

Určení tělních tekutin založené na analýze nukleových kyselin

Marie Korabečná^{1,2}

¹ Ústav biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

² Lékařská fakulta UK v Plzni, Plzeň

SOUHRN

Přístupy molekulární genetiky dovolují izolovat nukleové kyseliny ze vzorků (DNA i RNA současně) a analýzu těchto molekul využít nejen pro individuální identifikaci původců stop, ale také pro stanovení původu tělní tekutiny, která sama či ve směsi tvoří příslušnou biologickou stopu. Takto získané údaje mohou výrazně přispět ke zvýšení procesní hodnoty stopy. Molekulárně genetické metody zde diskutované nabízejí v porovnání s široce využívaným spektrem chemických a imunologických testů nové možnosti – je možné jimi analyzovat všechny typy biologických tekutin a jejich směsí, mají konfirmační charakter.

Klíčová slova: tělní tekutiny – mRNA – mikroRNA – qPCR – metylace promotorů – mikrobiální DNA

Determination of body fluid based on analysis of nucleic acids

SUMMARY

Recent methodological approaches of molecular genetics allow isolation of nucleic acids (DNA and RNA) from negligible forensic samples. Analysis of these molecules may be used not only for individual identification based on DNA profiling but also for the detection of origin of the body fluid which (alone or in mixture with other body fluids) forms the examined biological trace. Such an examination can contribute to the evaluation of procedural, technical and tactical value of the trace. Molecular genetic approaches discussed in the review offer new possibilities in comparison with traditional spectrum of chemical, immunological and spectroscopic tests especially with regard to the interpretation of mixtures of biological fluids and to the confirmatory character of the tests. Approaches based on reverse transcription of tissue specific mRNA and their subsequent polymerase chain reaction (PCR) and fragmentation analysis are applicable on samples containing minimal amounts of biological material. Methods for body fluid discrimination based on examination of microRNA in samples provided so far confusing results therefore further development in this field is needed. The examination of tissue specific methylation of nucleotides in selected gene sequences seems to represent a promising enrichment of the methodological spectrum. The detection of DNA sequences of tissue related bacteria has been established and it provides satisfactory results mainly in combination with above mentioned methodological approaches.

Keywords: body fluids – mRNA – microRNA – qPCR – promoter methylation – microbial DNA

Soud Lek 2015; 60(3): 33-36

Aplikace molekulárně genetických metod při vyšetřování trestných činů je dnes samozřejmostí, zejména co se týče individuální identifikace původců jednotlivých biologických stop. Nezanedbatelnou hodnotu pro proces vyšetřování má však i správné stanovení typu biologické tekutiny obsažené ve stopě. Nejčastěji se jedná o krev periferní či menstruační, sperma, sliny, vaginální sekret, moč a pot. Vývoj různorodých technik založených na testech chemických, imunologických či mikroskopických nebo na spektroskopických metodách trvá již více než jedno století. Celé obrovské spektrum známých testů (sahajících od využití alternativních světelných zdrojů, čistě chemických i enzymy katalyzovaných reakcí přes užití protilátek, spektroskopické detekce metabolitů pomocí nukleární metabolické resonance až k Ramanově spektroskopii) lze zhruba rozdělit na testy orientační a konfirmační. S výjimkou Ramanovy spektroskopie (1) a metod využívajících nukleární magnetické resonance k detekci metabolitů (2) však testy nejsou univerzálně využitelné

pro určení všech v úvahu připadajících tělních tekutin, detekce každé z tekutin vyžaduje vlastní metodické řešení. Ramanova spektroskopie (1) i metody založené na nukleární magnetické rezonanci (2) pracují při interpretaci spekter získaných ze vzorků tělních tekutin s vysoce specifickým matematickým aparátem vyžadujícím zkušeného analytika, zatím chybí studie dokumentující rozsáhlejší nasazení těchto metod v kriminalistické praxi. Metodiky založené na imunofluorescenčních biosenzorech - nanoparticulích konjugovaných s protilátkami (3,4) - stejně jako spektroskopické metody sice nepoškozují DNA obsaženou ve vzorku, ale zatím umožňují identifikovat jen jednu (3) nebo dvě (4) tělní tekutiny. Problematika různých metodických přístupů k určování tělních tekutin je souhrnně zpracována například v článkách Virklera a Ledneva (5) nebo An a spoluautorů (6). Nezanedbatelnou výhodou každého potenciálně využitelného testu pak představuje možnost jeho použití přímo v terénu při vyšetřování místa činu, přičemž je třeba pečlivě volit metodu tak, aby ve stopě vzhledem k typu použitých reagentů či světelného zdroje nedošlo k poškození DNA nutné pro individuální identifikaci (5). V poslední dekádě byly vyvinuty testy založené na analýze mRNA, mikroRNA, metylaci DNA a vyšetření přítomnosti DNA tkáňově specifických mikroorganismů, které představují významné obohacení možností forenzní práce. Vzhledem ke svému charakteru spadají tyto testy do kategorie testů konfirmačních, zatím nevhodných pro terénní využití. Jejich hlavní výhodou spočívá v obecné využitelnosti napříč spektrem tělních

✉ Adresa pro korespondenci:

Doc. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN

Albertov 4, 128 00 Praha 2

e-mail: marie.korabecna@lf1.cuni.cz

tel.: +420 603 177 178