal Positive Control
kb	Kilobáze
km	Kilometr
kV	Kilovat
Mg^{2+}	Hořečnatý kationt
mM	Milimol
Mn^{2+}	Manganatý kationt
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSP	Methylation-specific Polymerase Chain Reaction
mtDNA	Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid
nt	Nukleotid
OH skupina	Hydroxylová skupina
PCR	Polymerase Chain Reaction
RACE PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RPPH1	Ribonuclease P RNA component H1
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SRY	Sex - determining Region Y
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat
µl	Mikrolitr
µM	Mikromol

1. ÚVOD

Pojem forenzní genetika pochází z latinských slov *forensis*, což znamená soudní, a *genno*, což je nauka o dědičnosti a proměnlivosti. Forenzní genetika je tedy obor genetiky, který využívá metod molekulární biologie k identifikaci osob, stanovení příbuznosti a k dalším genetickým testům pro různé, zejména důkazní účely. Forenzní genetika nezkoumá pouze lidské vzorky, ale pracuje také se vzorky rostlin [Craft *et al.*, 2007], hub nebo zvířat [Bellis *et al.*, 2003].

Jednou z metod používaných ve forenzní genetické analýze je polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda umožňuje amplifikaci i velmi malého a degradovaného množství DNA. Právě toho se využívá v kriminalistické a identifikační analýze, kde se v některých případech pracuje jen s velmi malým množstvím biologického vzorku.

Každý jedinec má unikátní DNA (s výjimkou jednovaječných dvojčat), čehož se využívá k identifikaci. Identifikace konkrétního jedince je založena na výskytu polymorfních oblastí v DNA, a to jak na autozomech, tak na gonozomech, a také v mitochondriální DNA. Forenzní genetika v dnešní době pracuje s vysoce polymorfními STR lokusy a jednonukleotidovými polymorfismy (SNP). Platí, že čím více polymorfních lokusů je analyzováno, tím je větší pravděpodobnost identifikace konkrétního jedince.

Polymerázová řetězová reakce je tedy ve forenzní genetické analýze využívána při fragmentové analýze jako jeden z kroků vedoucích ke zjištění počtu opakování krátkých tandemových repetic [Palha *et al.*, 2010]. Dále se PCR používá jako součást sekvenace při analýze jednonukleotidových polymorfismů [Bataille *et al.*, 1999] a v kvantifikaci jako real-time PCR [Alonso *et al.*, 2004].

Ve své bakalářské práci se budu nejprve zabývat historií a charakteristiou polymerázové řetězové reakce. Dále zde popíšu některé vybrané modifikace PCR. Poté se budu věnovat metodám využívajícím PCR, které jsou používány ve forenzní genetické analýze. Závěr mé práce bude patřit konkrétním kazuistikám z jednotlivých oblastí forenzní genetiky, kde se využila PCR.

2. HISTORIE PCR

PCR je relativně mladou molekulárně genetickou metodou. Její počátky se datují do začátku 80. let 20. století. Za objevitele PCR je pokládán americký biochemik Kary Mullis. Kary Mullis v té době pracoval jako vědec kalifornské společnosti Cetus Corporation. Jeho nový koncept, nazvaný PCR, byl spojením několika dílčích postupů, které se samy o sobě užívaly už dříve. Byla to jednak syntéza krátkých jednořetězcových DNA úseků, zvaných oligonukleotidy, a jednak užití DNA polymerázy k cílově specifické syntéze DNA. DNA polymeráza byla poprvé objevena roku 1955 Arthurem Kornbergem ze Stanfordské Univerzity, oligonukleotidy byly v molekulární biologii používány v 70. letech 20. století. Kary Mullis však nově využil 2 oligonukleotidy (primery), a to tak, že každý z těchto oligonukleotidů byl komplementární k jednomu vláknu DNA. Tím se specificky amplifikoval úsek nacházející se mezi těmito oligonukleotidy. Další zásadní novinkou bylo využití produktu z prvního kola amplifikace jako templátu pro kolo následující, čímž Mullis docílil cyklického chování reakce, odtud se bere název „polymerase chain reaction“ (polymerázová řetězová reakce) [Mullis, 1990]. První článek popisující PCR vyšel roku 1985 v časopise Science. Článek se týkal detekce mutací způsobujících srpkovitou anemii [Saiki *et al.*, 1985].

Jedním z prvotních problémů PCR byla časová náročnost a pracnost. Metoda vyžadovala manuální přenos zkumavek mezi vodními lázněmi o různé teplotě. Snaha zbavit se této namáhavé činnosti vedla k sestrojení prvního termocykleru zvaného „Mr Cycle“ firmou Cetus Corporation. Vynález termocykleru umožnil automatické nastavení střídání teploty ve zkumavkách, čímž se celý proces jednak urychlil a jednak se vyloučila nepopulární manuální práce.

Další problém byla polymeráza. Původně se pro PCR používal Klenowův fragment DNA polymerázy I, izolovaný z bakterie Escherichia coli. Tato DNA polymeráza je však silně termolabilní a nevydrží teploty kolem 95°C, které jsou užívány v denaturační fázi PCR. Proto se musela DNA polymeráza přidávat před každým cyklem. To bylo značně nevýhodné, a to jak z časových důvodů, tak z důvodu větší pravděpodobnosti kontaminace vzorku. Hledala se tedy polymeráza, která by odolala vysokým teplotám. Problém byl vyřešen v roce 1988, kdy byla poprvé izolována a použita termostabilní DNA polymeráza (tzv. Taq polymeráza), pocházející z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech Yellowstonského národního parku [Saiki a spol, 1988]. Jelikož je tato bakterie termofilní, optimální teplota pro fungování její Taq polymerázy se pohybuje kolem 72°C, zatímco optimální teplota pro fungování běžné polymerázy z Escherichia coli se pohybuje kolem 37°C. Dnes jsou známé termostabilní polymerázy i z jiných organismů, jako např. Tth

polymeráza, Tfl polymeráza, ad. Všechny tyto termostabilní polymerázy vydrží i teploty kolem 95°C potřebné pro denaturaci DNA.

Metoda byla patentována firmou Cetus 28. července 1985. Jako hlavní vynálezce byl označen Kary Mullis, který za PCR obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. V roce 1991 prodal Cetus patentová práva k PCR za 300 milionů dolarů firmě Hoffman - La Roche.

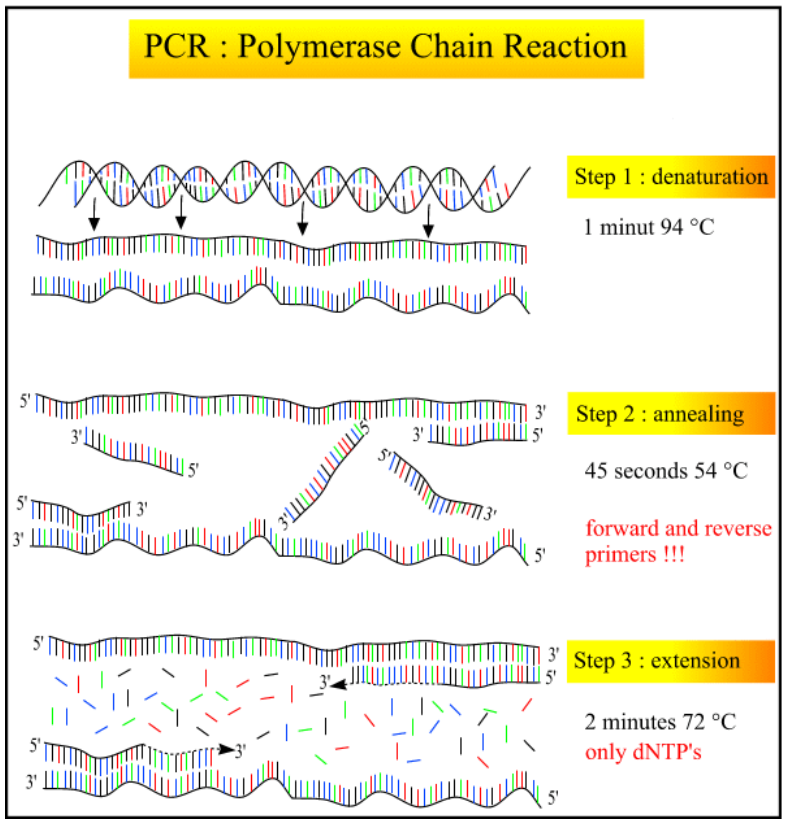
Technologie PCR se brzy začala využívat v mnoha oborech. Výjimkou nebyla ani forenzní genetika.

V genetické analýze se pro identifikaci zpočátku využívaly tzv. minisatelity neboli VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), což jsou dlouhé opakující se tandemové repetice nacházející se na různých místech genomu. Ty se analyzovaly především metodami zaměřenými na detekci polymorfizmu délky restrikčních fragmentů (RFLP). V 90. letech 20. století se začala používat také analýza STR (short tandem repeats), což jsou repetice krátké, se základním motivem o velikosti 2 - 6 nukleotidů. STR jsou kratší než VNTR, a jsou tudíž vhodnější při analýze částečně degradované DNA, což je běžné právě ve forenzních vzorcích.

PCR je dnes velmi důležitou technologií, která má řadu variant a aplikací v nejrůznějších disciplínách využívajících molekulárně genetickou analýzu, jako je například medicína, molekulární biologie, ekologie, archeologie, forenzní praxe a další.

3. PRINCIP PCR

Metoda PCR slouží k amplifikaci specifického úseku DNA. Tento úsek musí být lemován sekvencí, kterou alespoň zčásti známe, abychom mohli navrhnout vhodnou dvojici primerů komplementárních k lemující sekvenci. Výhodou metody je její vysoká citlivost. Stačí pouze malé množství DNA, aby došlo k amplifikaci daného úseku. Pro analýzu lze použít i velmi starý nebo degradovaný vzorek, přičemž podmínkou je, aby obsahoval alespoň jeden jediný zachovaný cílový úsek DNA, čehož se využívá např. ve forenzní genetice. Základní jednotkou polymerázové řetězové reakce je jeden cyklus sestávající ze tří kroků: denaturační fáze, anelační fáze a syntetická fáze. Během PCR se tento základní cyklus mnohokrát opakuje (nejčastěji se počet opakování pohybuje v rozmezí 25 - 35 cyklů).



Obr. 1: Kroky polymerázové řetězové reakce [převzato z Homepage of Andy Vierstraete]

3.1. Denaturační fáze

Smyslem denaturační fáze je úplné rozvolnění dvojřetězcové molekuly DNA na dva řetězce. Pokud by došlo jen k částečnému rozestoupení, molekula DNA by rychle reasociovala a nedošlo by k navázání primerů. Z tohoto důvodu je důležité zvolit správnou denaturační teplotu a dobu, po kterou budeme touto teplotou působit. Při volbě teploty a času musíme brát ohled na zastoupení GC párů v rámci amplifikovaného fragmentu, na koncentraci a zastoupení iontů v reakční směsi a na pH roztoku. Obvykle se používá teplota 90 - 98°C po dobu 10 - 60 sekund. Pokud bychom zvolili příliš vysokou teplotu nebo nepřiměřeně dlouhou dobu výhřevu, došlo by k degradaci prekurzorů, enzymů, DNA a primerů. Nicméně první denaturace v rámci celé PCR je vhodné prodloužit na 2 - 5 minut, aby se zajistilo úplné oddělní řetězců DNA.

3.2. Anelace s primery

Pro přednostní asociaci templátové DNA s primery je důležitý nadbytek primerů v reakční směsi. Optimální teplota pro nasedání primerů závisí na nukleotidové sekvenci, délce a koncentraci primerů. Obvykle je teplota nasedání primerů o 5°C nižší než jejich teplota tání. Z toho vyplývá, že by se anelační teplota měla pohybovat v rozmezí 55 - 70°C v závislosti na parametrech primeru. Čím vyšší anelační teplotu použijeme, tím se nám sníží pravděpodobnost špatného navázání primeru (tzv. misannealing) na templátovou DNA anebo

reasociace primerů navzájem, protože při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen zčásti, a vytvoří se nespecifický produkt. Nicméně teplota nesmí překročit hranici, kdy už by nedocházelo ke vzniku trvalé vazby primeru s templátem. Doba anelace by měla být dostatečně dlouhá pro úplné obsazení komplementárních sekvencí na templátové DNA. Obvykle se pohybuje v rozmezí 30 - 60 sekund.

3.3. Syntetická fáze

Doba syntetické fáze závisí na délce a koncentraci templátové DNA a také na teplotě. Syntézu provádí enzym, a to DNA dependentní DNA polymeráza. Tato DNA polymeráza musí být termostabilní, aby nedocházelo k její degradaci během denaturační fáze. Nejčastěji se využívá Taq polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech Yellowstonského národního parku. Se zvyšující se teplotou roste rychlost syntézy Taq polymerázou: při 22°C nasyntetizuje 0,25 nukleotidu za vteřinu, při 37°C to je 1,5 nukleotidu za vteřinu, při 55°C cca 24 nukleotidů za vteřinu, při 70°C více než 60 nukleotidů za vteřinu a při teplotě mezi 75 - 80°C dokonce 150 nukleotidů za vteřinu. Obvykle se syntetická fáze provádí při 72°C. Při této teplotě je Taq polymeráza schopna syntetizovat více než 3500 nukleotidů za minutu. Proto se syntéza úseků do 3 kb provádí při 72°C po dobu 1 minuty. Syntetická fáze posledního cyklu PCR se protahuje na 5 - 10 minut, aby se dokončily všechny syntézy [Bartlett *et* Stirling, 2003].

4. SLOŽENÍ PCR SMĚSI

PCR směs musí obsahovat následující složky: templátovou DNA, pufr, reverse primer, forward primer, dNTPs, dvojmocné kationty, DNA polymerázu a vodu. Dále zde mohou být aditiva a minerální olej.

4.1. Templátová DNA

Templátová DNA obsahuje cílovou sekvenci, kterou chceme amplifikovat, a slouží jako předloha (matrice) pro tvorbu nového vlákna. PCR lze aplikovat na DNA jadernou, mitochondriální i plasmidovou. Rozhodující vliv na výsledek PCR má kvalita a koncentrace templátové DNA. Pro běžnou PCR se používá množství řádově 10^4 - 10^7 molekul templátové DNA (záleží na délce cílové sekvence). Čím větší množství DNA chceme amplifikovat, tím větší množství templátové DNA musíme použít.

4.2. Pufr

Složení a pH pufru se řídí především druhem použité DNA polymerázy. Pro Taq DNA polymerázu se obvykle používá 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 - 8,4, při 20 - 25°C) a 50 mM KCl.

Pro Tth DNA polymerázu, Tfl DNA polymerázu a DNA polymerázy s proofreading aktivitou (Pwo, Pfu, Vent DNA polymeráza) se používá 50 mM Tris-HCl (pH 9,0, 25°C) a 20 mM $(NH_4)_2\ SO_4$.

4.3. Primery

Primery jsou krátké jednořetězcové oligonukleotidy, které se komplementárně váží k templátové DNA a svoji 3´OH skupinu poskytují DNA polymeráze. Polymeráza poté primer prodlužuje navazováním dalších dNTP a tím syntetizuje nové vlákno DNA. Pro namnožení jednoho fragmentu DNA se používá dvojice primerů – reverse a forward primer, které ohraničují cílovou sekvenci. Primery by měly být navrhované tak, aby byly specifické, obsahovaly podobné zastoupení AT a GC párů a neobsahovaly žádnou intermolekulovou nebo intramolekulovou komplementaritu. Délka primerů se pohybuje v rozmezí 18 - 28 bází, přičemž oba primery by měly být stejně dlouhé. Primer nemusí být striktně zcela komplementární k templátové DNA, na 5´ konci se za určitých podmínek může lišit, ale 3´ konec musí být zcela komplementární k požadované sekvenci. Teploty tání obou primerů musí být velmi blízké, obvykle je rozdíl mezi nimi nanejvýše 2 - 5°C. Koncentrace primerů se nejčastěji pohybuje v rozmezí 0,05 - 1,0 μM ve 100 μl směsi.

4.4. dNTPs

Volné deoxynukleotidtrifosfáty jsou využívány jako stavební kameny pro syntézu nového vlákna DNA. Koncentrace každého deoxynukleotidtrifosfátu se pohybuje v rozmezí 20 - 200 μM. Těmito dNTPs jsou dATP (deoxyadenosintrifosfát), dTTP (deoxytymidintrifosfát), dCTP (deoxycytidintrifosfát) a dGTP (deoxyguanosintrifosfát). V určitých aplikacích může být dTTP nahrazen dUTP (deoxyuridintrifosfát). Během PCR musí být ve směsi nadbytek volných dNTPs, aby nedocházelo ke zpomalování reakce. Na druhou stranu vysoká koncentrace těchto prekurzorů zvyšuje pravděpodobnost nespecifického nasedání dNTPs, a tím také chybovost DNA polymerázy.

4.5. Dvojmocné kationty

Jako dvojmocné kationty se nejčastěji využívají Mg^{2+} nebo Mn^{2+}. Slouží pro aktivaci DNA polymerázy. Koncentrace dvojmocných kationtů se pohybuje v rozmezí 0,5 - 5 mM, v závislosti na množství templátové DNA, primerů a dNTPs. Příliš vysoká koncentrace těchto kationtů vede k chybovosti DNA polymerázy a zvyšuje pravděpodobnost zařazení nesprávného nukleotidu. Volba vhodného kationtu záleží na DNA polymeráze. Polymerázy využívající Mn^{2+} jsou obvykle méně procesivní a pomalejší než polymerázy využívající Mg^{2+}, přičemž procesivita udává počet nukleotidů nasyntetizovaných před tím, než polymeráza oddisociuje z DNA templátu [Bartlett *et* Stirling, 2003].

4.6. DNA polymeráza

DNA polymeráza je enzym, který syntetizuje nové vlákno DNA podle templátu. Původně se jako polymeráza pro PCR využíval Klenowův fragment. Klenowův fragment vzniká působením subtilisinu na DNA polymerázu I, která je izolována z bakterie Escherichia coli. Narozdíl od DNA polymerázy I ztratil Klenowův fragment 5′→ 3′ exonukleázovou aktivitu, což znamená, že není schopen degradovat DNA od 5′ konce [Klenow *et* Henningsen, 1970]. Využívání Klenowa fragmentu pro PCR bylo nevýhodné, protože teplotní optimum tohoto enzymu je 37°C a během denaturační fáze docházelo k jeho degradaci. Proto se posléze začaly používat termostabilní DNA polymerázy, které se při denaturaci DNA nedegradují. První a dosud nejběžněji používanou termostabilní polymerázou je Taq polymeráza, ale existují i další termostabilní polymerázy (uvedené níže).

Taq polymeráza – Taq polymeráza je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Její teplotní optimum se pohybuje v rozmezí 75 - 80°C. Při této teplotě je schopna nasyntetizovat 150 nukleotidů za vteřinu. Pro syntetickou fázi PCR se obvykle volí teplota 72°C, což odpovídá rychlosti 50-60 nukleotidů za vteřinu. Při denaturační teplotě 95°C je poločas života Taq polymerázy cca 40 minut, což stačí na více než 30 cyklů PCR [Bartlett *et* Stirling, 2003]. Jelikož Taq polymeráza postrádá 3′ → 5′ exonukleázovou aktivitu, její přesnost se pohybuje kolem $1{,}3 \cdot 10^5$ bází, což znamená, že správně zainkorporuje průměrně $1{,}3 \cdot 10^5$ bází, než udělá chybu [Slater *et al.*, 1998].

Pfu polymeráza – Tato termostabilní polymeráza je izolovaná z archaeabakterie *Pyrococcus furiosus*. Pfu polymeráza má proofreading aktivitu, což je korektorská funkce některých DNA polymeráz, kdy při zařazení nesprávného nukleotidu se uplatní jejich 3′→ 5′exonukleázová aktivita, odštěpí se chybně inkorporovaný nukleotid a polymerace může pokračovat dál. Tím se výrazně snižuje chybovost těchto polymeráz – Pfu polymeráza je nejméně chybující termostabilních DNA polymeráza. Její přesnost se pohybuje kolem $7{,}7 \cdot 10^5$ bází [Slater *et al.*, 1998].

Tfl polymeráza – Tfl termostabilní polymeráza pochází z bakterie *Thermus flavus*. Poločas života Tfl polymerázy je 40 minut v 95°C a optimální teplota pro fungování je 74°C. Za přítomnosti Mg^{2+} kationtů v PCR směsi katalyzuje polymeraci nového DNA vlákna podle DNA templátu. Pokud zvolíme jako kationty Mn^{2+}, je Tfl polymeráza schopna polymerovat vlákno DNA podle RNA templátu [1].

Vent polymeráza – Vent DNA polymeráza je izolovaná z archaeabakterie *Thermococcus litoralis*. Tato polymeráza je vysoce termostabilní a její poločas života v 95°C je 402 minut [2]. Díky své 3′ → 5′ exonukleázové aktivitě se její přesnost pohybuje kolem

$3{,}6 \cdot 10^5$ bází [Slater *et al.*, 1998].

Pwo polymeráza – Tato termostabilní DNA polymeráza je izolovaná z archaeabakterie *Pyrococcus woesei*. Má 5´→ 3´ DNA polymerázovou aktivitu a 3´ → 5´ exonukleázovou aktivitu. To znamená, že má tato polymeráza schopnost proofreadingu, a tudíž negeneruje tolik chyb jako Taq polymeráza [3].

Tth polymeráza – Tth je termostabilní polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus thermophilus*. Teplotní optimum této polymerázy je 74°C a poločas života při 95°C je 20 minut. Za přítomnosti Mg^{2+} funguje jako DNA dependentní DNA polymeráza a v přítomnosti Mn^{2+} se chová jako RNA dependentní DNA polymeráza, podobně jako Tfl polymeráza [4].

4.7. PCR voda

Pro PCR se využívá tzv. double-distilled a deionizovaná voda, ze které jsou odstraněny přítomné kationty a anionty.

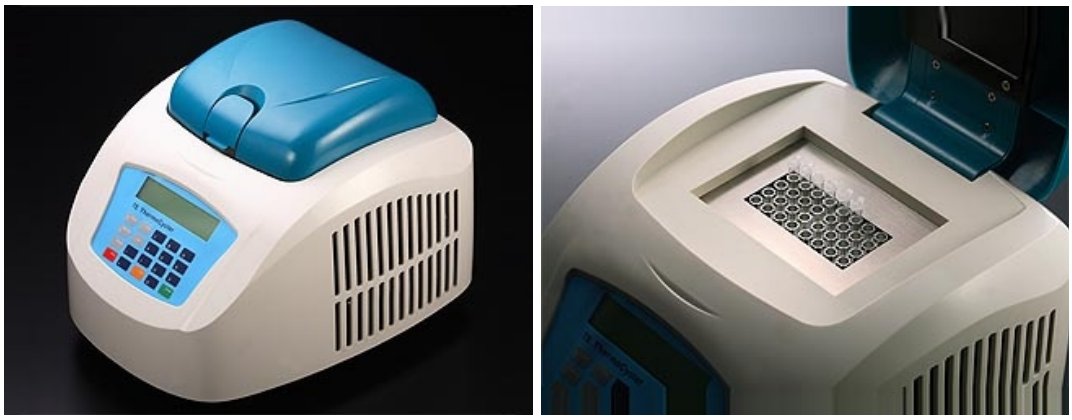
4.8. Aditiva a minerální olej

Aditiva se do PCR přidávají pro zvýšení efektivity reakce. Jako aditivum se využívá např. glycerol, který zvyšuje rezistenci Taq polymerázy proti tepelné degradaci nebo dimetylsulfoxid (DMSO), který snižuje teplotu pro separaci vláken DNA. Dalšími aditivy mohou být Triton X-100, Tween 20, Ficoll 400 nebo etanol.

Minerální olej zabraňuje odpaření vzorku při vysokých teplotách. Používá se v případě, kdy termocycler nemá vyhřívané víko.

5. TERMOCYKLER

Termocykler je nedílnou součástí každé PCR laboratoře. Je to programovatelný inkubátor, který umožňuje opakování PCR kroků – denaturace DNA, nasedání primerů a syntetické fáze v definovaných intervalech. Termocykler má termální blok s otvory pro vložení mikrozkumavek s PCR směsí. První termocyklery byly sestrojeny pro PCR s použitím Klenowa fragmentu DNA polymerázy I, který musel být do směsi přidáván před každým cyklem. Proto tyto termocyklery obsahovaly automatickou pipetu a otevřené mikrozkumavky pro opětovné zavádění Klenowa fragmentu do PCR směsi. Po zavedení Taq polymerázy do PCR se termocyklery konstrukčně zjednodušily a zároveň zdokonalily. Termální blok byl vyroben ze stříbra, což umožňovalo rovnoměrné rozložení teploty v bloku a rychlejší teplotní změny. Teplota byla řízena olejovou lázní. Dnešní termocyklery využívají místo olejové lázně Peltierovy články řízené mikroprocesorem. Novodobé termocyklery také obsahují vyhřívané víko (nejčastěji na 104°C), které zabraňuje kondenzaci vody na víčku mikrozkumavky a tím i zahušťování roztoku. Díky tomu se PCR směs nemusí převrstvovat minerálním olejem [5].



Obr. 2: Termocykler: TE (Peltier) Cooling PCR Thermocycler / UV Table [převzato z ExtraGene]

6. MODIFIKACE PCR

6.1. Hot start PCR

Hot start PCR je metoda, která zabraňuje vzniku nespecifických produktů během PCR. Při PCR, nejčastěji během vyhřívání vzorku na teplotu počáteční denaturace, může docházet k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA nebo primerů navzájem mezi sebou (tzv. dimerizace primerů). DNA polymeráza poté tyto DNA úseky prodlužuje a tím vznikají nevyhovující produkty. Metoda hot start PCR zabraňuje syntéze DNA během náběhové teploty. Lze toho docílit několika způsoby. První způsob je přidání polymerázy až po první denaturaci. To ovšem zvyšuje riziko kontaminace a tento postup se v dnešní době už moc nepoužívá [Butler, 2005]. Další možností je přidat do reakce voskovou bariéru a tím od sebe fyzicky oddělit složky nezbytné pro PCR (např. oddělení Taq polymerázy od zbytku směsi). Tato bariéra vlivem vysokých denaturačních teplot roztaje a PCR se může rozeběhnout [Chou *et al.*, 1992]. Další způsob je využití speciální chemicky modifikované polymerázy, tzv. hot start polymerázy. Takovou polymerázou je např. AmpliTaq Gold DNA polymeráza. Užívání této polymerázy redukuje tvorbu nespecifických PCR produktů tím, že se AmpliTaq Gold DNA polymeráza aktivuje až působením denaturační teploty 95°C po dobu několika minut [Moretti *et al.*, 1998].

6.2. Multiplex PCR

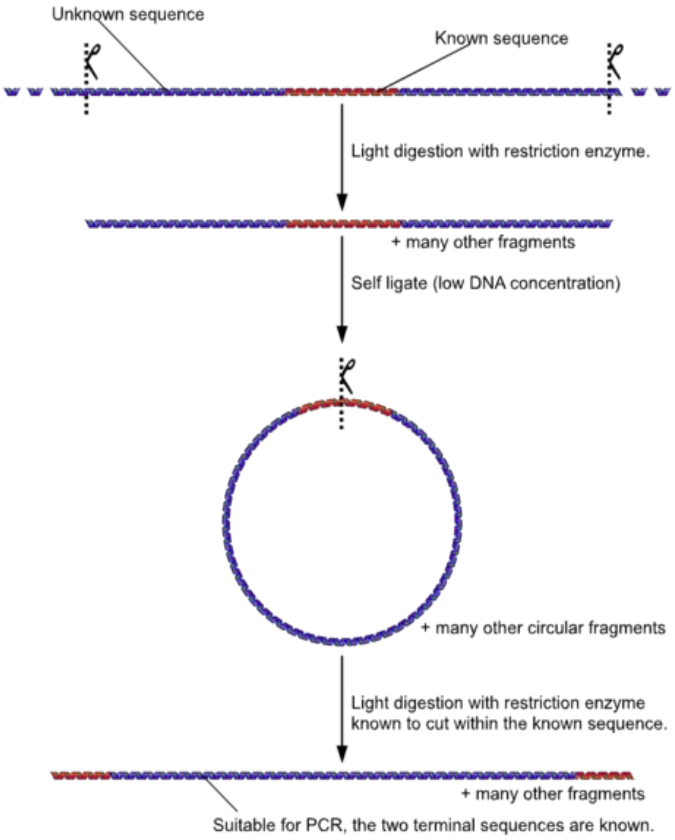
Multiplex PCR je varianta polymerázové řetězové reakce, která umožňuje amplifikaci dvou a více lokusů v jedné PCR. Namnožení více lokusů je dosaženo tak, že se do reakce přidá více párů primerů, které se váží k různým úsekům DNA. Z toho je patrné, že je třeba optimalizovat podmínky každé multiplex PCR, hlavně co se týče designu a koncentrace

primerů. Tento postup se využívá v mnoha oblastech testování DNA, např. při analýze delecí, mutací nebo polymorfismů [Henegariu *et al.*, 1997].

6.3. Inverzní PCR

Jednou z hlavních nevýhod klasického formátu PCR je, že se amplifikují pouze fragmenty, které jsou z obou stran ohraničené známou sekvencí. Pokud je úsek, který chceme amplifikovat, vně známé sekvence, je třeba užít tzv. inverzní PCR.

Při inverzní PCR je fragment DNA nejprve naštěpen vhodnými restrikčními enzymy, které neštěpí ve známé sekvenci, a poté je zaligován do cyklické formy (např. pomocí T4 DNA ligázy). Primery navržené pro inverzní PCR jsou komplementární ke známé sekvenci, ale jejich 3´ konce jsou v původní molekule orientované od sebe (narozdíl od klasické PCR, kdy 3´ konce směřují k sobě) [Ochman *et al.*, 1988]. Po ligaci se použije druhá restrikční endonukleáza, která štěpí v nám známé sekvenci, a tak cirkulární DNA linearizuje. Tím se sekvence komplementární k primerům dostanou na okraje fragmentu a může proběhnout klasická PCR.



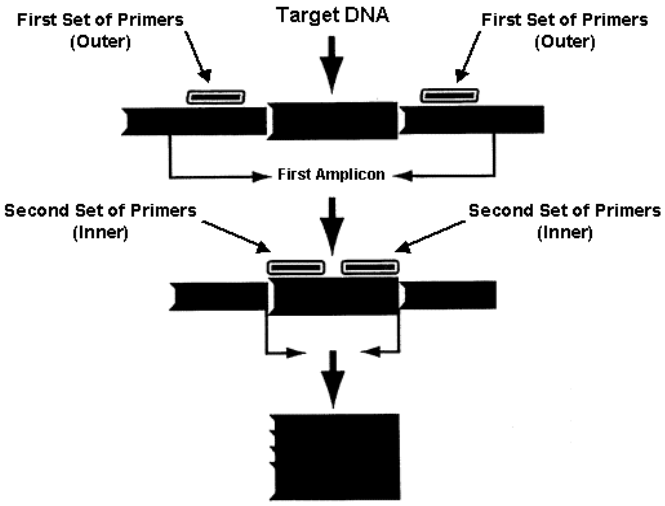
Obr. 3: Princip inverzní PCR. Segment je naštěpen v neznámé oblasti a následně zaligován. Použitím dalšího restrikčního enzymu štěpícího ve známé sekvenci se získá DNA fragment, který je ohraničen známou sekvencí [převzato z PCR STATION]

6.4. Asymetrická PCR

Asymetrická PCR je variantou PCR, která umožňuje amplifikaci preferenčně jednoho vlákna DNA. Výsledkem asymetrické PCR jsou jednovláknové DNA, které se využívají např. pro sekvenování. Přebytku jednoho vlákna DNA lze docílit tak, že se do reakce přidá rozdílný poměr primerů. Obvykle se využívá poměr primerů P1:P2 = 1:50 nebo 1:100. Dalším způsobem je amplifikace DNA ve dvou krocích – v prvním kroku probíhá klasická PCR se 2 primery a ve druhém kroku se do reakce přidá pouze 1 primer. Mazars a spol. vyvinuli metodu, která je založena na rozdílné teplotě tání primerů (rozdíl v Tm alespoň 10°C). Nejprve probíhá 20 - 25 cyklů klasické PCR, s anelační teplotou odpovídající primeru s nižší Tm. Poté se anelační teplota zvýší na teplotu tání druhého primeru. Vyšší teplotou se první primer inaktivuje, a tím probíhá amplifikace pouze jednoho vlákna [Mazars *et al.*, 1991].

6.5. Nested PCR

Nested PCR umožňuje amplifikaci určité sekvence z dlouhého fragmentu DNA. Při nested PCR se využívají dva páry primerů – vnitřní a vnější. Vnější pár primerů vymezí z dlouhého fragmentu DNA určitý lokus. Uvnitř tohoto lokusu je místo komplementární pro vnitřní pár primerů. Pomocí vnitřního páru primerů se pak amplifikuje pouze potřebná sekvence. Tento způsob se využívá tehdy, pokud se v dlouhém fragmentu DNA může vyskytnout více míst komplementárních k primerům, čímž by vznikaly nespecifické produkty. Přidáním vnějšího páru primerů se specifikuje, která sekvence bude amplifikována [Luptáková *et al.*, 2010].



Obr. 4: Princip nested PCR [převzato z Institute for Viral Pathogenesis]

6.6. Miniprimer PCR

Klasická PCR využívá primery dlouhé 20 - 30 nt. Pomocí miniprimer PCR je možno amplifikovat fragmenty s využitím primerů dlouhých pouze 10 nt. Pro tento druh PCR se

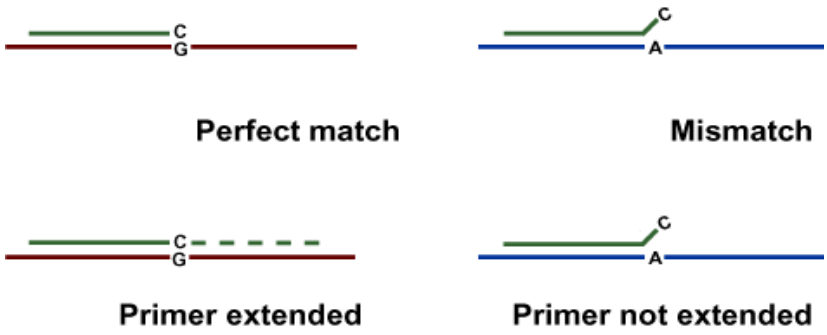
využívá S-Tbr DNA polymeráza. S-Tbr DNA polymeráza je termostabilní polymeráza, kde N-terminální 5´→ 3´ exonukleázová doména z *Thermus brockianus* DNA polymerázy I je odstraněna a nahrazena 7-kDa dsDNA vazebným proteinem Sso7d ze *Sulfolobus solfataricus*. Miniprimer PCR se využívá např. pro amplifikaci genu pro 16 S rRNA [Isenbarger *et al.*, 2008].

6.7. Methylation-specific PCR (MSP)

Tato metoda PCR umožňuje rychlé zjištění stavu metylace CpG míst v rámci CpG ostrůvků. Nejprve se DNA modifikuje pomocí bisulfidu sodného. Tím se všechny nemetylované cytosiny převedou na uracily, které jsou primery rozpoznávány jako tyminy. Amplifikace se provede pomocí dvou párů primerů – primer specifický pro metylovanou DNA a primer specifický pro nemetylovanou DNA [Herman *et al.*, 1996].

6.8. Alelově specifická PCR

Alelově specifická PCR je užívána k rozlišení alel jednotlivých jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Primery pro tuto modifikaci PCR se navzájem liší posledním nukleotidem na 3´ konci. Primery se navrhují tak, že primer P1 je komplementární k alele 1 a jeho 3´ terminální nukleotid se liší od DNA sekvence alely 2 (obsahuje SNP). Během PCR se namnoží pouze alela 1. Stejně tak při použití primeru P2 se amplifikuje pouze alela 2. Tato metoda nachází uplatnění např. při detekci chorob způsobených jednonukleotidovým polymorfismem (např. srpkovitá anémie) [Wu *et al.*, 1989].



Obr. 5. Princip alelově specifické PCR. Pomocí alelově specifického primeru je amplifikována pouze 1 alela, ke které je tento primer plně komplementární [převzato z SNP Scoring].

6.9. RT PCR

RT PCR je kombinací technik reverzní transkripce a PCR. RT PCR je metoda, pomocí které se nejprve přepíše mRNA do komplementární DNA (cDNA), a poté se tato cDNA amplifikuje pomocí PCR. Enzymy, které přepisují mRNA do DNA, se nazývají reverzní transkriptázy a jsou to RNA dependentní DNA polymerázy. Reverzní transkriptázy, které se

používají při RT PCR, mívají vyšší teplotní optimum, protože vyšší teplota ruší vlásenky tvořící se na mRNA. Další vlastností reverzních transkriptáz je snížená nebo žádná aktivita RNázy H, která specificky degraduje hybridy DNA x RNA.

RT PCR se provádí ve třech základních typech uspořádání. Prvním způsobem je dvojstupňová RT PCR ve dvou zkumavkách. V první zkumavce probíhá reverzní transkripce – přepis RNA do cDNA pomocí oligo (dT) primerů, náhodných hexanukleotidových primerů nebo sekvenčně specifických primerů. Část vzorku se přenese do druhé zkumavky, kde probíhá PCR. Dalším způsobem je dvojstupňová RT PCR v jedné zkumavce. Nejprve probíhá reverzní transkripce za přítomnosti reverzní transkriptázy, Mg^{2+}, dNTP a primerů a před PCR cykly se do zkumavky přidá DNA polymeráza, specifické primery a pufr. Posledním způsobem je jednostupňová RT PCR v jedné zkumavce. Při tomto způsobu probíhá reverzní transkripce i PCR za stejných podmínek.

RT PCR slouží např. pro amplifikaci cDNA kopií vzácných mRNA, studium genové exprese nebo pro sekvenování RNA [Vondrejs, 2001].

6.10. RACE PCR

Rapid amplification of cDNA ends (RACE) neboli rychlá amplifikace konců cDNA je metoda umožňující amplifikaci 5´ a 3´ konců cDNA o neznáme sekvenci.

3´ konec mRNA obsahuje tzv. poly-A sekvenci. Proto se pro reverzní transkripci využije oligo (dT) primer, který je na 5´ konci prodloužen o oligonukleotidovou sekvenci, tzv. kotevní sekvenci. Tento primer také obsahuje na 3´ konci 1 nukleotid komplementární k poslednímu nukleotidu před poly-A sekvencí. Tím se zajistí správné nasednutí primeru na počátek poly-A sekvence. Pomocí takovéhoto primeru se nasyntetizuje první vlákno cDNA. Amplifikace se provádí pomocí vnitřního primeru a primeru komplementárního ke kotevní sekvenci. Pro zvýšení specifity se při další amplifikaci využívají vnořené (nested) primery. Takovýto postup se nazývá 3´ RACE PCR.

Při amplifikaci 5´ konce mRNA se postupuje tak, že se nejprve použije sekvenčně specifický primer, pomocí kterého se nasyntetizuje první vlákno cDNA. Poté je pomocí terminální deoxynukleotidyltransferázy (TdT) a dATP připojena na 3´ konec cDNA poly-A sekvence. Syntéza druhého řetězce se provede pomocí oligo (dT) primeru nastaveného na 5´ konci o kotevní sekvenci a na 3´ konci o 1 nukleotid komplementární k prvnímu nukleotidu za poly-A sekvencí na cDNA. Pro zvýšení specifity se při další amplifikaci využívají vnořené (nested) primery. Takovýto postup se nazývá *5´ RACE PCR*.

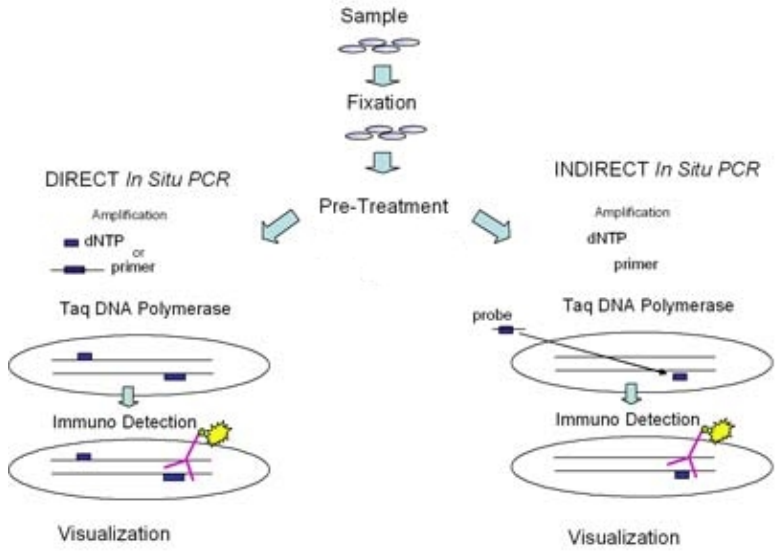
Během reverzní transkripce, při 5´ RACE PCR, se může stát, že reverzní transkriptáza nepřepíše do cDNA celou zájmovou sekvenci, ale jen její část. TdT poté připojí poly-A

sekvenci i k neúplným cDNA a během PCR se amplifikují i předčasně ukončené cDNA. Proto lze využít postup, který je založen na připojení kotevního primeru k 5´ konci mRNA ještě před reverzní transkripcí. Pokud reverzní transkriptáza nepřepíše tuto kotevní sekvenci do cDNA, nebude tato neúplná cDNA během PCR dále amplifikována [Frohman, 1994].

6.11. PCR *in situ*

Tato metoda PCR umožňuje amplifikaci DNA v neporušené buňce a následnou vizualizaci pomocí *in situ* hybridizace. Jako templát pro *in situ* PCR lze využít i RNA, ale je třeba do reakce vložit krok reverzní transkripce. *In situ* PCR se využívá v případech, kdy na buňku připadá nejméně 20 kopií cílových sekvencí, které mají být detekovány. Vzorek tkáně je nejprve fixován a permeabilizován. Poté může proběhnout amplifikace a vizualizace. Existují 2 základní metody značení amplifikovaného produktu – přímá a nepřímá metoda.
Během přímé *in situ* PCR dochází ke značení DNA už během amplifikace. Pro tuto metodu se využívají značené dNTP (typicky dUTP) nebo značené primery (obvykle na 5´ konci). Jako značky se nejčastěji využívají biotin, digoxigenin nebo fluorescein. Po amplifikaci je vzorek promyt, aby se odstranily PCR reagenty a volné amplikony. Detekce probíhá díky značeným nukleotidům, respektive primerům, ke kterým se naváže protilátka. Tato metoda je považována za jednodušší, rychlejší a levnější.

Nepřímá *in situ* PCR probíhá tak, že nejprve proběhne PCR a poté dojde k *in situ* hybridizaci se sondou. Sonda je pak rozeznávána přidanými protilátkami [Innis *et al.*, 1999].



Obr. 6: Princip *In situ* PCR [převzato z PCR STATION]

6.12. Real-time PCR

Real-time PCR neboli kvantitativní PCR umožňuje monitorování fluorescence emitované v průběhu polymerázové řetězové reakce jakožto indikátoru amplifikace

požadovaného fragmentu v každém cyklu. Jako detekční látky se nejprve používala tzv. interkalační činidla (SYBR Green I, ethidium bromid), jejichž fluorescenční aktivita stoupá po navázání na dvouřetězcovou DNA. Nevýhodou těchto látek je, že detekují veškerou DNA přítomnou v reakční směsi (i nespecifické produkty amplifikace) [Bookout *et* Mangelsdorf, 2003]. Proto se pro detekci začaly používat i jiné metody, jako jsou hydrolyzační (molecular beacon, TaqMan) a hybridizační sondy.

TaqMan test je založen na 5´ nukleázové aktivitě Taq polymerázy, která rozštěpí a nahradí oligonukleotidovou sondu hybridizovanou s cílovou molekulou DNA. Oligonukleotidová sonda obsahuje na svém 5´ konci fluorescenční barvu označovanou jako „reportér“ a na 3´ konci fluorescenční barvu označovanou jako „quencher“ neboli zhášeč. Pokud sonda není rozštěpena, zhášeč redukuje fluorescenční signál reportéru. Po rozštěpení sondy nedochází k redukci fluorescenčního signálu reportéru, a tím je umožněna fluorescence. Pro zjištění polymorfního nukleotidu v bialelickém systému se používají dvě sondy, které jsou různě fluorescenčně značené. První sonda je komplementární k běžně se vyskytující alele a druhá je komplementární k variantní alele [Livak, 1999].

Molecular beacon (molekulární majáček) je další metoda detekce signálu pro real-time PCR. Oligonukleotidová sonda tvoří vlásenkové uspořádání a na svém 5´ konci obsahuje fluorofor a na 3´ konci zhášeč. V takovéto vlásenkové konformaci nedochází k fluorescenci. Při hybridizaci na cílovou sekvenci dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče a tím i k fluorescenci [Tyagi *et* Kramer, 1996].

Další metodou detekce fluorescenčního signálu jsou hybridizační sondy. Tato metoda je založena na použití dvou oligonukleotidových sekvencí značených fluorescenčními barvami, z nichž jedna nasedá na polymorfní lokus. První z nich obsahuje na svém 3´ konci fluorescein a druhá obsahuje na svém 5´ konci jinou fluorescenční značku. Obě sondy nasedají těsně vedle sebe na cílovou DNA. Pokud obě sondy hybridizují s cílovou DNA a fluorescein je excitován díky světelnému zdroji LightCycleru (Roche), dochází k emisi zeleného fluorescenčního světla. Část excitační energie je převedena na přilehlou fluorescenční barvu, která následně emituje fluorescenční světlo delší vlnové délky. Toto světlo je následně měřeno fotodiodou [Lareu *et al.*, 2001].

7. APLIKACE PCR

Polymerázová řetězová reakce je jednou z nejpoužívanějších a nejúspěšnějších molekulárně genetických metod. Slouží k amplifikaci specifických úseků DNA [Bataille *et al.*, 1999], čehož může být využito k nesmírně široké škále nejrůznějších molekulárně

genetických analýz – namátkou jmenujme determinaci pohlaví [Luptáková *et al.*, 2010], detekci mutací v genech [Goossens *et al.*, 2003], zde byla také PCR metoda poprvé použita v praxi [Saiki *et al.*, 1985]. Dále pak k mutagenezi in vitro [Rashtchian *et al.*, 1992], přípravě značených sond [Griffais *et al.*, 1990], ke studiu genové exprese [Zhang *et al.*, 2005], k typizaci patogenních bakterií [Riggio *et al.*, 2001], virů nebo hub, k sekvenování [Innis *et al.*, 1988], k typizaci tkání či tělních tekutin [Fleming *et* Harbison, 2010], nebo ke studování DNA polymorfismu [Caratti *et al.*, 2010].

Díky tomuto širokému využití se PCR uplatňuje v mnoha vědeckých i aplikovaných oborech, jako jsou genové inženýrství, molekulární archeologie, molekulární genetika, mikrobiologie, zoologie, forenzní genetika, bioinformatika, medicína a další.

8. VYUŽITÍ PCR VE FORENZNÍ GENETICE

Polymerázová řetězová reakce se ve forenzní genetice uplatňuje především jako metoda amplifikace studovaných lokusů při fragmentové analýze, jako součást sekvenace a dále pak v kvantifikaci jako real-time PCR.

Cílovými lokusy fragmentové analýzy jsou především krátké tandemové repetice. Sekvenace DNA je pak v rámci forenzní genetiky využívána zejména pro stanovení sekvence hypervariabilních oblastí mtDNA.

8.1. STR polymorfismus

STR (short tandem repeat nebo také krátké tandemové repetice, mikrosatelity) jsou sekvence DNA obsahující krátký motiv, obvykle dlouhý 2 - 6 bp, který se několikrát za sebou opakuje. Počet opakování základního motivu se mezi jedinci v populaci může lišit, poté mluvíme o STR polymorfismu. Celková délka STR se nejčastěji pohybuje v rozmezí 100 - 500 bp [Edwards *et al.*, 1991].

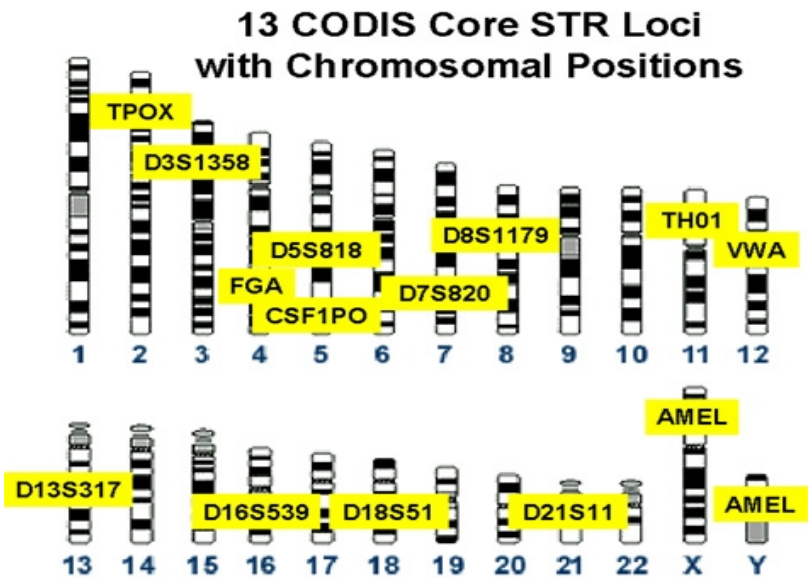
STR se nacházejí jak na autozomech, tak na pohlavních chromozomech. Krátké tandemové repetice nacházející se na autozomech vykazují mendelovskou dědičnost [Edwards *et al.*, 1991]. Rodič a potomek tudíž vykazují shodu alespoň v jedné alele ve studovaném lokusu, pokud v germinální linii nedošlo k mutaci [Aşıcıoğlu *et al.*, 2004]. Mikrosatelity nacházející se na pohlavních chromozomech se dědí nonmendelovsky. Y chromozom přechází z otce na syna v relativně nezměněné podobě, s výjimkou mutací v zárodečné linii [Kayser *et* Sajantila, 2001]. Y-STR polymorfismus se využívá jako doplňující analýza při paternitním testování [Csete *et al.*, 2005], identifikaci obětí hromadných neštěstí i forenzní kriminalistické analýze [Honda *et al.*, 1999] a též při testování

mužských paternálních linií. Forenzně využívané krátké tandemové repetice se nacházejí i na X chromozomu [Bini *et al.*, 2005].

STR byly pro forenzní praxi vybrány díky své hypervariabilitě, robustnosti amplifikace, malé velikosti PCR produktů a relativně snadnému multiplexování. Pro forenzní analýzu se nejčastěji využívají tetranukleotidové STR [Barral *et al.*, 2000]. Jejich výhodou oproti dinukleotidovým a trinukleotidovým STR je nižší výskyt tzv. stutterů, které jsou dány chybou DNA polymerázy. Ta naamplifikuje méně nebo naopak více STR repetic, než v daném lokusu doopravdy je. V genomu organismů se vyskytuje velké množství mikrosatelitů, ale pouze některé z nich jsou používány pro forenzní praxi. Mezi kritéria určující, jaké STR budou vybrány pro forenzní praxi, patří vysoká variabilita v dané populaci, požadovaná délka lokusu, nízká míra mutací DNA a znalost přesného umístění daného lokusu na chromozomu.

Dnes ve světě existují desítky STR databází sloužících pro kriminalistické účely. Ve Spojených státech amerických je to DNA databáze CODIS (Combined DNA Index System), která vznikla v roce 1997. CODIS využívá 13 STR markerů, nacházejících se na různých chromozomech: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S359, D18S51, a D21S11 [Budowle *et al.*, 1998]. V roce 2000 uvedla firma Promega Corporation na trh PowerPlex® 16 System, což je multiplexní STR systém určený k testování otcovství, forenzní analýzy DNA, testování lidské identity a identifikaci tkáňových kultur, který obsahuje všech 13 CODIS STR markerů, amelogenin na určení pohlaví a dva pentanukleotidové STR markery s velmi nízkou frekvencí stutter efektů (Penta E a Penta D) [Krenke *et al.*, 2002].

Evropa má také svou DNA databázi, která využívá 7 STR markerů - TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179 a D18S51 [Schneider *et* Martin, 2001]. O těchto markerech rozhodla Evropská rada v roce 2001 a nyní tvoří jádro všech národních DNA databází v Evropě. Na konferenci v Glasgow v roce 2005 se skupiny ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) a EDNAP (European DNA Profiling Group) dohodly, že šance na získání výsledů z degradovaných vzorků se zvýší, pokud budou analyzovány také malé amplikony (tzv. mini-STR). Ke stávajícím 7 STR byly proto doporučeny 2 soubory, obsahující každý 3 mini-STR, jako kandidáti pro novou databázi. První soubor obsahuje lokusy D10S1248, D2S441 a D22S1045 a druhý soubor obsahuje lokusy D12S391, D1S1656 a TPOX [Gill *et al.*, 2006a; Gill *et al.*, 2006b].



Obr. 7: Databáze CODIS zahrnující 13 STR lokusů. Na obrázku je znázorněno umístění 13 STR lokusů v lidském genomu a navíc je zde znázorněn amelogenin sloužící pro určení pohlaví [převzato z DNA Initiative].

8.2. Fragmentová analýza STR lokusů

Fragmentová analýza STR lokusů slouží ke zjištění počtu opakování základního motivu v repetitivní sekvenci ve studovaném lokusu. Z biologického vzorku nalezeného na místě činu je izolována DNA. Existují tři hlavní metody izolace DNA používané ve forenzní praxi – fenol-chloroformová extrakce, extrakce chelexem a silica extrakce (izolace na skleněné membráně) [Castella *et al.*, 2006].

Po izolaci DNA následuje amplifikace pomocí PCR. K amplifikaci STR lokusů se obvykle využívá multiplex PCR, protože pro forenzní analýzu je třeba vyhodnotit více STR markerů najednou. V dnešní době existuje mnoho komerčních kitů pro multiplex PCR určených pro forenzní účely [6, 7]. Tyto kity obsahují fluorescenčně značené primery, které umožňují amplifikaci až 16 lokusů najednou. Jedním z používaných kitů je například PowerPlex 16 System od firmy Promega Corporation. Tento kit umožňuje amplifikaci 16 lokusů – 15 STR markerů a amelogenin. Vždy jeden primer od každého lokusu je označen jednou ze tří fluorescenčních barev (fluorescein, carboxytetramethylrhodamine, 6-carboxy-4´, 5´-dichloro-2´,7´- dimethoxy-fluorescein). Čtvrtou fluorescenční barvou (carboxy-X-rhodamine) je označen vnitřní standard [Sprecher *et al.*, 2000], což je soubor fragmentů DNA známé délky, který se analyzuje spolu se vzorkem testované DNA.

Po amplifikaci DNA jsou vzniklé fragmenty rozděleny podle velikosti pomocí elektroforézy. Dříve se používala hlavně gelová elektroforéza. Tato metoda je ale poměrně časově náročná, pracná a nelze ji automatizovat, proto ji v posledních letech nahradila tzv.

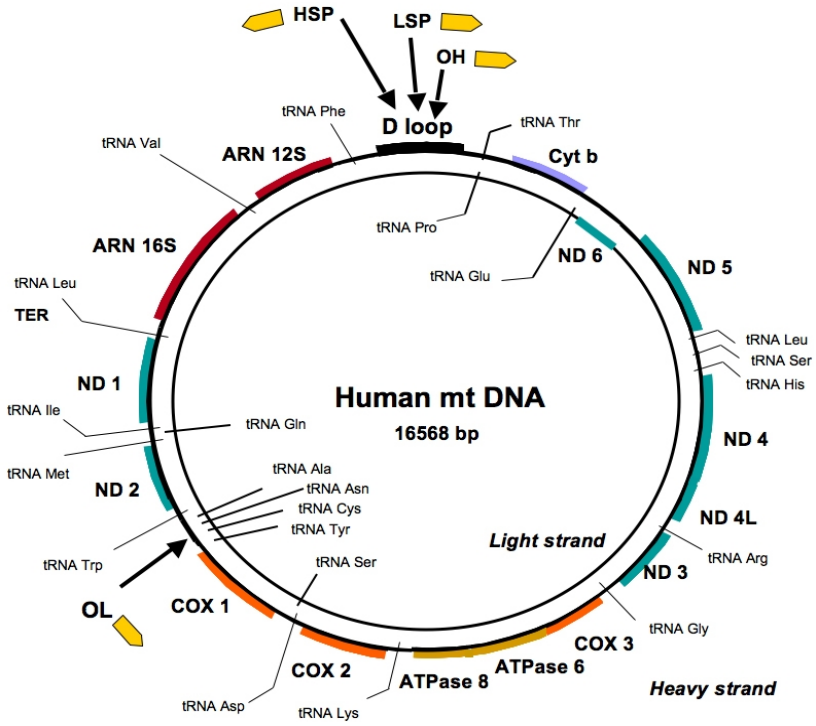
kapilární elektroforéza. Kapilární elektroforézy umožňují analýzu více vzorků najednou, což výrazně zvyšuje počet analyzovaných vzorků za den. Při kapilární elektroforéze dochází k separaci fragmentů DNA ve skleněné kapiláře, která má vnitřní průměr řádově desítky mikrometrů a je dlouhá několik desítek centimetrů. Kapilára je naplněna polymerem a oba její konce jsou ponořeny do nádob s elektrolytem, kam jsou vnořeny elektrody. Pro vpravení vzorků ze zkumavky do kapiláry se používá pulz elektrického napětí nebo rozdílný tlak mezi konci kapiláry. Separace fragmentů se děje na základě různé rychlosti pohybu v elektrickém poli. Obvykle se pro separaci DNA fragmentů používá napětí kolem 10-30 kV. U konce kapiláry se nachází detektor. Jelikož vzorky obsahují fluorescenčně značené primery, používá se laserem indukovaný fluorescenční detektor [Tagliaro *et* Smith, 1996]. Laser generuje paprsky různých vlnových délek, které vyvolají excitaci fluorescenčních barev. Vyzářené barevné světlo je pak zachyceno detektorem přístroje. Různě dlouhé fragmenty DNA jsou v elektroforetogramu reprezentovány jednotlivými píky a intenzita signálu je vyjádřena výškou píku. Délka jednotlivých fragmentů se odečte pomocí vnitřního standardu. Pro rychlejší vyhodnocení délky STR se navíc využívá ještě vnější standard (allelic ladder), který obsahuje všechny běžně se vyskytující alely v populaci pro dané lokusy [Zhang *et* Yeung, 1996].

8.3. mtDNA polymorfismus

Lidská mtDNA je cirkulární dvouřetězcová molekula o velikosti 16569 bp, která kóduje 37 genů, z toho je 13 genů kódujících podjednotky komplexů respiračního řetězce, který je zodpovědný za tvorbu ATP v rámci oxidačně-fosforylačního systému. Dále pak mtDNA kóduje 22 transferových RNA a dvě ribosomální RNA. Kromě kódující oblasti obsahuje mtDNA také nekódující oblast, tzv. control region, což je regulační oblast, kde se nachází replikační počátek těžkého řetězce a oba počátky transkripce [Anderson *et al.*, 1981]. Kontrolní region obsahuje hypervariabilní oblasti nazvané HVR-I, HVR-II a HVR-III [Lutz *et al.*, 1998], které jsou vysoce polymorfní a využívají se pro forenzní analýzu. V těchto hypervariabilních oblastech se vyskytují především jednonukleotidové polymorfismy (SNP). Kromě těchto oblastí se ve forenzní praxi uplatňuje také kódující oblast pro 12S rRNA [Girish *et al.*, 2004], 16S rRNA [Imaizumi *et al.*, 2007] a cytochrom b gen [Parson *et al.*, 2000].

Počet molekul mtDNA v jedné eukaryotní buňce se pohybuje kolem 1000-10000 kopií na buňku [Bogenhagen *et* Clayton, 1974]. Této skutečnosti se využívá při analýze velmi malého množství biologického vzorku, kde je jen málo jaderné DNA, ale mtDNA se zde vyskytuje v mnohonásobně vyšším počtu kopií.

Mitochondriální DNA je děděna maternálně [Giles *et al.*, 1980] a mutační rychlost jejího hypervariabilního kontrolního regionu je větší než mutační rychlost jaderné DNA. Podle Sigurðardóttira *et al.* (2000) byla mutační rychlost lidského HVR-I a HVR-II mtDNA odhadnuta na 0,0043 mutací za generaci. Vyšší mutační rychlost je dána tím, že mitochondrie nemají takové reparační mechanismy jako jaderná DNA a také se zde vyskytují vysoce reaktivní kyslíkové radikály, které vznikají jako vedlejší produkt při oxidační fosforylaci [Hashiguchi *et al.*, 2004].



Obr. 8: Schéma lidské mitochondriální DNA. Lidská mtDNA obsahuje 16569 bp, přičemž kóduje 22 tRNA, 12S a 16S rRNA a 13 genů kódujících podjednotky komplexů respiračního řetězce. V regulační oblasti se pak vyskytuje replikační počátek těžkého řetězce a oba počátky transkripce [převzato z Bioscience].

8.4. Analýza mtDNA

K analýze mtDNA se přistupuje tehdy, pokud studovaný vzorek obsahuje malé množství jaderné DNA nebo pokud je vzorek degradovaný. Mezi vzorky s nízkým obsahem jaderné DNA patří zuby, vlasy nebo kosti. Polymorfismus mitochondriální DNA se zjišťuje na základě sekvenace hypervariabilních oblastí mtDNA, kde se vyskytují SNP. Ze vzorku se nejprve extrahuje mtDNA, poté se pomocí PCR amplifikuje studovaný lokus. Při použití degradovaného vzorku je vhodné zvýšit počet cyklů PCR, například i na 42 [Gabriel *et al.*, 2001]. Vlastní sekvenování se provádí několika způsoby.

8.4.1. *Sangerova metoda sekvenování*

Sangerova metoda sekvenování neboli metoda terminace řetězce byla popsána na konci 70. let [Sanger *et al.*, 1977]. Při tomto způsobu sekvenace se použije produkt z prvního kola amplifikace jako templát pro asymetrickou PCR. Do PCR směsi se navíc přidají všechny čtyři druhy fluorescenčně značených ddNTP, které na svém 3´ uhlíku ribózy postrádají hydroxylovou skupinu, a tím znemožňují navázání dalších deoxynukleotidů do řetězce DNA. Po dokončení asymetrické PCR se ve zkumavce nachází různě dlouhé fragmenty DNA, které mají stejný 5´ konec řetězce, ale liší se svoji délkou a na 3´ konci řetězce mají jeden ze čtyř druhů fluorescenčně značených ddNTP. Každý druh ddNTP je značen jinou fluorescenční barvou. V dnešní době se v laboratořích používají kity, obsahující veškeré komponenty důležité pro sekvenaci [7]. Různě dlouhé fragmenty DNA se rozdělí na kapilární elektroforéze a z elektroforetogramu se odečte sekvence nukleotidů [Rosenblum *et al.*, 1997]. Alternativou této metody je použití značených primerů, kde jsou primery značeny na svém 5´ konci fluorescenční značkou. Tento způsob sekvenace neumožňuje rozlišení jednotlivých koncových ddNTP, proto musí asymetrická PCR probíhat paralelně ve čtyřech zkumavkách, přičemž do každé zkumavky je přidán pouze jeden druh ddNTP [Ju *et al.*, 1995].

8.4.2. *Primer extension*

Sangerově metodě podobná je metoda prodloužení primeru (primer extension), která je založena na tom, že do těsné blízkosti SNP nasedne primer. Ten je následně vhodnou DNA polymerázou prodloužen, ale pouze o jeden nukleotid, který odpovídá polymorfnímu místu. Navázání právě jednoho nukleotidu je zajištěno tím, že se v reakci nevyskytují žádné dNTP, ale pouze fluorescenčně značené ddNTP. Této metodě prodloužení primeru se také říká minisekvenování [Morley *et al.*, 1999]. Existuje několik technologií používaných pro detekci produktu. Nejčastěji využívaná je kapilární elektroforéza. Další možností detekce je technologie microarrays, kde jsou primery přichyceny k povrchu čipu [Divne *et* Allen, 2005].

Jinou variací této metody je alelově specifické prodloužení primeru (allele-specific extension). V této metodě DNA polymeráza amplifikuje pouze primery, které perfektně nasedly na templátovou DNA, přičemž primer je navržen tak, aby svým 3´ koncem nasedal na polymorfní místo templátové DNA [Vallone *et al.*, 2004].

Další variantou primer extension užívanou ve forenzní analýze je pyrosekvenování, které se využívá jak k sekvenaci mtDNA, například za účelem druhové specifikace [Balitzki-Korte *et al.*, 2005], tak i k analýze STR lokusů [Divne *et al.*, 2010]. Pyrosekvenování je založeno na detekci pyrofosfátu, který je uvolněn při inkorporaci dNTP do nově vznikajícího řetězce. Uvolněný pyrofosfát slouží jako substrát pro ATP sulfurylázu, která tvoří ATP.

Za pomoci ATP konvertuje enzym luciferáza luciferin na oxyluciferin a během této reakce dojde k vyzáření světla [Ronaghi *et al.*, 1996]. Nezainkorporované dNTP jsou následně degradovány vhodným enzymem, například apyrázou [Ronaghi *et al.*, 1998].

8.4.3. *Allele-specific hybridization*

Alelově specifická hybridizace (allele-specific hybridization) je založena na rozlišení dvou cílových sekvencí lišících se v jednom nukleotidu. Alelově specifické sondy jsou navrženy tak, že v centrální pozici obsahují polymorfní bázi. Za optimálních podmínek jsou stabilní pouze hybridy sonda – cílová sekvence, které jsou dokonale spárované. I zde existuje několik metod detekce polymorfní báze, kterými jsou TaqMan test, molecular beacon nebo hybridizační analýza využívající dvou oligonukleotidových sond.

Po sekvenaci se analyzovaný vzorek mt DNA porovná s tzv. referenční sekvencí neboli Cambridge Reference Sequence. Cambridgeská referenční sekvence byla první kompletně analyzovaná sekvence mtDNA. Avšak tato sekvence obsahovala chyby. Chyby byly způsobeny chybami v sekvenaci mtDNA a vzácnými polymorfismy v referenční sekvenci mtDNA. V roce 1999 byla Cambridgeská referenční sekvence poopravena a dnes je používána jako referenční sekvence pro studium lidské evoluce, populační genetiky a mitochondriálních onemocnění [Andrews *et al.*, 1999].

8.5. Real-time PCR kvantifikace

Ve forenzní genetické analýze je real-time PCR hojně využívanou metodou. Používá se jak ke sledování počtu kopií DNA, tak i k sekvenaci.

Kvantifikace forenzní DNA je důležitým krokem před PCR amplifikací. Cílem kvantifikace je zjištění množství DNA ve vzorku z důvodu optimalizace a nebo dokonce vyhnutí se dalšímu zpracování tohoto vzorku. Kvantifikační krok může také odhadnout vliv inhibitorů přítomných ve vzorku na následnou amplifikaci [Whittle *et* Sumita, 2008].

Pro kvantifikaci se užívají komerčně dostupné kity. Jedním z nich je Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), který je určen pro kvantifikaci lidské jaderné DNA ve forenzních vzorcích. Tento kit detekuje lokus nacházející se na krátkém raménku 5. chromozomu, kde se nachází gen pro lidskou telomerázu (hTERT). Vizualizace cílové sekvence se provádí na základě TaqMan testu.

Dalším kitem využívaným ve forenzní analýze je Quantifiler Y Human Male DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), který kvantifikuje pouze mužskou DNA nacházející se ve forenzním vzorku. Tento kit je založen na detekci SRY genu (sex - determining region Y) nacházejícím se na krátkém raménku Y chromozomu. Quantifiler Y Human Male DNA

Quantification Kit je vhodný zejména pro kvantifikaci mužských vzorků, kde se míchá mužská a ženská DNA (například v případech znásilnění). Vizualizace cílové sekvence se také provádí na základě TaqMan testu [Green *et al.*, 2005].

Quantifiler Duo DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) současně kvantifikuje autozomální a Y-chromozomální DNA a také detekuje PCR inhibitory v jediné reakci. Kromě kvantifikace DNA poskytuje tento test také kvalitativní hodnocení forenzních vzorků, protože dokáže stanovit poměr mužské a ženské DNA a rozsah inhibice PCR. Quantifiler Duo DNA Quantification Kit detekuje RPPH1 gen (Ribonuclease P RNA component H1), který je lokalizován na dlouhém raménku 14. chromozomu, SRY gen a tzv. IPC (internal positive control), který v kombinaci s hlavním detekční PCR systémem dokáže rozhodnout, zda se zdá daný vzorek negativní díky selhání PCR (např. kvůli obsahu inhibitorů) nebo je tento vzorek opravdu negativní. Vizualizace cílových sekvencí se opět provádí na základě TaqMan testu [Barbisin *et al.*, 2009].

9. PŘÍKLADY KAUZISTIK S VYUŽITÍM PCR V JEDNOTLIVÝCH OBLASTECH FORENZNÍ GENETIKY

9.1. Kriminalistická genetika

Cílem kriminalistické genetiky je nejčastěji zjištění původce stop nalezených na místě trestného činu. Nalezené stopy nemusí pocházet pouze z člověka nebo zvířat, ale také z rostlin. Jedním příkladem může být vražda ženy a jejího nenarozeného dítěte z Floridy. Podezřelý byl obviněn na základě suchého listu z dubu, *Quercus geminata*, který byl nalezen v kufru jeho auta. Stejné druhy dubů se nalézaly i na místě nálezu mrtvého těla. DNA analýza z nalezeného listu byla provedena na základě čtyř STR lokusů. Srovnávací vzorky listů byly sebrány z 24 stromů *Quercus geminata* ve vzdálenosti 2-10 km od místa nalezeného hrobu. Na základě STR lokusů byla provedena fragmentová analýza. Nicméně se neprokázalo, že by listy, které byly odebrány z vozu podezřelého, odpovídaly stromům vyskytujícím se v blízkosti nalezeného hrobu [Craft *et al.*, 2007].

9.2. Identifikační genetika

Cílem identifikační genetiky je genetické zkoumání srovnávacích vzorků osob za účelem jejich jednoznačné identifikace. Toto zkoumání se uplatňuje zejména při identifikaci obětí masových katastrof. Příkladem může být teroristický útok na věže Světového obchodního centra 11. září 2001, kde se nacházelo 2749 obětí. Jako referenční profily byly použity vzorky obětí, které byly získány z osobních věcí obětí. Pokud nebyly referenční

vzorky obětí k dispozici, přešlo se k příbuzenskému testování. Pro identifikaci ostatků se použila analýza STR a mini-STR lokusů, pokud nebyly tyto analýzy úspěšné, přistoupilo se k analýze mtDNA [Biesecker *et al.*, 2005].

9.3. Kognativní genetika

Kognativní genetika zkoumá srovnávací vzorky osob za účelem stanovení jejich biologických příbuzenských vztahů. V kriminalistice se kognativní testování využívá například při testech paternity v případech znásilnění nebo v případech, kdy matka odložila své dítě. Paternitní testy lze provádět jak z narozených potomků, tak i z potracených plodů. Příkladem může být případ čtrnáctileté těhotné dívky, která šla na potrat v 18. týdnu těhotenství. STR profily z potraceného plodu a krve matky byly porovnány s STR profilem domnělého otce. Domnělý otec se shodoval ve všech 7 testovaných STR lokusech s potraceným plodem a pravděpodobnost otcovství byla vypočtena na 99.9969% [Csete *et al.*, 2005].

9.4. Biomolekulární archeologie a paleogenetika

Kromě právních oblastí uplatnění se metody forenzní genetiky používají i v jiných oborech. Biomolekulární archeologie a paleogenetika pracují s velmi starými a často i degradovanými vzorky. Naštěstí díky forenzně genetické analýze lze i s těmito vzorky dost často dále pracovat. Jako příklad bych zde uvedla analýzu krve Ludvíka XVI., krále Francie. Krev byla získána z nádoby na střelný prach, kde se původně nacházel kapesník, který byl smočen v krvi Ludvíka XVI. během jeho popravy roku 1793. Z domnělé krve byla provedena analýza mtDNA (HVR-I i HVR-II), Y-STR profilu a některých somatických STR markerů. Dále byla provedena analýza genu HERC2, kde SNP v exonu 86 má vliv na modré zbarvení očí (z portrétů LudvíkaXVI je patrné, že byl modrooký). Výsledky ukázaly, že krev patřila muži, který byl heterozygotem pro SNP v genu HERC2. Z výsledků zatím nelze určit, zda krev opravdu patřila králi Ludvíku XVI., ale jedna z možností by byla porovnat tento vzorek se vzorkem suchého srdce syna Ludvíka XVI., které je uchované v bazilice sv. Denise v Paříži [Lalueza-Fox *et al.*, 2010].

9.5. Genogeografie

Genogeografie se zabývá geografickým původem a migracemi lidských populací. V České republice byla provedena studie Y-STR haplotypu, která objasňuje haplotypové složení naší populace. Do studie bylo zahrnuto 1750 nepříbuzných mužů žijících v různých částech České republiky. S využitím PowerPlex Y^{TM} kitu od firmy Promega Corporation se analyzovalo dvanáct Y-STR lokusů. Celkem bylo nalezeno 1148 různých haplotypů, které patří do několika haploskupin. Nejčastějšími haploskupinami v naší populaci byly R1a

(36.94%) a R1b (24.78%), přičemž R1a haploskupina je charakteristická pro slovanské populace východní Evropy a haploskupina R1b je charakteristická pro západní Evropu. Ostatní nalezené haploskupiny měly frekvence výskytu menší než 10% - I1b1 (typická pro Apeninský poloostrov) se vyskytovala s frekvencí 9,07%, I1a (typická pro Skandinávii a Pobaltí) byla zastoupena v 8,33% a E3b (typická pro severní a východní Afriku, Blízký Východ a Středozemí) měla frekvenci výskytu 6,63%. Dále zde byly zjištěny haploskupiny J2, G2, I1b2a, N, J1, Q, L, I1b2 a H [Zastera *et al.*, 2010].

9.6. Genogenealogie

Genogenealogie se zabývá pátráním po předcích a vzdálených příbuzných. V současné době probíhá v České republice projekt, který se zabývá sledováním souvislosti mezi paternálně děděnými genetickými markery a příjmením české mužské populace. Cílem této studie je ověření vazby mezi příjmením (které je většinou děděno paternálně) a genetickými markery nacházejícími se na Y chromozomu (Y-STR, Y-SNP) [8].

10. ZÁVĚR

Ačkoliv je polymerázová řetězová reakce relativně mladou metodou, je to jedna z nejpoužívanějších molekulárně genetických metod. Během své krátké historie prošla PCR několika změnami, které výrazně zjednodušily, usnadnily a urychlily její používání. Také bylo vymyšleno mnoho modifikací PCR, které zlepšují možnosti amplifikace studovaného vzorku. Vývoj PCR metody jde neustále kupředu, proto se dá předpokládat, že budou do budoucna vymyšleny další modifikace a nadále se bude zlepšovat citlivost a specifičnost reakce.

Pro forenzní genetiku je PCR nepostradetelnou metodou využívanou pro zjištění genetického profilu jedince. Stejně jako PCR prošla i forenzní genetika obrovským vývojem. V dnešní době se metody forenzní genetiky uplatňují nejen v kriminalistické praxi, ale také během identifikace osob při hromadných katastrofách, při hledání vzdálených příbuzných nebo při zkoumání archeologických nálezů. Nicméně ne vždy fungují tyto metody tak, jak je popisováno v televizních seriálech. Například kontaminace materiálu či jeho nedostatek mohou způsobit, že i ty nejlepší metody selžou.

Do budoucna se předpokládá, že by se dalo pomocí metod forenzní genetiky určovat například stáří osob, fenotypové znaky nebo by se dala rozlišit jednovaječná dvojčata.

11. SEZNAM LITERATURY

Alonso, A., Martín, P., Albarrán, C., García, P., García, O., de Simón, L. F., García-Hirschfeld, J., Sancho, M., de la Rúa, C., Fernández-Piqueras, J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International* 139: 141-149

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R., Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465

Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23: 147

Aşıcıoğlu, F., Oguz-Savran, F., U. Ozbek, U. (2004). Mutation rate at commonly used forensic STR loci: Paternity testing experience. *Disease Markers* 20: 313-315

Balitzki-Korte, B., Anslinger, K., Bartsch, C., Rolf, B. (2005). Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene. *International Journal of Legal Medicine* 119: 291-294

Barbisin, M., Fang, R., O´Shea, C. E., Calandro, L. M., Furtado, M. R., Shewale, J. G. (2009). Developmental validation of the Quantifiler Duo DNA Quantification Kit for simultaneous quantification of total human and human male DNA and detection of PCR inhibitors in biological samples. *Journal of Forensic Sciences* 54 (2): 305-319

Barral, S., Lareu, M., V., Salas, A., Carracedo, A. (2000). Sequence variation of two hypervariable short tandem repeats at the D22S683 and D6S477 loci. *International Journal of Legal Medicine* 113: 146-149

Bartlett, J. M. S., Stirling, D. (2003). Methods in Molecular Biology, Vol. 226: PCR Protocols, Second Edition: Grunenwald, H.: Optimization of Polymerase Chain Reactions: 89-99

Bataille, M., Crainic, K., Leterreux, M., Durigon, M., de Mazancourt, P. (1999). Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Science International* 99: 165-170

Bellis, C., Ashton, K. J., Freney, L., Blair, B., Griffiths, L. R. (2003). A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International* 134: 99-108

Biesecker, L. G., Bailey-Wilson, J. E., Ballantyne, J., Baum, H., Bieber, F. R., Brenner, C., Budowle, B., Butler, J. M., Carmody, G., Conneally, P. M., Duceman,B., Eisenberg, A., Forman, L., Kidd, K. K., Leclair, B., Niezgoda, S., Parsons, T. J., Pugh, E., Shaler, R., Sherry, S., Sozer, A., Walsh, A. (2005). DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science* 310: 1122–1123

Bini, C., Ceccardi, S., Ferri, G., Pelotti, S., Alù, M., Roncaglia, E., Beduschi, G., Caenazzo, L., Ponzano, E., Tasinato, P., Turchi, Ch., Buscemi, L., Mazzanti, M., Tagliabracci, A., Toni, Ch., Spinetti, I., Domenici, R., Presciuttini, S. (2005). Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. *Forensic Science International* 153: 231-236

Bogenhagen, D., Clayton, D. A. (1974). The Number of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Genomes in Mouse L and Human HeLa Cells. *Journal of Biological Chemistry* 249 (24): 7991-7995

Bookout, A. L., Mangelsdorf, D. J. (2003). Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling* 1, e012

Budowle, B., Moretti, T. R., Niezgoda, S. J., Brown, B. L. (1998). CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: Law enforcement tools. In: Second European Symposium on Human Identification, Promega Corporation, Madison, Wisconsin: 73–88.

Butler, J. M. (2005). FORENSIC DNA TYPING, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Second edition: 71

Caratti, S., Rossi, L., Sona, B., Origlia, S., Viara, S., Martano, G., Torre, C., Robino, C. (2010). Analysis of 11 tetrameric STRs in wild boars for forensic purposes. *Forensic Science International* 4: 339-342

Castella, V., Dimo - Simonin, N., Brandt - Casadevall, C., Mangin, P. (2006). Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. *Forensic Science International* 156: 70-73

Craft, K. J., Owens, J. D., Ashley, M. V. (2007). Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of Quercus evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Science International* 165: 64-70

Csete, K., Beer, Z., Varga, T. (2005). Prenatal and newborn paternity testing with DNA analysis. *Forensic Science International* 147S: S57-S60

Divne, A.-M., Allen, M. (2005). A DNA microarray system for forensic SNP analysis. *Forensic Science International* 154: 111-121

Divne, A.-M., Edlund, H., Allen, M. (2010). Forensic analysis of autosomal STR markers using Pyrosequencing. *Forensic Science International: Genetics* 4: 122-129

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics* 49: 746–756

Fleming, R. I., Harbison, S. A. (2010). The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Science International: Genetics* 4: 244-256

Frohman, M. A. (1994). On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods and Applications* 4: 540–558

Gabriel, M. N., Huffine, E. F., Ryan, J. H., Holland, M. M., Parsons, T. J. (2001). Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy. *Journal of Forensic Science* 46 (2): 247-253

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *The Proceedings of the National Academy of Science* 77 (11): 6715-6719

Gill, P., Fereday, L., Morling, N., Schneider, P. M. (2006a). The evolution of DNA databases - Recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International* 156: 242-244

Gill, P., Fereday, L., Morling, N., Schneider, P. M. (2006b). New multiplexes for Europe — amendments and clarification of strategic development. *Forensic Science International* 163: 155–157.

Girish, P. S., Anjaneyulu, A. S. R., Viswas, K. N., Anand, M., Rajkumar, N., Shivakumar, B. M., Bhaskar, S. (2004). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science* 66: 551-556

Goossens, V., Sermon, K., Lissens, W., De Rycke, M., Saerens, B., De Vos, A., Henderix, P., Van de Velde, H., Platteau, P., Van Steirteghem, A., Devroey, P., Liebaers, I. (2003). Improving clinical preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis by duplex PCR using two polymorphic markers or one polymorphic marker in combination with the detection of the ΔF508 mutation. *Molecular Human Reproduction* 9 (9): 559-567

Green, R. L., Roinestad, I. C., Boland, Ch., Hennessy, L. K. (2005). Developmental validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *Journal of Forensic Sciences* 50 (4): 1-17

Griffais, R., André, P. M., Thibon, M. (1990). Synthesis of digoxigenin-labeled DNA probe by polymerase chain reaction: application to Epstein- Barr virus and Chlamydia Trachomatis. *Research in Virology* 141: 331-335

Hashiguchi, K., Bohr, V. A., de Souza-Pinto, N. C. (2004). Oxidative stress and mitochondrial DNA repair: implications for NRTIs induced DNA damage. *Mitochondrion* 4: 215-222

Henegariu, O., Heerema, N. A, Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23**:** 504-511

Herman, J. G., Graff, J. R., Myőhänen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Medical Sciences* 93: 9821-9826

Honda, K., Roewer, L., de Knijff, P. (1999). Male DNA typing from 25-year-old vaginal swabs using Y chromosomal STR polymorphisms in a retrial request case. *Journal of Forensic Sciences* 44: 868-872

Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20 (7): 1717-1723

Imaizumi, K., Akutsu, T., Miyasaka, S., Yoshino, M. (2007). Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine* 121: 184-191

Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, G. H., Brow, M. A. D. (1988). DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 9436- 9440

Innis, M. A., Sninsky, J. J., Gelfand, D. H. (1999). PCR applications: protocols for functional genomics. chap. 12: Hully, J. R. In situ PCR: 169-196

Isenbarger, T. A., Finney, M., Ríos-Velázquez, C., Handelsman, J., Ruvkun, G. (2008). Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Applied and environmental microbiology* 74 (3): 840–849

Ju, J., Ruan, Ch., Fuller, C. W., Glazer, A. N., Mathies, R. A. (1995). Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 4347-4351

Kayser, M., Sajantila, A. (2001). Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Science International* 118: 116-121

Klenow, H., Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from escherichia coli B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Science* 65 (2): 168-175

Krenke, B. E., Tereba, A., Anderson, S. J., Buel, E., Culhane, S., Finis, C. J., Tomsey, Ch. S., Zachetti, J. M., Masibay, A., Rabbach, D. R., Amiott,E. A., Sprecher, C. J. (2002). Validation of a 16 locus fluorescent multiplex system. *Journal of Forensic Sciences* 74 (4): 773–785

Lalueza-Fox, C., Gigli, E., Bini, C., Calafell, F., Luiselli, D., Pelotti, S., Pettener, D. (2010). Genetic analysis of the presumptive blood from Louis XVI, king of France. *Forensic Science International: Genetics*, doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.007

Lareu, M., Puente, J., Sobrino, B., Quintáns, B., Brión, M., Carracedo, A. (2001). The use of the LightCycler for the detection of Y chromosome SNPs. *Forensic Science International* 118: 163-168

Livak, K. J. (1999). Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5% nuclease assay. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 14: 143–149

Luptáková, L., Bábelová, A., Omelka, R., Kolena, B., Vondráková, M., Bauerová, M. (2010). Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene. *Forensic Science International*, doi: 10.1016/j.forsciint.2010.08.012

Lutz, S., Weisser, H.-J., Heizmann, J., Pollak, S. (1998). Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *International Journal of Legal Medicine* 111: 67-77

Mazars, G.-R., Moyret, C., Jeanteur, P., Theillet, Ch.-G. (1991). Direct sequencing by thermal asymmetric PCR. *Nucleic Acids Research* 19 (17): 4783

Moretti, T., Koons, B., Budowle, B. (1998). Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold™ DNA polymerase. *Biotechniques* 25: 716–722

Morley, J. M., Bark, J. E., Evans, C. E., Perry, J. G., Hewitt, C. A., Tully, G. (1999). Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *International Journal of Legal Medicine* 112: 241-248

Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* April 1990: 56-65

Ochman, H., Gerber, A. S., Hartl, D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 624-623

Palha, T. J. B. F., Rodrigues, E. M. R., dos Santos, S. E. B. (2010). Y-STR haplotypes of Native America populations from the Brazilian Amazon region. *Forensic Science International: Genetics* 4: 121-123

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23-28

Rashtchian, A., Thorton, C. G., Heidecker, G. (1992). A novel method for site-directed mutagenesis using PCR and uracil DNA glycosylase. *PCR Methods and Applications* 2: 124-130

Riggio, M. P., Lennon, A., Smith, A. (2001). Detection of *Peptostreptococcus micros* DNA in clinical samples by PCR. *Journal of Medical Microbiology* 50: 249-254

Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry* 242: 84-89

Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. (1998). A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* 281 (5375): 363-365

Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R., Chen, S. M. (1997). New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research* 25 (22): 4500–4504

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487– 91

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-54

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science* 74 (12): 5463-5467

Schneider, P. M., Martin, P. D. (2001). Criminal DNA databases: the European situation. *Forensic Science International* 119: 232-238

Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K., Donnelly, P. (2000). The mutation rate in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics* 66: 1599-1609

Slater, M., Selman, S., Mogilevsky, B., Ammons, H., Hartnett, J., (1998). *Pfu* DNA Polymerase: A High Fidelity Enzyme for Nucleic Acid Amplification. *Promega Notes* 68: 7-12

Sprecher, C., Krenke, B., Amiott, B., Rabbach, D., Grooms, K. (2000). The PowerPlex™ 16 System. *Profiles in DNA*: 3-6

Tagliaro, F., Smith, F. P. (1996). Forensic capillary electrophoresis. *Trends in Analytical Chemistry* 15 (10): 513-525

Tyagi, S., Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology* 14: 303-308

Vallone, P. M., Just, R. S., Coble, M. D., Butler, J. M., Parsons, T. J. (2004). A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International Journal of Legal Medicine* 118: 147-157

Vondrejs, V. (2001). Genové inženýrství II: 22-38

Whittle, M. R., Sumita, D. R. (2008). Quadruplex real-time PCR for forensic DNA quantitation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 86–88

Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Wallace, R. B. (1989). Allele-specific enzymatic amplification of β-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Genetics* 86: 2757-2760

Zastera, J., Roewer, L., Willuweit, S., Sekerka, P., Benesova, L., Minarik, M. (2010). Assembly of a large Y-STR haplotype database for the Czech population and investigation of its substructure. *Forensic Science International: Genetics* 4: e75-e78

Zhang, N., Yeung, E. S. (1996). Genetic Typing by Capillary Electrophoresis with the Allelic Ladder as an Absolute Standard. *Analytical Chemistry* 68: 2927-2931

Zhang, X., Ding, L., Sandford, A. J. (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 6:4

Internetové zdroje

1. Promega Corporation - Tfl polymeráza:
   http://www.promega.com/products/pcr/routine-pcr/tfl-dna-polymerase/

2. New England BioLab - Vent polymeráza:
   http://www.neb.com/nebecomm/products/productm0254.asp

3. Genaxxon bioscience - Pwo polymeráza:
   http://www.genaxxon.com/docs/pdf/3002_data.pdf

4. Promega Corporation - Tth polymeráza:
   http://www.promega.com/products/pcr/rt-pcr/tth-dna-polymerase/

5. http://thermalcycler.net/

6. Promega Corporation: www.promega.com

7. Applied Biosystems: www.appliedbiosystems.com

8. Genebáze - DNA analýza souvislosti paternálně děděných genetických markerů (Y-STR,Y-SNP) s příjmeními české mužské populace
   http://www.genebaze.cz/gap.html

Obr. 1: Kroky polymerázové řetězové reakce - převzato z Homepage of Andy Vierstraete
http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Obr. 2: Termocykler - převzato z ExtraGene
http://www.extragene-web.com/products/pcr-thermocycler-MG7072.htm

Obr. 3: Princip inverzní PCR - převzato z PCR STATION
http://www.pcrstation.com/inverse-pcr/

Obr. 4: Princip nested PCR - převzato z Institute for Viral Pathogenesis
http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm

Obr. 5: Princip alelově specifické PCR – převzato z SNP Scoring
http://las.perkinelmer.com/content/snps/protocol.asp

Obr. 6: Princip *In situ* PCR - převzato z PCR STATION
http://www.pcrstation.com/in-situ-pcr/

Obr. 7: Databáze CODIS zahrnující 13 STR lokusů - převzato z DNA Initiative
http://www.dna.gov/dna-databases/codis

Obr. 8: Schéma lidské mitochondriální DNA - převzato z Bioscience
http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/fulltext.asp?bframe=figures.htm&doi=yes