

# OBSAH

1	ÚVOD .....	5
2	IZOLACE DNA .....	6
2.1	Izolace DNA pomocí nosiče Chelex® 100 .....	6
2.2	Izolace DNA adsorpcí na pevnou fázi .....	8
2.3	Izolace DNA fenol-chloroformovou extrakční metodou.....	10
2.4	Izolace DNA technologií FTA® .....	10
2.5	Izolace DNA ze specifických biologických vzorků.....	10
2.5.1	Izolace DNA ze spermatu .....	11
2.5.2	Izolace DNA z vlasů .....	11
2.5.3	Izolace DNA ze zubů a kostí.....	12
3	AMPLIFIKACE DNA - POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE.....	13
3.1	Složky PCR-směsi .....	13
3.2	Průběh PCR .....	15
4	KVANTIFIKACE DNA .....	18
4.1	Přehled kvantifikačních metod .....	18
4.2	Kvantitativní PCR .....	19
4.3	Digitální PCR .....	26
5	ELEKTROMIGRAČNÍ TECHNIKY .....	29
5.1	Horizontální elektroforéza DNA v agarosovém gelu .....	29
5.1.1	Faktory ovlivňující elektroforetickou mobilitu DNA v agarosovém gelu .....	31
5.1.1.1	Velikost molekuly DNA a hustota gelu .....	31
5.1.1.2	Prostorové uspořádání DNA .....	32
5.1.1.3	Intenzita elektrického pole .....	33
5.1.1.4	Směr elektrického pole.....	33
5.1.1.5	Přítomnost interkalačních činidel .....	33
5.1.1.6	Složení elektroforetického pufru .....	33
5.2	Kapilární elektroforéza DNA.....	34
5.2.1	Příprava vzorku DNA a jeho nanesení.....	35
5.2.2	Separace DNA .....	36
5.2.3	Detekce DNA.....	37
6	PŘEHLED TYPŮ POLYMORFISMŮ .....	40
6.1	VNTR minisatelity .....	41
6.2	STR mikrosatelity .....	41
6.3	SNP .....	42
6.4	Inserční/deleční mutace.....	43
7	METODY ZÍSKÁNÍ INDIVIDUÁLNÍHO PROFILU DNA.....	44
7.1	Metody RFLP.....	44
7.2	Analýza autosomálních STR.....	48
7.2.1	Testované lokusy .....	48
7.2.2	Experimentální provedení.....	50
7.2.3	Vyhodnocení výstupních dat.....	54
7.2.4	Komplikace při vyhodnocení STR profilu.....	56
7.2.5	Statistická interpretace STR profilu.....	57
7.3	Analýza jednonukleotidových polymorfismů (SNP).....	60

7.4	<b>Liniové markery</b> .....	63
7.4.1	Liniové markery chromosomu Y .....	64
7.4.2	Mitochondriální DNA .....	66
7.4.2.1	Mitochondriální genom .....	67
7.4.2.2	Analýza mitochondriální DNA .....	67
8	<b>LABORATORNÍ ÚLOHY</b> .....	70
	Úloha 1: Izolace genomové DNA ze vzorku vlasu fenol-chloroformovou extrakcí ....	71
	Úloha 2: Izolace genomové DNA ze směsi epitheliálních buněk a spermií s použitím nosiče Chelex® 100 .....	74
	Úloha 3: Izolace genomové DNA z bukalního stěru na pevné fázi (komerční souprava „ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System“)..	77
	Úloha 4: Kvantifikace chromosomální DNA pomocí kvantitativní PCR .....	81
	Úloha 5: Kvantifikace autosomální a Y-chromosomální DNA pomocí komerční soupravy Plexor® HY .....	88
	Úloha 6: Analýza VNTR izolované chromosomální DNA (D1S80 lokus).....	91
	Úloha 7: Multiplexní amplifikace STR lokusů z izolované chromosomální DNA pomocí komerční soupravy PowerPlex® 16 HS .....	97
	Úloha 8: Multiplexní amplifikace Y-STR lokusů pomocí komerční soupravy Powerplex® Y23 .....	104
	Úloha 9: Sekvenační analýza mitochondriální DNA .....	107
	Úloha 10: PCR-RFLP analýza mitochondriální DNA .....	110
	Úloha 11: Elektroforéza DNA v agarosovém gelu .....	115
9	<b>PŘÍLOHY</b> .....	118
9.1	<b>Bezpečnost práce</b> .....	118
9.1.1	Základní povinnosti posluchače a zásady bezpečné práce v laboratoři .....	118
9.1.2	Stručné základy první pomoci.....	118
9.2	<b>Organizace akreditované forenzní laboratoře</b> .....	119
9.3	<b>Základy správného pipetování</b> .....	121
9.3.1	Technika pipetování.....	123
9.3.1.1	Nastavení objemu.....	123
9.3.1.2	Nasazení špičky.....	124
9.3.1.3	Vlastní pipetování .....	124
9.4	<b>Poissonovo rozdělení pravděpodobnosti</b> .....	126
9.4.1	Nízký počet cílových molekul .....	126
9.4.2	Střední počet cílových molekul.....	127
9.4.3	Vysoký počet cílových molekul.....	127
9.5	<b>Charakteristiky nepoužívanějších fluorescenčních barev používaných v STR soupravách a dalších genotypizačních technikách</b> .....	129
10	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	130
11	<b>LITERATURA</b> .....	131