

MOGUĆNOSTI LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE

U HUMANOJ IDENTIFIKACIJI

Predrag STOJANOVIC, Zoran BUDIMLIJA i Miloš TASIĆ

Zavod za sudsku medicinu Kliničkog centra u Novom Sadu

Biološki tragovi se mogu naći u različitim formama, osnovno pitanje koje se prilikom analize bioloških tragova nameće jeste pitanje njihovog porekla, odnosno pitanje identiteta individue kojoj pripadaju ovakvi uzorci. Do sada najpreciznija metoda analize DNK je PCR - Polimerase Chain reacton (polimeraza lančana reakcija). Opisani su opšti postulati u vezi sa primenom ove metode u svrhe humane identifikacije, koja se primenjuje u Zavodu za sudsku medicinu u Novom Sadu.

Ključne reči: lančana reakcija polimeraze, humana identifikacija

Uvod

Biološki tragovi mogu se naći u različitim formama. Neke od njih su npr. krvne mrlje na različitim površinama, ejakulat, izolovan ili pomešan sa vaginalnim ili drugim telesnim sadržajima, dlake, segmenti kostiju, podnokatni sadržaj itd. Osnovno pitanje koje se prilikom analize bioloških tragova nameće jeste pitanje njihovog porekla, odnosno pitanje identiteta individue kojoj pripadaju ovakvi uzorci. Tradicionalni pristup ovom problemu bio je, pored klasičnih, fizičko-hemijskih ispitivanja, testiranje krvnograpne pripadnosti i proteinskih pripadnosti i proteinskih genetskih markera nalaženih u odgovarajućim uzorcima.

Metode koje se u sadašnje vreme koriste za analizu pomenutih i sličnih tragova, a zasnivaju se na analizi dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), više ne mogu biti smatrane novinom, o čemu govori i njihova nagla ekspanzija i veoma široka primena u eksperimentalne svrhe i u rutinskom radu, i to u oblastima molekularne biologije, genetskog inženjerstva, populacione genetike, medicinske dijagnostike, veterinarske i fitodijagnostike i terapije, kliničkih ispitivanja, farmaceutske industrije, sudske medicine, i drugih više ili manje sličnih oblasti ljudske delatnost!

Pokazano je da informacije koje nosi DNK mogu biti ekstrahovane iz najvećeg broja bioloških tragova, što omogućuje analizu genetskih varijacija

na ovom nivou. Zahvaljujući činjenici da svako ljudsko biće (sem jednojajčanih blizanaca) ima jedinstven genetski kod, genetska analiza na DNK nivou nudi i obećava apsolutnu identifikaciju, te je kao takva veoma koristan i pogodan princip u rešavanju zadataka postavljenih pred profesionalne timove i iz oblasti u sudskoj medicini.

Do sada najpreciznija metoda analize DNK je PCR - Polimerase Chain reaction (polimeraza lančana reakcija), koja predstavlja *in vitro* amplifikaciju odgovarajuće sekvence DNK po principu po kom se ovaj proces odvija pri replikaciji DNK *in vivo*.

DNK je molekul u obliku dvostrukog lanca koji nosi genske informacije živih organizama. Svaki od ovih lanaca sastoji se od niza nukleotida, a svaki nukleotid (dNTP) predstavlja kombinaciju odgovarajuće azotne baze (adenin, timin, guanin ili citozin), fosfatne grupe i šećera (u ovom slučaju dezoksiriboze).

Osnovni princip PCR-a predstavljen je generisanjem, odnosno amplifikacijom određenog DNK regiona, i to ponavljanjem ciklusa DNK replikacije po uzusima prirodnog puta. Tehniku, koja predstavlja eksponencijalno povećavajući amplifikacioni sistem u dobijanju krajnjeg produkta objavio je Kary Mullis (1985). Za ovo otkriće dobio je 1993. godine Nobelovu nagradu.

Da bi se reakcija PCR mogla da odvija neophodne su sledeće komponente:

1. DNK matrica;
2. prajmeri, tj. amplimeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima DNK sekvence koja se amplifikuje);
3. dezoksiribonukleotidi (dNTP), i
4. enzim DNK polimeraza.

Koncept reakcije je sledeći:

1. Da bi se dobila DNK matrica neophodno je razvijanje dvostrukog lanca DNK, pri čemu se dobijaju dva jednostruka lanca, od kojih je svaki matrica za naredni korak reakcije;

2. Hibridizacija, tj. proces vezivanja komplementarnog oligonukleotida, tj. prajmera (amplimera) za odgovarajući deo jednolančane matrice uspostavljanjem vodoničnih veza je najosetljiviji deo reakcije od koga praksično počinje formiranje prva dva lanca "nove" sekvence DNK;

3. Ekstenzija (elongacija) prajmera na 3'OH kraju sledstvenim dodavanjem dezoksiribonukleotida redosledom koji je određen sekvencom matrice, uz angažovanje DNK polimeraze.

Navedena tri koraka predstavljaju jedan ciklus, čijim se odgovarajućim brojem ponavljanja dobija količina tražene sekvence DNK koja je dovoljna za dalju analizu.

Neophodan uslov za izvođenje opisanih koraka ciklusa jeste postizanje odgovarajuće temperature za svaki segment ciklusa, i to u tačno utvrđenom

vremenu. Tako, inicijalna denaturacija (pre prvog ciklusa) traje uglavnom 3-5 min. na temperaturi od 95°C, dok svi kasniji koraci denaturacije mogu trajati 20 sek. - 1 min. na temperaturi 94-95°C. Hibridizacija se odvija na temperaturi 40-72°C i obično traje 20 sek. - 1 min. Elongacija se vrši na 72°C u trajanju od 20 sek. za kraće fragmente, odnosno 1 min. za duže fragmente. Broj ovakvih ciklusa je 25 do 35 i odvija se u posebno dizajniranim i kalibri sanim mašinama (*Thermal Cycler*).

Nakon izvođenja opisanog procesa neophodno je izvršiti identifikaciju PCR amplifikovanog fragmenta, što se najčešće vrši elektroforezom na gelu (pri čemu se DNK boji etidijum bromidom, fragmenti postaju vidljivi pod UV svetlom, i mogu se fotografisati) ili pak reverznim dot-blot detekcionim sistemom na najlonskoj membrani (korišćenjem avidin-enzim konjugat i biotinom obeleženih PCR produkata).

Postoji niz sistema za identifikaciju u okvirima humane populacije. U Laboratoriji za PCR u Zavodu za sudsku medicinu Kliničkog centra u Novom Sadu koristi se komercijalni *Perkin Elmer* PM+DQA1 amplifikacijski i detekcioni kit, certifikovan za forenzičnu upotrebu. Ovaj komplet pripada grupi tzv. ASO testova -alel specifični oligonukleotidi, što znači da se hibridizuju samo one sekvence koje se mogu prikazati na prethodno pripremljenim trakama za očitavanje bojenih reakcija.

U Zavodu za sudsku medicinu u Novom Sadu, opisana tehnika se koristi od početka 1997. godine, s tim daje u toku te godine vršeno testiranje opreme i postavljene laboratorijske linije proizvođača *Perkin Elmer* (SAD) u novoosnovanoj Laboratoriji za PCR, i to u saradnji sa Centrom za primenu i unapređenje PCR-a Biološkog fakulteta u Beogradu.

AmpliType PM + DQA1 kit, koji se koristi u našoj laboratoriji, optimiziran je za amplifikacije u reakcionim smešama fiksnog volumena od 100/μl.

Na osnovu dostupnih populacionih podataka koji ukazuju da ne postoje signifikantne devijacije u odnosu na Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum očekivanja 6 markera sadržanih u pomenutom kitu, što znači da je dobijena statistička nezavisnost alela na ovim lokusima. Ipak, neophodno je pomenuti da se pouzdanost tumačenja rezultata povećava sa brojem analiziranih lokusa, što znači da ih je potrebno analizirati onoliko koliko je neophodno da se dobije verovatnoca pronalaska dve istovetne genske šifre na analiziranim lokusima u populaciji koja je teoretski veća od broja članova raspoložive populacije (u krajnjem, dovedeno do apsurdna, to je broj stanovnika na planeti). I za ovakve analize u rutinskom radu se koristi odgovarajući, dovoljan broj lokusa.

Opisana tehnika je, zbog svoje pouzdanosti i minimalnih količina bioloških tragova koji mogu biti analizirani, u širokoj upotrebi u svetu. Praktično, sva tkiva mogu biti analizirana, a osnovna preporuka je da se biološki tragovi uzimaju na sledeći način:

- osoba koja uzima materijal koristi rukavice (poliestarske ili gumene), uzorak se posebno pakuje (u epruvetu, staklenu ili plastičnu bočicu, plastičnu ili papirnu vrećicu, i tome slično), označi (uz kratak opis mesta odakle je uzet) i transportuje. Dakle, procedura uzimanja bioloških tragova za PCR se ne razlikuje od uobičajene procedure pronalaženja i izdvajanja tragova biološkog porekla.

- krv: sveža u količini od bar 1 ml, uzeta sa Na-citratom (antikoagulans), ili suva mrlja na bilo kom materijalu;

- koža: površni delovi epidermisa;

- kosa: vlas sa korenom;

- semena tečnost (u bilo kom vidu);

- vaginalni sekret (bris);

- kosti;

- sva ostala tkiva.

Forenzička DNK tehnologija, dakle, podrazumeva stručno-naučni i pravni aspekt, predstavljajući pouzdan dokazni materijal u slučajevima analize svih vrsta bioloških tragova.

Literatura

Knight, B. (1996.) *Forensic Pathology.* Arnold. London.

Knight, B. (1997). *Simpson's Forensic Medicine.* Arnold. London.

Di Maio J.D. and Di Maio, J. V. (1993). *Forensic Pathology.* CRC Press. Boca Raton.

Dix, J. and Calaluce, R. (1999). *Guide to Forensic Pathology.* CRC Press. Boca Raton.

POSSIBILITES DE LA REACTION A CHAINE DE LA POLYMERASE DANS L'IDENTIFICATION HUMAINE

Predrag STOJANOVIĆ, Zoran BUDIMLIJA et Miloš TASIĆ

Foyer pour la medecine legale du Centre clinique de Novi Sad

On peut trouver les traces biologiques dans les diverses formes. La question de base qui s'impose pendant l'analyse des traces biologiques est la question de leur origine, c'est-à-dire la question de l'identité de l'individu à laquelle appartient telles échantillons. Jusqu'à présent la méthode la plus précise de l'analyse. DNA est PCR- Polymerase Chain Reaction (polymerase reaction a chaîne). Les auteurs ont décrit les

postulates generaux en relation avec cette methode pour l'identification humaine qui est applicable au Foyer pour la medecine legale a Novi Sad.

Les mots des: Reaction a chaine de la polymerase, l'identification humaine

POSSIBILITIES OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE HUMAN IDENTIFICATION

Predrag STOJ ANOVIC, Zoran BUDIMLIJA and Miloš TASIĆ

Institute for Forensic Medicine of the Clinic Center, Novi Sad

Biological traces can be found in various forms. The basic question to deal with during the biological traces' analysis is the one about their origin, that is, the question of identity of the person to whom such samples belong. Up to now the most precise method of the DNA is the PCR of Polymerase Chain Reaction. The general assumptions about applying the method for the purpose of human identification are described, namely, the one that is used in the Institute for Forensic Medicine in Novi Sad.

Key words: Polymerase chain reaction, human identification

Autor: Dr Predrag Stojanović, specijalista sudske medicine, Zavod za sudsku medicinu Kliničkog centra u Novom Sadu; kućna adresa: Novi Sad, Bate Brkića 9

(Rad je Uredništvo Diimilo 18. februara 2001. godine')