

Izrada DNA-profila čovjeka

Jakopec, Lana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:469157>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

IZRADA DNA-PROFILA ČOVJEKA

HUMAN DNA PROFILING

ZAVRŠNI RAD

Lana Jakopec
Preddiplomski studij biologije
Mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urić

Zagreb, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. POVIJESNI RAZVOJ METODA ZA IZRADU DNA-PROFILA	1
2.1. Godine prije DNA	1
2.1.1. Testiranja koristeći sustave krvnih grupa	1
2.1.2. Testiranja koristeći proteine	2
2.2. Početci DNA testiranja	3
3. METODOLOGIJA	8
3.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka	9
3.2. Metode izdvajanja DNA	9
3.2.1. Izdvajanje DNA pomoću organskih otapala	10
3.2.2. Izdvajanje DNA metodom Chelex® 100	10
3.2.3. Izdvajanje DNA metodom Qiagen	11
3.2.4. Ostale metode	11
3.3. Kvantificiranje DNA	12
3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine DNA u uzorku	12
3.3.2. Metoda “Yield” gel ili produkt gel	13
3.3.3. Hibridizacijska (<i>slot-blot</i>) metoda	13
3.3.4. Kvantifikacijski sustav <i>AluQuant Human DNA</i>	13
3.3.5. qRT-PCR	14
3.4. Polimorfizam duljine restrikcijskog ulomka	15
3.5. Lančana reakcija polimerazom	15
3.6. Detekcija PCR-rezultata	17
4. POSEBNI SLUČAJEVI: DEGRADIRANA DNA, MIJEŠANI UZORCI, MALE KOLIČINE DNA U UZORKU	18
4.1. Degradirana DNA	19
4.2. Miješani uzorci	19
4.3. Testiranje DNA u slučaju malog broja kopija	20
5. PRIMJENE DNA-PROFILIRANJA	20
6. LITERATURA	22
7. SAŽETAK	23
8. SUMMARY	23

1. UVOD

DNA profiliranje je proces određivanja karakteristika DNA nekog pojedinca. Poznato je da se samo 0,3% DNA u ljudskom genomu razlikuje od osobe do osobe, a upravo se ti dijelovi koriste pri utvrđivanju identiteta i izradi DNA-profila. DNA profiliranje je prvi put opisao engleski genetičar Alec Jeffreys 1985. godine. On je otkrio da određene regije DNA sadrže sekvencije koje se uzastopno ponavljaju te da se broj tih ponavljanja može razlikovati između pojedinaca (Butler, 2010). Ipak, najvažnije je otkriće PCR-a (engl. *Polymerase chain reaction*) ili lančane reakcije polimerazom, metode koja je revolucionirala proces analize DNA i omogućila njegovu široku primjenu u kliničkoj i forenzičnoj medicini (Primorac i sur. 2008). DNA profiliranje danas se koristi u brojne svrhe, njegova glavna primjena je u forenzičnim istraživanjima, pri utvrđivanju počinitelja nekog zločina, ali koristi se i za utvrđivanje očinstva, u imigracijskim slučajevima, te u istraživanju genetski nasljednih bolesti i proučavanju filogenije.

2. POVIJESNI RAZVOJ METODA ZA IZRADU DNA-PROFILA

2.1. Godine prije DNA

2.1.1. Testiranja koristeći sustave krvnih grupa

Prije početka upotrebe DNA za identifikaciju pojedinaca, forenzički laboratoriji koristili su druge genetičke biljege i metode za povezivanje sumnjivaca s tragovima na mjestu zločina. Te metode bile su prilično spore te su imale malu sposobnost diskriminacije (sposobnost utvrđivanja razlike između pojedinaca), ali su bile korisne za isključivanje pojedinaca koji nisu odgovarali uzorcima s kojima su se uspoređivali. Prva metoda koja je korištena za dobivanje genetičkih dokaza korištenih u sudskim postupcima je testiranje krvnih grupa, točnije ABO sustav krvnih grupa. Ovaj sustav otkrio je 1900. godine Karl Landsteiner, austrijski znanstvenik koji je radio na sveučilištu u Beču. On je uočio da pri miješanju

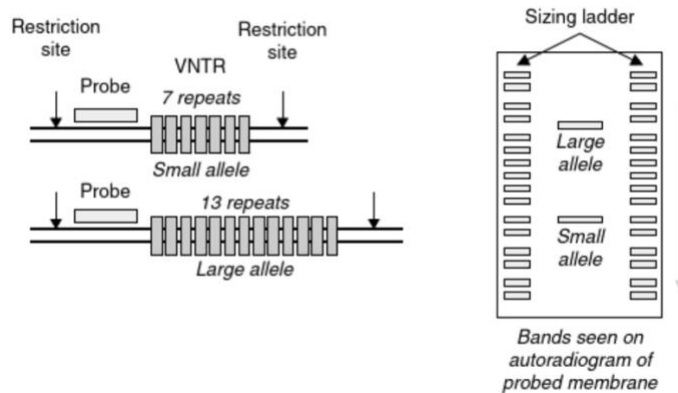
uzoraka krvi koji potječu od različitih osoba ponekad dolazi do zgrušavanja, odnosno aglutinacije. Na osnovu toga uspio je identificirati četiri različite krvne grupe: A, B, O i AB. Krvne grupe temelje se na polimorfizmima antigena na površini crvenih krvnih stanica, a ti antigeni mogu biti razlike u proteinima, ugljikohidratima, glikoproteinima ili glikolipidima. Antigeni se nasljeđuju od roditelja pa mogu biti korisni u utvrđivanju očinstva. Za utvrđivanje alela koji određuju antigene različitih krvnih grupa koriste se serološki testovi s antitijelima. Takve testove prvi je osmislio profesor Leone Lattes sa instituta za forenzičku medicinu u Torinu, Italija, te ih počeo koristiti na talijanskim sudovima 1915. godine. Ubrzo se korištenje ABO sustava krvnih grupa za dokazivanje očinstva i u forenzičke svrhe počelo koristiti u cijeloj Europi, a zatim i u SAD-u. Drugi korišteni sustav krvnih grupa bio je MN sustav, koji je otkriven 1927. Prema ovom sustavu postoje tri krvne grupe: M, N i MN. Rh faktor otkrio je Alexander Weiner 1937. proučavajući rezus majmune. U početku se pojedince označavalo kao Rh^+ ili Rh^- ovisno o tome imaju li na svojim eritrocitima Rh (D) antigen, a kasnije su se otkrili i drugi Rh faktori što je omogućilo istraživanje kompleksnijih kombinacija alela. Danas je poznato 30 različitih sustava krvnih grupa te ih je moguće odrediti pomoću DNA ili seroloških testova što se primjenjuje u forenzičkoj biologiji (Butler 2010).

2.1.2. Testiranja koristeći proteine

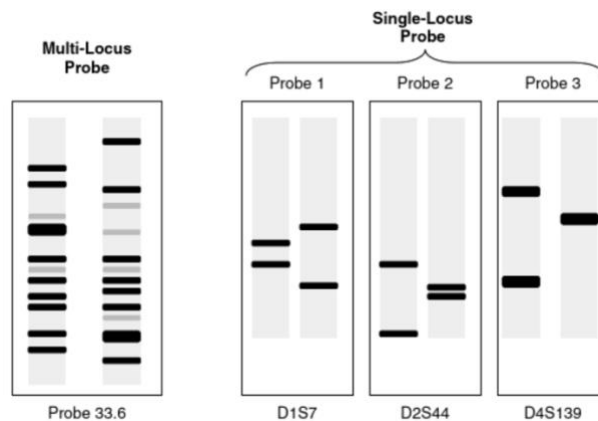
Sekvencije aminokiselina nekih proteina, kao što su izoenzimi (enzimi koji mogu katalizirati iste biokemijske reakcije, unatoč različitoj primarnoj strukturi) eritrocita i krvne plazme, mogu se razlikovati unutar ljudske populacije. Polimorfizmi proteina mogu se koristiti u profiliranju ljudi, međutim sposobnost razlikovanja pojedinaca je vrlo slaba zbog činjenice da postoji tek nekoliko različitih formi proteina (Butler 2010).

2.2. Početci DNA testiranja

Genetičar Alec Jeffreys je 1985. otkrio da određene regije DNA sadrže ponavljajuće sekvencije te da se one razlikuju od osobe do osobe. Te ponavljajuće sekvencije danas se nazivaju VNTR (engl. *variable number tandem repeats*) polimorfni biljezi. Sastoje se od ponavljajućih sekvencija koje mogu biti duljine od 5 do 100 baznih parova te se nazivaju i minisatelitima. Metoda koju je dr. Jeffreys koristio za otkrivanje biljega VNTR naziva se RFLP (engl. *restriction fragment length polymorphism*) jer se zasniva na korištenju restriksijskih enzima za izrezivanje regija DNA u kojima se nalaze ovi biljezi (Butler 2010). Metoda se sastoji od ekstrakcije DNA iz uzorka, dodavanja restriksijskih enzima koji cijepaju DNA na manje segmente (na točno određenim mjestima), koji se zatim razdvajaju elektroforezom na agaroznom gelu te se dodatkom etidijeva bromida vizualiziraju. Nakon toga se DNA metodom Southern blot prenosi na membranu na koju se dodaje radioaktivna sonda i izlaganjem membrane rendgenskim zrakama dobiva se specifični uzorak nalik na barkod (Saad 2005) (slika 1). Ovi uzorci bili su, smatrao je Alec Jeffreys, jedinstveni za svakog ispitanog pojedinca pa ih je nazvao “DNA-otiskom prsta” (Lynch 2003). Ipak, analizom uzoraka DNA članova obitelji, uočio je da su uzorci jedinstveni za roditelje, ali da je uzorak djeteta zapravo kombinacija uzoraka roditelja. To je zbog toga što je dijete naslijedilo po jedan alel od svakog roditelja (Saad 2005). U početnoj verziji metode RFLP koristile su se multilokusne VNTR-sonde, dakle jedna sonda je označavala više lokusa VNTR. Međutim, u slučajevima analize forenzičnih uzoraka koji su potencijalno sadržavali DNA više različitih kontributora, rezultate dobivene korištenjem ovakvih sonda bilo je vrlo komplicirano, ako ne i nemoguće interpretirati. Zbog toga se metoda RFLP morala modificirati tako da su se počele koristiti sonde koje označavaju samo jedan lokus. Razlika između jednolokusnih i multilokusnih sonda prikazana je na slici 2. Ova metoda prvi put se koristila za rješavanje slučaja imigracije u Engleskoj, a ubrzo nakon toga i u rješavanju slučaja dvostrukog ubojstva, koji se često naziva “Colin Pitchfork Case” (Butler 2010).



Slika 1. Prikaz procesa metode RFLP: vidljiva dva alela s različitim brojem ponavljajućih sekvencija i restrikcijska mjesta te uzorak koji se dobiva izlaganjem membrane rendgenskim zrakama



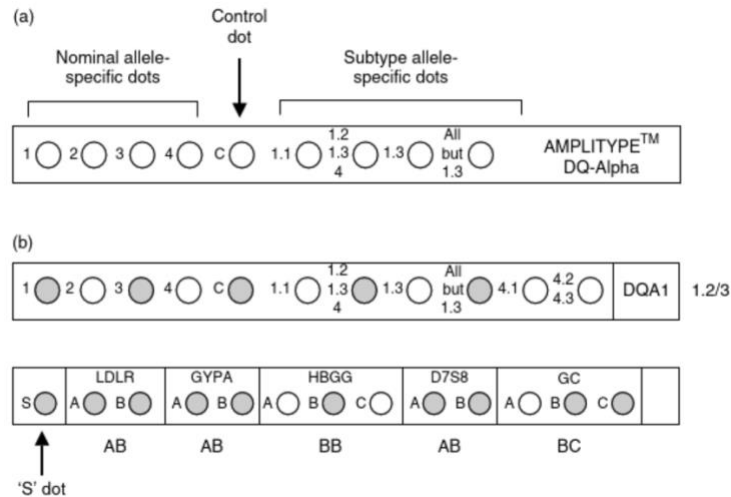
Slika 2. Razlika između korištenja sonde koje označavaju samo jedan lokus i multilokusnih sonde u metodi RFLP

Otprilike u isto vrijeme, Kary Mullis je razvijao još jednu tehniku za analizu DNA, lančanu reakciju polimerazom (PCR, engl *polymerase chain reaction*). Ova metoda omogućava stvaranje velikog broja kopija željenih regija DNA. Kako u to vrijeme još nisu bili prepoznati polimorfni genetički biljezi, koji bi se mogli koristiti pri PCR-u (STR-ovi), ova metoda ušla je u širu upotrebu tek nekoliko godina kasnije (Butler 2010).

Lančana reakcija polimerazom ili PCR enzimatski je proces u kojem se željena regija DNA umnaža kroz više ciklusa (uglavnom 25-35) kako bi se dobilo mnogo kopija određene sekvencije DNA. Ovu tehniku prvi je opisao Kary Mullis i njegovi suradnici iz Odjela za humanu genetiku Korporacije *Cetus*. Oni su 1985. godine u časopisu *Science* objavili rad u kojem su opisali reakciju specifičnog umnožavanja dijelova DNA *in vitro*, uz korištenje enzima DNA polimeraze izolirane iz bakterije *Escherichia coli*. Tri godine kasnije, 1988., objavili su novi rad gdje su uveli novu termostabilnu DNA polimerazu izoliranu iz bakterije *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Primorac 2008).

Ova metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na metodu RFLP: potrebne su manje količine DNA, brža je i ne zahtijeva rad s radioaktivnim izotopima. S druge strane, zbog njezine osjetljivosti postoji veća vjerojatnost kontaminacije te lokusi analizirani PCR-metodom imaju manje alela nego lokusi VNTR analizirani metodom RFLP (Primorac 2008). Lančanu reakciju polimerazom možemo nazvati uistinu revolucionarnom metodom jer je unaprijedila načine analize DNA i vrlo brzo postala jedna od najčešće primjenjivanih metoda u molekularnoj biologiji te ima vrlo široki spektar primjene u raznim poljima biologije, medicine, forenzike pa i društvenim znanostima (Joshi i Deshpande 2011).

Prvi korišteni PCR-sustav analizirao je lokus HLA-DQA1 koji je dio ljudskog histokompatibilnog sustava. *Cetus* korporacija razvila je komplet za analizu DNA temeljen na PCR-u, nazvan *Amplitype*[®] *DQ Alpha Amplification and Typing Kit*. Komplet je sadržavao 9 sonda koje su se vezale za specifične sekvencije i mogle detektirati 6 različitih alela. Na taj način bilo je moguće definirati 21 različit genotip, što je značilo da su u otprilike 16% slučajeva dvije osobe imale isti genotip. Zbog toga je bilo potrebno razviti nove PCR-sustave koji bi imali veću snagu isključivanja. Sljedeći takav sustav bio je *Amplitype*[®] *Poly-marker* koji je uz dio gena HLA-DQA1 umnažao nekoliko dodatnih gena, međutim ni taj sustav nije bio dovoljno precizan za korištenje pri izradi DNA baza podataka (Butler 2010, Primorac 2008). Na slici 3 prikazani su ovi PCR-sustavi.

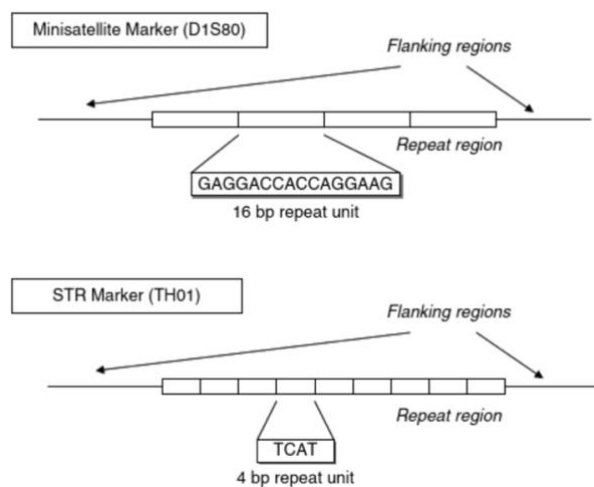


Slika 3. Prvi PCR-sustavi: a) *Amplitype DQ Alpha Kit* koje je mogao detektirati 6 različitih alela i b) unaprijeđeni *Amplitype Poly-marker Kit* koji je uz dio HLA-DQA1 gena mogao detektirati još pet dodatnih lokusa

AmpliFLP™ DIS80 PCR Amplification Kit bio je PCR-sustav koji je analizirao vrlo polimorfni VNTR-lokus D1S80 na 1. kromosomu, koji sadrži ponavljajuću sekvenciju od 16 bp, a njihov broj može varirati od 14 do 41. Snaga isključivanja ovog sustava također nije bila velika s obzirom da se analizirao samo jedan lokus, ali je u kombinaciji s drugim sustavima davao dobre rezultate (Butler 2010, Primorac 2008).

Nakon dugogodišnjeg korištenja lokusa VNTR, posebice u forenzičnim analizama, došlo je do otkrića novih, manjih biljega. Ovi biljezi nazivaju se kratke uzastopno ponavljajuće sekvencije (engl. *short tandem repeats* - STR) ili mikrosateliti (Primorac 2008). Sastoje se od ponavljajućih sekvencija duljine od 2-7 baznih parova koje se na pojedinom lokusu mogu ponoviti od 5 do 100 puta. U ljudskom genomu postoji oko 1000 ovakvih mikrosatelitskih lokusa (Saad 2005). Razlika između biljega VNTR i STR vidljiva je na slici 4. Otkriće biljega STR dovelo je do unaprjeđenja procesa analize DNA u smislu brzine i jednostavnosti, ali i mogućnosti da se promatra više STR-biljega istodobno u multipleksnim STR-sustavima čime se dobiva visoka sposobnost diferenciranja između pojedinaca (Primorac 2008). 1995. godine Ujedinjeno Kraljevstvo je uspostavilo nacionalnu DNA bazu podataka sa šest biljega STR koristeći detekciju fluorescencijom, čime su pokrenuli proces standardizacije biljega STR kakvi se danas koriste. U SAD-u se i

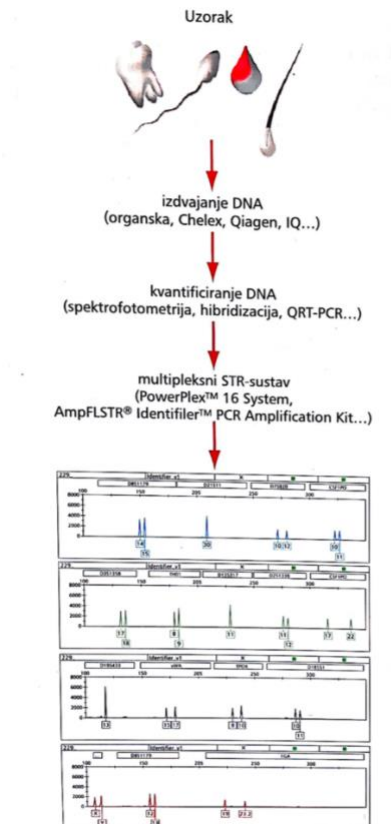
dalje koristila metoda RFLP sa sondama koje detektiraju jedan lokus VNTR, a neki su koristili i D1S80 i tripleks STR-analizu te detekciju bojenjem gela srebrnim nitratom. Nakon nekoliko godina većina laboratorija u svijetu prešla je na korištenje biljega STR i detekciju fluorescencijom (Butler 2010). U SAD-u je izabrano 13 STR-lokusa za bazu podataka naziva Kombinirani DNA indeksni sustav (engl. *Combined DNA indexing system* - CODIS) te su ti lokusi usklađeni s onima iz nacionalne baze podataka Velike Britanije i INTERPOL-a. Prednosti multipleksnih STR sustava, osim mogućnosti amplifikacije više lokusa istodobno, su mogućnost izravne detekcije sustava bez uporabe sonde, korištenje fluorescentno označenih početnica čime se mogu razlikovati PCR-multipleksi po valnim duljinama svjetlosti. Time je omogućena istodobna elektroforeza i detekcija većeg broja lokusa. Dva danas najčešće korištena komercijalno dostupna multipleksna STR sustava su *PowerPlex™ 16 System* i *AmpFLSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit* (Primorac 2008).



Slika 4. Prikaz biljega VNTR (minisatelita) i biljega STR (mikrosatelita). Sa svake strane ponavljajućih regija nalaze se regije za koje se veže DNA-početnica tijekom PCR-a

3. METODOLOGIJA

Osnovni koraci u procesu izrade profila DNA su izdvajanje DNA, kvantificiranje DNA, lančana reakcija polimerazom te detekcija i generiranje profila (slika 5).



Slika 5. Osnovni koraci u procesu izrade profila DNA: izolacija DNA iz uzorka, kvantificiranje DNA, lančana reakcija polimerazom te detekcija rezultata; krajnji rezultat je DNA-profil u obliku elektroferograma

3.1. Prikupljanje i pohrana uzoraka

Prvi koraci provođenja analize DNA u svrhu izrade profila su sakupljanje, pohrana i transport bioloških tragova (Primorac 2008). Razvojem metoda koje se danas koriste u profiliranju omogućeno je analiziranje vrlo malih količina DNA, ali je zbog toga potreban poseban oprez pri rukovanju tragovima, kako ne bi došlo do kontaminacije. Zato je pri provođenju ovih početnih koraka u procesu izrade DNA-profila iznimno važno strogo se držati propisane procedure (Gunn 2019). Sav sakupljeni materijal mora biti detaljno dokumentiran i sadržavati karticu na kojoj je naveden broj uzorka, datum, vrijeme, mjesto i ime osobe koja je uzorak prikupila. Svi uzorci koji su u tekućem ili vlažnom stanju prvo se moraju dobro osušiti kako bi se mogli spakirati i transportirati na mjesto daljnje analize. Uzorci se ne smiju trajno pohranjivati u plastičnu ambalažu već se ona smije koristiti samo za transport uzoraka do mjesta sušenja te takav transport mora trajati kratko kako se ne bi ubrzao proces degradacije. Za prikupljanje bioloških uzoraka koriste se sterilne rukavice od lateksa te se za svaki trag moraju upotrijebiti posebne rukavice kako bi se izbjegla kontaminacija prikupljenog materijala. Osobe koje prikupljaju biološke uzorke trebale bi nositi masku, a u nekim slučajevima potrebno je nošenje i jednodjelnog kombinezona i kape kako bi se spriječila potencijalna kontaminacija, ali i moguća zaraza tehničara. Svaki uzorak mora se spremirati u zasebno pakiranje te prilikom prikupljanja svakog od njih koristiti posebni, sterilni pribor. Ukoliko se radi o prikupljanju tragova u forenzičke svrhe, poželjno je da se u laboratorij dostavi i predmet s kojeg je uzorak skupljen. Biološki izvori iz kojih je moguće izolirati DNA za analizu su: krv, sperma, tkiva i organi, kosti i zubi, kosa, nokti, slina, mokraća, epitelne stanice (Primorac 2008).

3.2. Metode izdvajanja DNA

Prvi korak u procesu pripreme uzorka za analizu DNA je izdvajanje DNA. DNA se u stanici nalazi u kompleksu s proteinima, lipidima i mnogim drugim molekulama od kojih je potrebno DNA osloboditi i ukloniti ih kako ne bi kočile sljedeće korake u procesu analize kao što je umnažanje DNA PCR-om. Danas se koristi nekoliko različitih metoda izdvajanja DNA.

3.2.1. Izdvajanje DNA pomoću organskih otapala

Ova je metoda najuniverzalnija, odnosno može se koristiti na većini različitih uzoraka uz manje modifikacije pojedinih faza. Njome se uklanja velika količina proteina i ostalih molekula koje se oslobađaju pri razbijanju stanica te DNA ostaje u velikim komadima i veće je čistoće nego nakon ostalih metoda izdvajanja DNA. Loša strana ove metode je nemogućnost korištenja pri analizi uzoraka s vrlo malom količinom DNA. U prvoj fazi ovog postupka dodaje se određena količina digestivnog pufera, ovisno o prirodi i količini uzorka, kojem je uloga stvoriti stabilne uvjete za djelovanje proteinaze K (dodaje se kasnije) koja razgrađuje proteine. Ovaj pufer može biti različitog sastava, ali uglavnom sadrži tvari kao što su TRIS, NaCl, SDS i EDTA. Djelovanjem proteinaze K razgrađuju se membranski kompleksi unutar stanica i DNA ostaje slobodna u suspenziji. Ova suspenzija se prvo centrifugira, a zatim se dodatkom otopine fenol-kloroform-izoamilalkohola proteini i masti “obaraju” te se potom dodaje kloroform koji obara višak fenola i preostalih prljavština. Sljedeća faza je precipitacija DNA, a ovisno o količini i očekivanoj kakvoći DNA, za ovaj korak mogu se koristiti alkoholna ili *Centrikon*[®] metoda. Alkoholna metoda temelji se na izmjeničnom ispiranju apsolutnim i 70% -tnim alkoholom različitih temperatura, a ponekad može biti uključena i kratka inkubacija uzorka na -20°C. Ova metoda osobito je pogodna za uzorke s velikim količinama dobro očuvane DNA. Druga metoda bazira se na ispiranju otopine DNA kroz ultramembranu, na kojoj DNA zaostaje, a samo tekuća faza prolazi. Nakon toga dodaje se TE-pufer ili destilirana voda kako bi se DNA isprala u tubicu. Zatim se prelazi na metode koncentriranja DNA. Ova metoda koristi se kod uzoraka s malim količinama DNA koja je često i degradirana, međutim nedostatak joj je visoka cijena “centrikonki” zbog čega se ova metoda rjeđe koristi (Primorac 2008).

3.2.2. Izdvajanje DNA metodom Chelex[®] 100

Ova metoda pogodna je za korištenje na uzorcima s vrlo malim količinama DNA. Temelji se na kuhanju uzorka u prisutnosti tvorničkog pripravka pod nazivom Chelex[®] 100. To je ion izmjenjujuća smola koja se veže za polivalentne ione kao što su Mg²⁺. U sljedećem

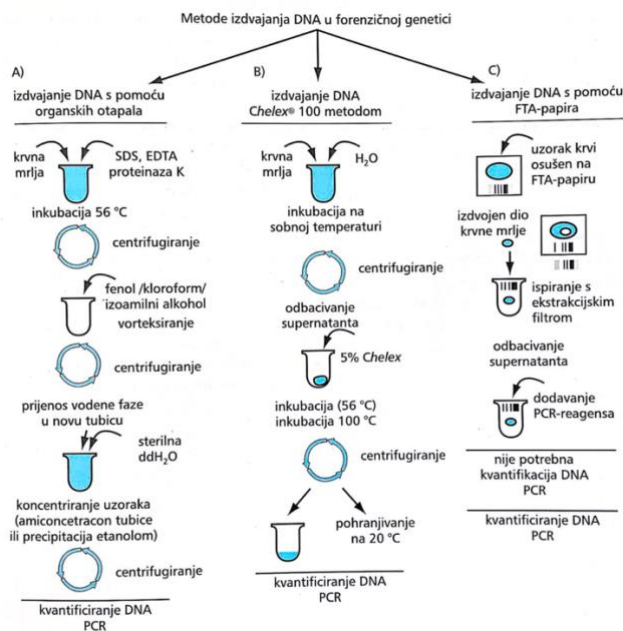
koraku uklanjaju se sve molekule vezane s Chelex[®] 100 te u otopini preostaje čista DNA. Nedostatak metode je rastavljanje dvostruke DNA uzvojnice pa se nakon nje može koristiti samo PCR-reakcija za umnažanje DNA, a metoda RFLP ne jer ona zahtijeva dvostruku DNA uzvojnici (Primorac 2008).

3.2.3. Izdvajanje DNA metodom Qiagen

Qiagen komplet je jedan od najpouzdanijih i najjednostavnijih ekstrakcijskih kompleta te se može koristiti na vrlo širokom spektru uzoraka (puna krv, krvne mrlje, opušci, dlake, tragovi sperme, kosti), a proizvodi se u više varijanti ovisno o vrsti uzorka. Procedura se sastoji od faze digestije proteinazom K, transfera i vezanja DNA na silika-membranu, pročišćavanja vezane DNA i ispiranja u posebne tubice (Primorac 2008).

3.2.4. Ostale metode

Postoji veliki broj metoda izdvajanja DNA, a danas se sve više, uz tipične laboratorijske metode, koriste komercijalni kompleti za izolaciju DNA. Jedna od najjednostavnijih i najbržih je metoda ispiranja koja se koristi kod nespornih tragova kao što su bukalna sluznica ili krvna mrlja. Tragovi se prikupe na karticu FTA[™] te se ispiru vodom slobodnom od DNA, centrifugiraju i treskaju izdvojeni djelovi kartice. Ova metoda, osim što je jeftina, u masovnoj je uporabi zbog postojanja automatskih izolacijskih jedinica čime se dobiva na brzini analize što je pogodno kod analize uzoraka koji se pohranjuju u nacionalne baze podataka (Primorac 2008). Metode često korištene za izdvajanje DNA prikazane su na slici 6.



Slika 6. Neke od metoda koje se koriste za izdvajanje DNA iz uzorka: A) metoda organskih otapala; B) *Chelex* metoda; C) metoda ispiranja s papira FTA

3.3. Kvantificiranje DNA

Jedna od najčešćih metoda koje se koriste za identifikaciju uzoraka analizom DNA je PCR. Za pravilno provođenje ove metode, najprije je nužno provesti metode kvantificiranja DNA. Njima se utvrđuje količina DNA, ali i potječe li određena DNA od ljudskoga izvora. Uzorci koji stižu na analizu često sadržavaju bakterijsku DNA ili tzv. inhibitore PCR-reakcija (Primorac 2008).

3.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine DNA u uzorku

Ova se metoda temelji na mjerenju transmisije svjetla kroz tekućinu te se time utvrđuje koncentracija DNA u uzorku. Također se može utvrditi i čistoća DNA, mjerenjem apsorpcije na valnim duljinama od 260 i 280 nm te prisutnost tvari koje kontaminiraju DNA, kao što su peptidi, fenoli i ugljikohidrati, mjerenjem na valnim duljinama od 230 nm. Nedostatci ove metode su to što zahtjeva velike količine DNA u uzorku te se njome

bilježi sva prisutna DNA, odnosno ne može diferencirati između DNA ljudskog podrijetla i one koja to nije (Primorac 2008).

3.3.2. Metoda “Yield” gel ili produkt gel

Izdvojena DNA nacijepi se na gel (najčešće agarozni) zajedno sa biljegom, tj. uzorkom poznate koncentracije te se na temelju stupnja fluorescencije, uspoređujući sa stupnjem fluorescencije biljeg-uzorka odredi količina DNA u uzorcima koje analiziramo. Ova metoda više nije često u upotrebi jer nije dovoljno precizna te se može koristiti samo u slučajevima kada imamo veće količine DNA u uzorku (Primorac 2008).

3.3.3. Hibridizacijska (*slot-blot*) metoda

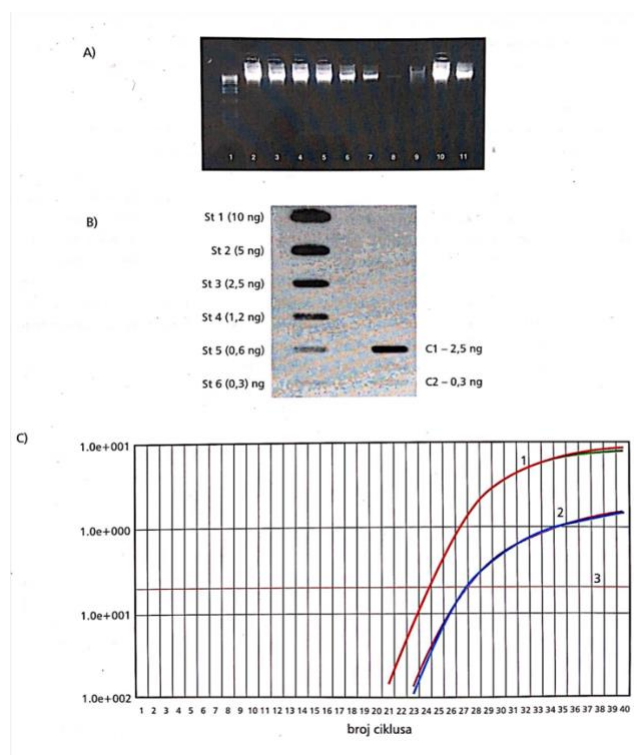
Metoda se temelji na hibridizaciji sonde koja sadrži dijelove ljudske DNA s DNA potencijalno prisutnom u uzorku. Izolirana DNA imobilizira se na membrani, veže se s DNA sondom specifičnom za ljudsku DNA te se rezultati usporede s pozitivnom kontrolom za koju su poznate koncentracije DNA. Ova metoda danas je jedna od najkorištenijih, može utvrditi vrlo male količine DNA te postoje komercijalni kompleti za provođenje ove metode. Najčešće korišteni komplet je *QuantiBlot Human DNA Quantitation Kit* u kojem se kao DNA sonda koriste sekvencije 17. ljudskog kromosoma (Butler 2010).

3.3.4. Kvantifikacijski sustav *AluQuant Human DNA*

Hibridizacijom visoko ponavljajućih sljedova na ljudskoj DNA iz uzorka sa DNA-sondom pokreće se niz enzimatskih reakcija koje rezultiraju oksidacijom luciferina i emitiranjem svjetlosti. Prema intenzitetu svjetlosti posredno se određuje količina DNA u uzorku. Ovom metodom mogu se utvrditi količine DNA od 0,1 do 50 ng ($1 \text{ ng} = 10^{-9} \text{ g}$) te je metoda vrlo pouzdana jer ne detektira DNA stranog podrijetla (Butler 2010, Primorac 2008).

3.3.5. qRT-PCR

Kvantitativna PCR-reakcija u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real Time PCR* - qRT-PCR) omogućuje određivanje količine, ali i kvalitete DNA prisutne u uzorku jer može detektirati i prisutnost inhibitora i odrediti stupanj inhibicije. Sve ove parametre nužno je odrediti prije provođenja reakcije PCR za umnažanje DNA kako bismo smanjili mogućnost neuspješne reakcije. Ova metoda temeljena je na mjerenju razlike u jačini fluorescencije u svakom ciklusu koja je rezultat umnažanja željene sekvencije DNA i povećanja broja kopija produkta reakcije PCR. Osim što je pouzdana, ova metoda je i vrlo jednostavna i kratkotrajna. Danas postoje različiti komercijalni kompleti, od kojih su najkorišteniji *Quantifiler™ Human DNA Identification Kit* i *Quantifiler™ Y Male Human DNA Identification Kit*. Prvi se koristi za kvantifikaciju DNA neovisno o spolu, a drugi za kvantifikaciju muške ljudske DNA, što ima primjenu u forenzičnoj analizi DNA, za analiziranje uzoraka povezanih sa seksualnim zločinima (Primorac 2008). Na slici 7 vidljive su neke od nabrojanih metoda za kvantificiranje DNA.



Slika 7. Metode kvantificiranja DNA: A) metoda produkt gela; B) hibridizacijska metoda; C) qRT-PCR

3.4. Polimorfizam duljine restrikcijskog ulomka

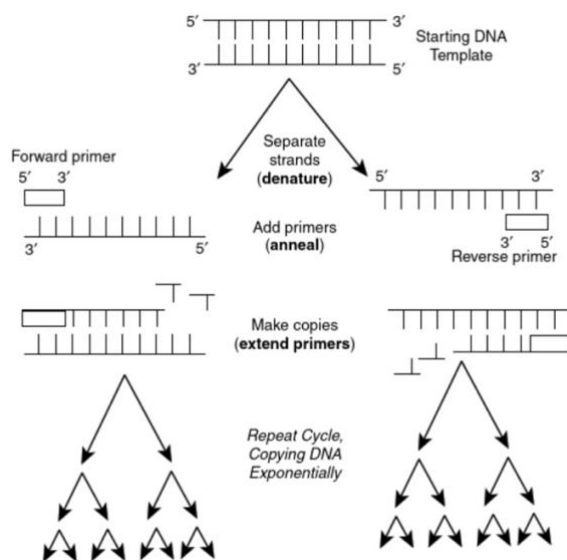
Ovo je metoda koja je prvi put primijenjena u forenzičnoj analizi DNA. Temelji se na cijepanju dvolančane DNA restrikcijskim endonukleazama čime se dobivaju ulomci DNA, koji se zatim odvajaju pomoću elektroforeze na agaroznom gelu. Tako odvojeni ulomci DNA prenose se na najlonsku membranu te se detektiraju pomoću radioaktivno ili kemiluminiscentno označene sonde koja se veže za specifične segmente DNA. Restrikcijske endonukleaze su enzimi izolirani iz bakterija koje ih koriste za obranu cijepanjem strane DNA. Svaki od ovih enzima cijepa DNA na točno određenom mjestu ovisno o redosljedu baza. Ovom metodom mogu se proučavati dvije vrste DNA-polimorfizama: promjene koje uključuju pojedinačne baze i minisatelitski VNTR, koji uključuju različit broj ponavljanja određene sekvencije DNA. Budući da je u prvom slučaju ograničen broj alela i korisnih lokusa, najčešće se koristila RFLP-analiza minisatelitskih lokusa VNTR. Ovi lokusi razlikuju se po duljini jer sadrže različiti broj ponavljajućih sljedova DNA na pojedinom lokusu. Ova metoda postupno je zamijenjena PCR-om zbog njezine dugotrajnosti i zahtjevnosti, a također i zbog toga što je bila potrebna relativno velika količina DNA za njezino uspješno provođenje (Primorac 2008).

3.5. Lančana reakcija polimerazom

Ova metoda temelji se na nekoliko saznanja o samoj DNA molekuli: ona je u nativnom stanju oblika dvostrukog heliksa sastavljenog od dva antiparalelna polinukleotidna lanca povezana vodikovim vezama između komplementarnih baza (adenin se uvijek povezuje s timinom, a citozin s gvaninom). Nukleotidi jednog polinukleotidnog lanca povezani su kovalentnim vezama između deoksiriboze jednog nukleotida i fosfatne skupine drugog. Budući da su vodikove veze, za razliku od kovalentnih, energetske slabe, one se pri povišenim temperaturama vrlo lako cijepaju (denaturacija), a pri hlađenju ponovo uspostavljaju (renaturacija) (Primorac 2008).

Lančana reakcija polimerazom odvija se u reakcijskoj smjesi sastavljenoj od DNA molekule koju želimo umnožiti, Taq-polimeraze, DNA-početnica (oligonukleotidnih sekvencija koje označavaju mjesto početka sinteze novog lanca) i deoksinukleozid trifosfata (dNTP-a). Tubice

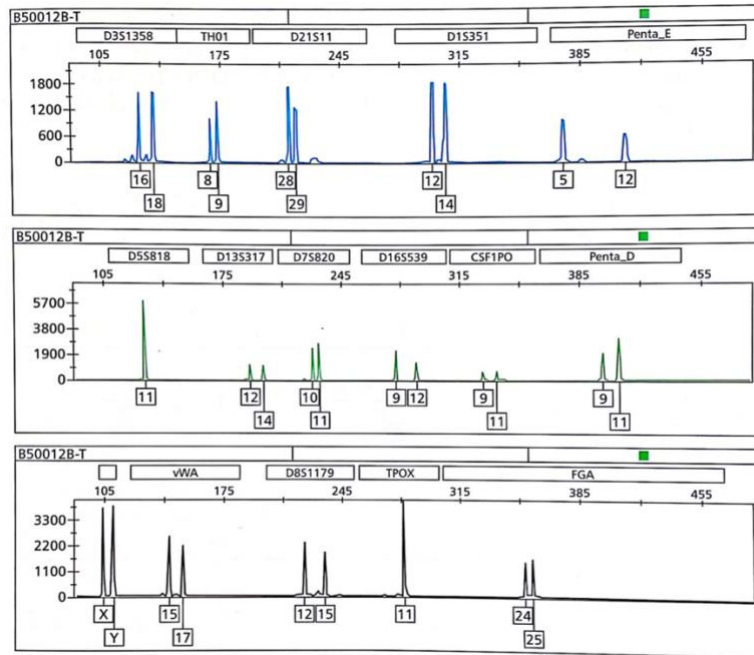
sa reakcijskom smjesom postavljaju se u uređaj koji omogućava brze i precizne promjene temperature potrebne za provođenje ove reakcije. Postupak je podijeljen na tri dijela koji se ponavljaju u svakom ciklusu: denaturaciju u kojoj se podizanjem temperature na 94°C razdvajaju polinukleotidni lanci, zatim hibridizaciju gdje se, snižavanjem temperature na između 40°C i 70°C, fluorescentno označene DNA-početnice vežu na regije koje se nalaze ispred segmenata DNA koje želimo umnožiti te produljivanje lanaca ponovnim podizanjem temperature na 72°C. To je temperatura pri kojoj je Taq-polimeraza aktivna, veže se na regiju jednolančane DNA gdje je vezana DNA-početnica te sintetizira komplementarni lanac koristeći dNTP-ove prisutne u reakcijskoj smjesi. Na taj način nakon svakog ciklusa količina DNA teoretski bi trebala biti dvaput veća nego u prethodnom ciklusu (slika 8). Obično je potrebno 20-40 ciklusa lančane reakcije polimerazom kako bi se dobila količina DNA dovoljna za daljnju analizu (Kadri 2019).



Slika 8. Lančana reakcija polimerazom: u prvom koraku temperatura se podiže kako bi se komplementarni lanci DNA odvojili (denaturacija), zatim se temperatura snižava kako bi se DNA-početnice vezale na specifične regije DNA (hibridizacija) i u posljednjem koraku temperatura se ponovno povisuje kako bi se sintetizirao novi lanac DNA (produljivanje lanaca)

3.6. Detekcija PCR-rezultata

Detekcija je finalna faza procesa izrade profila DNA. U slučajevima gdje se analiziraju regije čiji redoslijed baza nije unaprijed poznat, koristi se jedna od metoda sekvenciranja kao što su Maxam-Gilbertova metoda, Sangerova metoda ili automatsko sekvenciranje. Danas se najviše koriste automatske metode, ali sve one zasnivaju se na Sangerovoj metodi. Postoje dvije generacije automatskog sekvenciranja. U prvoj fluorescentni biljezi (u četiri različite boje) vežu se za početnice te je na taj način moguće pratiti produkte elektroforeze svih četiri zaustavljanja replikacija, zbog ugradnje dideoksi nukleotida. Ulomci DNA detektiraju se prolaskom kroz detektor, pri čemu dolazi do fluorescencije. Na taj način moguće je detektirati više različitih sekvencija istodobno. U drugoj generaciji koriste se fluorescentni biljezi vezani za *chain terminator*-nukleotid te je svaka baza različito obojena i fluorescira u različitom spektru. Vezanjem nukleotida s biljezima na DNA molekulu dolazi do zaustavljanja sinteze lanca DNA i vezanja fluora na kraj molekule. Sekvencije se također detektiraju prolaskom kroz detektor. Ako se koriste sustavi STR, nije potrebno provoditi sekvenciranje jer su slijedovi baza u ovim biljezima dobro poznati pa se utvrđuje samo broj ponavljanja određene ponavljajuće sekvencije. Boji se cijela početnica te se alelna varijanta koja se nalazi na određenom lokusu pobuđuje laserom, fluorescira te se na taj način može detektirati. U slučajevima kada se promatraju STR-multipleksi, koristi se više različitih boja te se istom bojom obilježavaju samo udaljeni lokusi, kako bi se mogli razlikovati ukoliko istodobno prolaze kroz detektor (Primorac 2008). Na slici 9 prikazan je elektroferogram dobiven obradom rezultata PCR-a u kojem je korišten multipleksni STR-sustav.



Slika 9. Prikaz računalno obrađenih rezultata (elektroferogram) dobivenih reakcijom PCR u kojoj je primijenjen jedan od multipleksnih STR-sustava

4. POSEBNI SLUČAJEVI: DEGRADIRANA DNA, MIJEŠANI UZORCI, MALE KOLIČINE DNA U UZORKU

Biološki uzorci koji se prikupljaju i šalju u laboratorij u svrhu analize DNA za izradu DNA-profila vrlo često su u lošem stanju. Ako su u pitanju biološki tragovi s mjesta zločina, moguće je da su bili izloženi lošim okolišnim uvjetima neko dulje vrijeme što je dovelo do postupne degradacije biološkog materijala, a time i manje kvalitete DNA u uzorku. Također, vrlo često je moguće prikupiti samo uzorke u kojima se nalaze minimalne količine DNA ili one u kojima se nalazi DNA više različitih osoba, tzv. miješani uzorci. Ovi slučajevi predstavljaju određene prepreke u analizi DNA. U sljedećim ulomcima bit će opisano na koji način se te prepreke mogu prevladati.

4.1. Degradirana DNA

Izloženost DNA okolišnim faktorima, kao što su voda, sunčeva svjetlost i enzimi nukleaze, dovodi do njene degradacije, odnosno cijepanja na manje dijelove. Ovakvu degradiranu DNA vrlo je teško, ako ne i nemoguće analizirati metodom RFLP jer ona zahtijeva molekule DNA velike relativne molekulske mase kako bi se mogli prepoznati VNTR-ovi. Za utvrđivanje kvalitete DNA u uzorku može se provesti analiza *yield gel* te ovisno o rezultatima zaključiti radi li se o degradiranoj DNA. Ona na gelu putuje u vrlo razvučenoj liniji, dok se DNA velike relativne molekulske mase vidi kao jedna uska linija. Metoda PCR kakva se danas koristi, primjerice ona u kojoj se koriste multipleksni sustavi STR, dobra je za analizu degradirane DNA jer su lokusi STR obično dovoljno kratki da ih se može detektirati čak iako su neki dijelovi DNA pocijepani. Ipak, pri ovakvoj analizi dobit će se samo djelomični DNA-profil jer će neki, obično veći lokusi STR ipak biti degradirani pa ih se neće moći amplificirati. Ovakvi djelomični profili DNA svejedno mogu biti korisni u nekim slučajevima. U radu koji su objavili Wiegand i Kleiber (2001) predloženo je korištenje novih DNA-početnica kojima bi se dobili kraći STR amplikoni, miniSTR-ovi. Ove početnice nalaze se bliže STR-lokusima od onih koje su se do tada koristile (Butler 2010).

4.2. Miješani uzorci

Miješani uzorci su uzorci u kojima pronalazimo više pojedinaca kao potencijalnih donora tih uzoraka. U DNA-profilima dobivenim analizom miješanih uzoraka pojavljuju se više od dva signala. Analiza DNA miješanih uzoraka može se podijeliti na šest koraka:

1. Identificiranje prisutnosti miješanog uzorka
2. Precizno utvrđivanje svih alelnih varijanti prisutnih u mješavini
3. Utvrđivanje broja mogućih donora uzorka
4. Utvrđivanje kvantitativnog omjera zastupljenosti pojedinačnih bioloških uzoraka svakoga od donora koji tvore mješavinu
5. Utvrđivanje svih mogućih genotipskih kombinacija
6. Usporedba s referentnim nespornim uzorcima

Rezultati analize DNA miješanih uzoraka mogu se interpretirati na dva načina ovisno o tome jesu li pojedini uzorci u mješavini jednako zastupljeni. Ukoliko su udjeli svih kontributora podjednaki može se, usporedbom DNA-profila ispitanika i DNA-profila mješavine, zaključiti da se ispitanik ne može isključiti kao donor uzorka. U situaciji kada su pojedini udjeli u mješavini različiti provode se statistički izračuni kojima se dolazi do vjerojatnosti da je ispitanik donor jednog od uzoraka u mješavini (Primorac 2008).

4.3. Testiranje DNA u slučaju malog broja kopija

DNA-testiranje s malim brojem kopija (engl. *low copy number* - LCN) odnosi se na analizu uzoraka u kojima se nalazi manje od 100 pg DNA, odnosno oko 15 diploidnih stanica. To uvjetuje brojne izazove. Pri radu s ovakvim uzorcima potrebno je posebno se pridržavati i provoditi mjere sprečavanje kontaminacije, kao što su nošenje zaštitne opreme i česta dezinfekcija svih površina i opreme u laboratoriju. Također se mora povećati broj ciklusa u PCR-u. Međutim, to nije uvijek najbolje rješenje jer na taj način može doći do gubitka alela, pojavljivanja dodatnog alela ili kontaminacije. To se može izbjeći provođenjem nekoliko nezavisnih PCR-reakcija jer je vjerojatnost da će se isti dodatni alel pojaviti u svakoj od njih manja od 1 %. Na taj način se mogu eliminirati aleli koji ne pripadaju tom profilu DNA. U konačnici se kao rezultat analize uzima sinteza svih rezultata provedenih PCR-reakcija (Butler 2010).

5. PRIMJENE DNA-PROFILIRANJA

Osim primjene u forenzičnim istraživanjima, za utvrđivanje identiteta počinitelja ili žrtve, DNA-profiliranje ima važnu ulogu i u utvrđivanju očinstva, identificiranju nestalih osoba ili žrtava u masovnim grobnicama, imigracijskim slučajevima, a također i u kliničkoj medicini za dijagnosticiranje genetskih poremećaja (Primorac 2008). DNA-profiliranjem koristeći sustave STR može se pratiti uspješnost transplantacije koštane srži na način da se proučava prisutnost stanica

donora u krvi i koštanoj srži primatelja. Na isti način mogu se testirati i leukociti pacijenata koji boluju od leukemije ili utvrditi uspješnost transplantacije organa (Saad 2005).

6. LITERATURA

1. Butler, J.M. (2010). *Fundamentals of forensic DNA typing*. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier.
2. Gunn, A. (2019). *Essential Forensic Biology*. Wiley.
3. Joshi, M., Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* 2, 81–97
4. Kadri, K. (2019). *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Perspectives on Polymerase Chain Reaction*.
5. Lynch, M. (2003). God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. *Endeavour* 27, 93–97.
6. Primorac, D., Marjanović, D., Lauc, G., Čurić, G., Gornik, I., Anđelinović, Š., Definis – Gojanović, M., Sutlović, D., Primorac, D., Pivac, T., Mršić, G., Uvodić, P., Markotić, A., LeDuc, J. W., Miller Coyle, H., Palmbach T. M., Asplen, C. (2008). *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Zagreb: Medicinska Naklada.
7. Saad, R. (2005). *Discovery, Development, and Current Applications of DNA Identity Testing*. Baylor University Medical Center Proceedings 18, 130–133.

7. SAŽETAK

DNA profiliranje danas je neizostavna procedura u forenzici i medicini kojom se utvrđuje identitet pojedinca. DNA profiliranje je prvi opisao genetičar Alec Jeffreys sa Sveučilišta u Leicesteru 1985. godine. On je uočio da neke regije DNA sadrže ponavljajuće sekvencije čiji se broj razlikuje između osoba. Za drugo važno otkriće je zaslužan Kary Mullis, koji je razvio postupak lančane reakcije polimerazom, metode koja je uistinu dovela do revolucije u profiliranju i analizi DNA općenito. Osnovni koraci izrade profila DNA su izdvajanje DNA, kvantificiranje DNA, lančana reakcija polimerazom te detekcija i generiranje DNA profila. DNA-profiliranje se danas primjenjuje u brojnim poljima znanosti, od forenzike i medicine pa sve do društvenih znanosti.

8. SUMMARY

Today, DNA profiling is an indispensable procedure in forensics and medicine that determines the identity of an individual. DNA profiling was first described by a geneticist Alec Jeffreys of the University of Leicester in 1985. He observed that some regions of DNA contain repetitive sequences whose number varies between individuals. Another important discovery is credited to Kary Mullis, who developed the polymerase chain reaction process, a method that truly led to a revolution in profiling and DNA analysis in general. The basic steps of DNA profile production are DNA isolation, DNA quantification, polymerase chain reaction and DNA profile detection and generation. Today DNA profiling is used in many fields of science, from forensics and medicine to the social sciences.