



Korespondenční Seminář Inspirovaný Chemickou Tematikou

Seriál o detektivní chemii

Krvavé příběhy (ale bez střelného prachu)

Seriál o detektivní chemii – Krvavé příběhy (ale bez střelného prachu)

Autor: Karel Berka

Detektiv Chemie se smutkem vstal od mrtvé ženy. Zhruba 20 let, bývala hezká. Za její současný stav nejspíš mohla krvavá rána na čele. „Zvláštní, že kolem nejsou stopy krve,“ pomyslel si detektiv, „taková rána by měla hodně krváčet, a tady je jen troška krve.“ Stále v zamýšlení zabloudil pohledem ke kuchyni, kde ještě doutnaly zbytky požáru kuchyňské linky. „A jak do toho zapadá ten požár?“ Detektiv se zachmuřil a vytáhl sprej s lumínolem. Postříkal několik míst na dveřích, a cestu do kuchyně. Pak vytáhl UV lampičku a začal ta místa kontrolovat. Množství krvavých skvrn směrem ke kuchyni rostlo, ale krev byla i na klíče od dveří. Bez otisku. Znovu se podíval na mrtvou, tentokrát na ruce. Krev na nich neměla. „Zajímavé, asi tady máme vraždu. . .“, pronesl polohlasem a šel se podívat do kuchyně.

Jak už napovídá nadpis dnešního dílu a dohasínající ukáзка, dnes se budeme zabývat substancí, která jitrí chrípí – krví. Ale co to vlastně krev je?

Krev, my chceme krev

Krev je nejčastější, nejznámější a pravděpodobně i nejdůležitější důkazní materiál dnešních dní:

- Obsahuje DNA, kterou máme každý odlišnou (kromě jednovaječných dvojčat), což umožňuje použití genetických otisků (genetic fingerprinting);
- Lze určit krevní skupinu, která může zúžit seznam podezřelých;
- Rozklad krve může napomoci k určení času zločinu;
- Tvar a rozmístění kapek lze použít k rekonstrukci rozmístění zdroje krve (zraněných osob). Zanechává stopy, které se dají do určité vzdálenosti sledovat.

No dobře, ale je to krev?

Ne všechno zlato, co se třpytí, ehm, ne všechno je krev, co je tmavočervená skvrna. . . Prostě než začne detektiv plýtvat protilátkami, potřebuje vědět, jestli to, co má před sebou, je opravdu krev. Otázky nad skvrnou jdou zhruba v tomto pořadí:

Je to krev?

Těžká otázka. Krev je lehce alkalická kapalná směs složená z vody, buněk, proteinů a anorganických látek, která krouží cévním systémem, přičemž přináší zásobní látky a kyslík a odnáší buněčný odpad. Krev má větší viskozitu než voda a navíc se na vzduchu sráží. Při srážení se vytvoří temně červená sraženina a nažloutlá kapalina – sérum. Krev zůstává tekutá, dokud se pohybuje. Po smrti se krev srazí. Dárci krve mohou občas darovat i plasmu, což je taky nažloutlá kapalina. Od séra se liší tím, že ještě obsahuje proteiny, které mohou za srážlivost krve (např. protrombin a fibrinogen).

K odlišení krve od barvy se používají nejprve předběžné testy, které závisí buď na změně barevnosti, nebo na fluorescenci. Projedme si pár barevných testů:

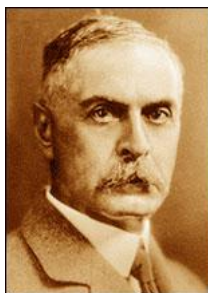
- **Kastle-Meyerův barevný test** používá směs fenolftaleínu a peroxidu vodíku s hemoglobinem. Směs pak zčernalá. Hlavní výhodou tohoto testu je jeho rychlost. Nevýhodou je, že některé kusy zeleniny obsahující peroxidázy taky způsobí zčernalení směsi. Nicméně není dvakrát obvyklé, aby byly na místě vraždy brambory nebo křen.
- **Tetramethylbenzidin** se aplikuje většinou na papírku. Ve styku s krví papírek získá modrozelenou barvu.

Fluorescenční metody jsou většinou podstatně citlivější než metody změny barvy:

- **Luminol** se rozpráší nad místem, kde se předpokládá, že byla krev, kterou se snažil vrah umýt, dokonce i na stěnách, které byly přemalovány. Luminol je extrémně citlivý (detekční limit je 0,1 ppb) a ve tmě pod ultrafialovým světlem všechny krvavé skvrny svítí. Problém je jeho citlivost na chlornany, takže v místech čištěných například savem je luminol nepoužitelný.
- **Fluorescein** se aplikuje stejným způsobem jako luminol. Má sice nižší citlivost, ale na druhou stranu nemá problém s chlornany. Jeho další výhodou je, že je viskóznější než luminol, a tak lépe drží na zdech, dveřích a jiných svislých plochách.

Je to krev lidská?

Zda je krev lidská, rozhodnou lidské protilátky v takzvaném antiséru. To se připraví vstříknutím lidského antigenu (prostě lidské krve) do králíka nebo jiného zvířete, který si proti antigenu vytvoří časem protilátky. Následně se králíkovi odebere jeho krev a protilátky proti lidským antigenům se vyzolují



Karl Landsteiner
(14. 6. 1868–26. 6. 1943)



Jan Janský
(3. 4. 1873–8. 9. 1921)

Obrázek 1: Karl Landsteiner & Jan Janský

do antiséra. Antisérum v dotyku s lidskou krví vytvoří precipitát, v dotyku s jinou krví se nevytvoří nic.

Víme, že máme před sebou lidskou krev, ale zbývá nám zodpovědět ještě jednu otázku:

Čí je to krev?

Aby mohli zodpovědět tuto otázku, zajímají se detektivové především o červené krvinky a sérum.

Červené krvinky mají na povrchu glykoproteiny (antigeny), na které se váží protilátky z cizí krve, případně na virus chřipky.

V séru se nacházejí protilátky. Reakce protilátek a antigenů je základem určování krevních skupin.

Poslední dobou se ovšem zkoumá i DNA, především takzvaná genetická daktyloskopie (DNA fingerprinting).

Krevní skupiny – ABO

Existence různých krevních skupin byla známa již od roku 1875, ale až Karl Landsteiner (obr. 1) roku 1901 pojmenoval a standardizoval krevní skupiny ABO¹.

Centrifugací oddělil červené krevní buňky od plazmy. Tu nechal na vzduchu srazit a centrifugací pak oddělil trombus (sraženinu) od séra. Do séra pak zkoušel přidávat krvinky z jiného zdroje a směs se mu občas srazila a občas ne. Postupně tak odhalil tři typy krve – A, B a C (později označovaný jako

¹Za což později dostal Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu v roce 1930.

Krevní skupina (procentní výskyt)	Antigen (červené krvinky)	Protilátka (sérum)	Genotyp
A (A+ 35 %, A– 5 %)	A	anti-B	AA, A0
B (B+ 8 %, B– 2 %)	B	anti-A	BB, B0
AB (AB+ 4 %, AB– 1 %)	A, B	ani anti-A, ani anti-B	AB
0 (0+ 39 %, 0– 6 %)	ani A, ani B	anti-A, anti-B	00

Tabulka 1: Krevní skupiny

0). Zde do příběhu vstupuje Jan Janský (obr. 1), který objevil i čtvrtou krevní skupinu AB, ale své čtyři skupiny značil římskými číslicemi I–IV.

V roce 1940 pak našel Landsteiner² ještě antigen Rh, takže krev, která jej má, se značí jako Rh+ (případně jen +) a krev, která jej nemá, jako Rh– (viz tabulka 1).

Krev samozřejmě obsahuje antigenů a protilátek víc (zatím bylo objeveno několik stovek obého), ale to už je jiná pohádka.

Malá odbočka k rodičovství

Krevní skupinu zdědíme po svých rodičích. Tento prostý fakt sérologům³ umožňuje rozhodovat o otcovství, případně o dědictví.

Tu samou krevní skupinu může určovat vícero genotypů (viz tabulka 1), přičemž geny pro A a B jsou dominantní, ale gen pro 0 je recesivní. A vzhledem k tomu, že jsme každý kombinací genů našich rodičů, tak je náš genotyp kombinací genotypů našich rodičů. Ukažme si to na příkladu:

Rodič s genotypem AA bude předávat svým potomkům pouze alelu A, zatímco rodič s genotypem A0 bude předávat polovině svých potomků alelu A a druhé polovině alelu 0. Pokud budeme předpokládat, že druhý rodič má krevní skupinu 0, pak jsou možnosti krevních skupin vidět v obrázku 2.

Přesnost určení rodičovství nicméně není příliš vysoká, protože stejnou krevní skupinu může mít poměrně mnoho lidí. Pro zvýšení přesnosti se dá testovat lidský leukocytový antigen (HLA). Pokud má dítě i otec stejný HLA profil, je přesnost určení otce již 90%. Nicméně takřka jistotou je porovnávání DNA rodiče a dítěte, které má přesnost určení již 99%.

²Landsteiner zemřel v roce 1943 s pipetou v ruce, když ho v laboratoři skolil infarkt.

³Sérolog – pracovník zabývající se krví.

	O	O
A	AO	AO
A	AO	AO

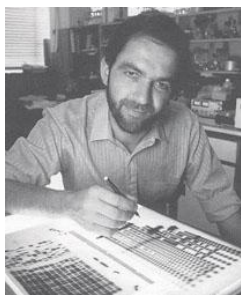
	O	O
A	AO	AO
O	OO	OO

Obrázek 2: Krevní skupiny dětí rodičů se skupinami A a 0

DNA

DNA je komplexní polymer tvaru dvoušroubovice, který vytváří dlouhé řetězce známé jako chromozomy. Lidé mají celkem 46 chromosomů, které jsou uspořádány v 23 párech v každém buněčném jádře. Tedy s dvěma výjimkami – lidské červené krvinky nemají jádro vůbec (až na některé případy z Blízkého východu) a na sexuální buňky – jak spermie tak vajíčko, které mají jen polovinu chromosomů. Každý z nás má v DNA zhruba 3 biliony párů bazí (zkratka je bp) uspořádaných v lineární sekvenci na chromozomech. Každý chromozom (s výjimkou pohlavních) je přítomen v páru. Jeden z chromosomů pochází od matky a druhý od otce. Počet možných sekvenčních kombinací je astronomický. Na chromozomech se nacházejí tzv. loci (jednotné číslo locus), což je fixní pozice genu, případně jiné genetické značky. Variantě DNA pro daný locus se říká alela.

Nicméně velké množství našeho genomu sdílíme nejen se všemi ostatními lidmi, ale do značné míry třeba i se šimpanzi. Jak jde unikátnost dohromady se sdílením stejného? V roce 1985 potvrdil unikátnost každého z nás tým kolem Aleca Jeffreyse (obr. 3) na Leicesterské universitě. Objevili, že určitá místa na DNA podléhají polymorfismu, tj. liší se u každého z nás. Na základě tohoto zjištění Jeffreys vymyslel metody na izolaci a analýzu těchto částí lidské DNA – genetickou daktyloskopii (DNA fingerprinting).



Obrázek 3: Sir Alec John Jeffreys, FRS (9. 1. 1950 –)

Polymorfismus důležitý pro genetickou daktyloskopii se nachází v junk-DNA⁴. Tyto části se liší svou délkou a sekvencí. Některé sekvence se dokonce několikrát opakují. A právě po opakujících sekvencích forenzní analýza pátrá. Rozlišují se dva základní druhy:

- **VNTR** (Variable Number Tandem Repeats) – Stejná sekvence („slovo“) se opakuje mnohokrát po celém locusu. „Slovo“ pak může mít stovky párů bazí a může se opakovat podél DNA mnohokrát.
- **STR** (Short Tandem Repeats) – „Slova“ jsou podstatně kratší než v případě VNTR. Nejčastěji mají něco mezi 3–7 bp. „Slova“ se opakují v úsecích kolem 400 bp, což v porovnání s 3 biliony bp v celé DNA znamená, že se dá použít DNA již poměrně hodně degradovaná, třeba z kosterních pozůstatků. Známe více STR oblastí, takže můžeme otestovat vzorek na více místech, a tím zvýšit přesnost metody.

Genetická daktyloskopie – jak to funguje

Příprava vzorku DNA pro analýzu není zdaleka tak jednoduchá jako typická daktyloskopie, nestačí ji jen tak vyzvednout na místě činu, ale musí se nejprve upravit do formy, kdy ukáže svá svědectví. Využívá se především elektroforézy, ať už gelové nebo kapilární.

1. Extrakce DNA

Vezmeme-li buňku, tak v ní je kromě DNA i spousta balastu typu membrán, cukrů, bílkovin, apod. Proto se nejprve musí buňky centrifugovat, abychom získali buněčná jádra. Pak přidáme guanidinhydrochlorid, abychom vyčistili a získali čistou DNA. K určení její koncentrace můžeme použít ethidiumbromid.

2. Porcování a amplifikace DNA

Většinu DNA k analýze ani nepotřebujeme. Proto si ji nejprve naporcujeme. Používají se dvě metody:

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – Pokud máme DNA dost, můžeme ji našítpat na kousky pomocí restričních endonukleáz. Ty hledají specifické místo, které pak rozštěpí. Je jich spousta, ale pro účely standardizace se v USA a Kanadě⁵ používá endonukleáza *HaeIII*, která štěpí DNA uprostřed sekvence GG|CC⁶. Výsledkem je směs různě velkých úseků DNA.

⁴Junk-DNA – DNA, která nekóduje žádný gen

⁵Co se používá u nás, se mi nepodařilo zjistit.

⁶Povšimněte si, že komplementární vlákno bude vypadat taky GGCC – opakování motivu na obou vláknech je pro restriční endonukleázy typické.

PCR (Polymerase Chain Reaction) – Pokud DNA nemáme dost, můžeme si ji namnožit metodou PCR. Tato metoda umí zmnožit vybrané známé úseky DNA exponenciální řadou.

3. Elektroforetická separace fragmentů

Ve chvíli, kdy máme DNA řádně rozštípanou a v dostatečném množství, musíme jednotlivé úseky DNA od sebe oddělit. K tomuto účelu se nejčastěji používá gelová elektroforéza na agarose. Protože DNA má záporný náboj, postupuje v gelu k anodě (+). Ale protože různě velké kusy DNA postupují gelem různou rychlostí, dojde k rozdělení jednotlivých fragmentů DNA do tzv. DNA profilu.

4. Přesun fragmentů na nylonovou membránu

Protože se s agarosovým gelem špatně pracuje, přenáší se DNA na nylonovou membránu. Tomuto procesu se říká Southern blot⁷. Předtím ale musíme DNA oddělit na jednotlivá vlákna, což učiníme pomocí hydroxidu sodného. Poté přiložíme na gel nylonovou membránu a jako by membrána byla utěrka vysajeme z gelu rozpouštědlo. S rozpouštědlem se pohybují i fragmenty DNA, které se uchytí na membráně. Membrána se pak umístí pod UV světlo, aby se DNA kovalentně přivázala k nylonu. Získáme otisk agarosového gelu.

5. Přidání hybridizačních sond

Na membránu poté nalijeme roztok s hybridizačními sondami – buď radioaktivně nebo fluorescenčně značených kraťouchkých kousků jednovláknové DNA, které se spojí s DNA na membráně. Pomocí detergentů, případně neionizovaného formamidu, se zabrání nespecifické vazbě sondy na nylon.

6. Vizualizace a identifikace

Když máme radioaktivní sondy, položíme na nylon film schopný zachytit záření, které vydává radioaktivně značená sonda. Získaný autoradiograf po vyvolání vypadá tak trošku jako čárový kód.

V případě fluorescenčních sond vložíme membránu pod UV zdroj a vyfotíme.

Jak se „čárový kód“ použije? Vezměme si například zločin, z kterého jsou podezřelé čtyři osoby. Všichni zapírají, ale policie našla na místě kapku krve, která patřila ještě někomu jinému než oběti. Otestuje se DNA podezřelých

⁷Kromě Southern blotu (detekce DNA) existuje i Northern blot (detekce RNA) a Western blot (imunologická detekce proteinů). Central a Eastern bloty ještě čekají na vymyšlení...

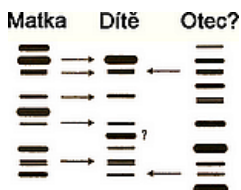
(obr. 4) a už tu máme tip na vraha. Krev je jeho. Schválně, jestli ho určíte. Řešení prozradím na konci tohoto dílu seriálu.



Obrázek 4: Příklad identifikace zločinu genetickou daktyloskopií

A znovu rodičovství...

DNA zdědíme po svých rodičích, ale jen polovinu od každého, takže nemáme absolutně stejný DNA profil jako maminka, ale zhruba polovina našeho profilu by měla být stejná. Nicméně dítě nemůže mít v DNA úseky, které nemá ani otec, ani matka (obr. 5).



Obrázek 5: Úsek označený otazníkem v DNA dítěte se nenachází ani v DNA matky, ani v DNA předpokládaného otce, což znamená, že dítě není jeho

Tím bychom mohli povídání o DNA skončit, ale věřím, že vám stejně jako mně vrtá hlavou, jak je možné získávat DNA z vlasů, když hlasy tvoří jen mrtvý molekulární odpad?

Jedinou živou částí vlasu je jeho kořínek. Proto můžeme z vlasů získat jadernou DNA jen tehdy, když odebereme vlas i s kořínkem. Ale co dělat, pokud jsou vlasy například ustríhnuty a kořínek zůstal na hlavě? Co pak?

Jak vlasy rostou, buňky v kořínku se dělí a procházejí změnou na vlas. Součástí této změny je i ztráta buněčného jádra. Nicméně DNA se neukrývá jenom v jádře, ale také v mitochondriích. A právě mitochondriální DNA se u vlasů testuje.

Zrovna tak se nemusí testovat jen DNA lidí. Prvním zvířetem, jehož DNA se testovala, byla roku 1994 kočka Sněhová koule (Snowball). Usvědčila svého

pána z vraždy jeho bývalé ženy. Na místě činu se totiž našly její chlupy, i když se spolu bývalí manželé nevidali.

Slovo závěrem

Jak je vidět, ať mlčíme, či ne, krev a DNA o nás mnohé prozradí. Třeba Vám prozradí i řešení úločky o genetické daktyloskopii. V příštím a ne nutně posledním díle se budeme věnovat exotermickým oxidacím. Že je to dost nudné téma? Naopak, je to téma mnohdy explozivní, a nebo alespoň působí požáry. A tak samozřejmě zajímá i detektivy. Nashledanou v dalším díle.

Literatura

1. Bell, Suzanne. *Forensic Chemistry*. 1st edition.: Pearson Education, 2006. 614 s. ISBN 0-13-147835-4.
2. LYLE, Douglas. *Forensics for Dummies*. 1st edition.: Wiley Publishing, 2004. 356 s. ISBN 0-7645-5580-4.
3. <http://en.wikipedia.org>

Krevní skupiny

4. Nobelova cena za fyziologii a medicínu roku 1930⁸ pro Karla Landsteinerja za jeho objev lidských krevních skupin.
5. J.F. Crow, Felix Bernstein and the First Human Marker Locus. *Genetics* **133** (1993): 4–7. – Genetika krevních skupin (a taky noticka o zmatku v dřívějším značení krevních skupin).

Genetická daktyloskopie

6. Případ lízátko⁹, pro mladé detektivy.
7. Marilyn A. Menotti-Raymond, Victor A. David & Stephen J. O'Brien, Pet cat hair implicates murder suspect.¹⁰ *Nature* **386** (1997) 774.
8. Písnička o použití metody PCR.¹¹

Řešení kvízu u obrázku 4: Krev byla krví podezřelého 3. Ale o tom, jestli je vrah, rozhodne až soud na základě dalších důkazů. Je možné, že krev na místě mohl zanechat i nevinně.

⁸http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/index.html

⁹<http://www.pbs.org/wgbh/nova/sheppard/labwave.html>

¹⁰<http://www.nature.com/nature/journal/v386/n6627/pdf/386774a0.pdf>

¹¹<http://bio-rad.cnpq.com/lsc/videos/ScientistsForBetterPCR/>