

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Katarina KARNIČAR

**GENETSKA TIPIZACIJA LAS V TELOGENSKI FAZI S PREISKAVO
SKRAJŠANIH LOKUSOV STR**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC TIPIZATION OF HAIR IN TELOGENIC PHASE WITH
EXAMINATION OF miniSTR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Centru za forenzične preiskave Ministrstva za notranje zadeve Republike Slovenije v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Katjo Drobnič, za recenzentko pa doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja.

Mentorica: prof. dr. Katja DROBNIČ

Recenzentka: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja DROBNIČ

Center za forenzične preiskave, Ministrstvo za notranje zadeve
Republike Slovenije

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina Karničar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.21: 343.98 (043) = 863
KG	forenzika/molekularne tehnike/lasje v telogenski fazi/fragmentirana DNA/skrajšani lokusi STR/modifikacija klasičnih ekstrakcijskih postopkov/novi začetni oligonukleotidi
AV	KARNIČAR, Katarina
SA	DROBNIČ, Katja (mentorica)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (recenzentka)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	GENETSKA TIPIZACIJA LAS V TELOGENSKI FAZI S PREISKAVO SKRAJŠANIH LOKUSOV STR
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 87 str., 20 pregl., 26 sl., 1 pril., 31 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Tipizacija DNA lokusov STR je v zadnjih letih postala eno izmed najboljših orodij v forenzičnih preiskavah. Tudi zelo majhne količine DNA, ki jo pridobimo iz raznih vzorcev, so lahko ustrezne za profiliranje DNA. To tehnologijo danes uporabljajo tudi na vzorcih las. Problem predstavljajo vzorci telogenskih las, pri katerih je DNA poleg tega, da je prisotna v zelo majhnih količinah, tudi močno fragmentirana (velikost fragmentov je približno 100 bp). Različne študije so pokazale uspeh tipiziranja takih vzorcev z modifikacijo klasičnih ekstrakcijskih postopkov in uporabo posebnih začetnih oligonukleotidov. Ti začetni oligonukleotidi so posebni v tem, da jih vežemo bližje ponovitvam STR, s tem pa dobimo produkte PCR krajše od 110 bp. V naši raziskovalni nalogi smo zato v postopek tipizacije DNA iz telogenskih las vpeljali spremembe pri ekstrakciji DNA in nove začetne oligonukleotide. Spremembe, ki smo jih vpeljali v ekstrakcijske postopke, so omogočile popolno razgradnjo las in večjo količino uporabne izolirane DNA. Novi začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v raziskovalni nalogi, prilegajo na lokusih FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin. Najboljše rezultate smo dobili pri paru začetnih oligonukleotidov lokusa TH01.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.21: 343.98 (043) = 863
CX	forensic science/molecular techniques/hair in telogen phase/fragmented DNA/miniSTR/modified procedures of extraction/new primers
AU	KARNIČAR, Katarina
AA	DROBNIČ, Katja (supervisor)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (reviewer)
PP	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	GENETIC TIPIZATION OF HAIR IN TELOGENIC PHASE WITH EXAMINATION OF miniSTR
DT	Graduation Thesis
NO	XII, 87 p., 20 tab., 26 fig., 1 ann., 31 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In recent years, DNA typing of STR loci has become one of the best instruments in forensic investigations. Even the smallest amounts of DNA, which can be extracted from a number of different samples, have shown to be suitable for DNA profiling. This technology is also used on hair samples. The problem are telogen hair, because the DNA is present at a very low amount and is highly degraded (about 100 bp in size). Several different studies have shown success in typing such hair when using modified procedures of extraction and special primers. The difference between classical primers and new ones is that new primers bind on the STR locus closer to STR repeats, which resulted in smaller amplicons, less than 110 bp in size. During our research we modified extraction procedures and used these new primers. These changes we introduced in the extraction procedure enabled a full degradation of hair and a higher quantity of DNA extracts. We ordered primers for five different loci (FGA, vWA, TH01, D3S1358 and amelogenin). The primers for locus TH01 have shown to be the most suitable.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	XI
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOLOŠKE SLEDI	3
2.2 LAS	4
2.2.1 Zgradba lasu	4
2.2.2 Lasni cikel.....	10
2.3 REPETITIVNA OZ. PONAVLJAJOČA ZAPOREDJA V ČLOVEŠKEM GENOMU	17
2.3.1 Minisateliti in mikrosateliti	18
2.3.1.1 Nomenklatura minisatelitov in mikrosatelitov	20
2.4 PREISKAVE DNA	20
2.4.1 Metode prstnega odtisa DNA in profiliranja DNA	21
2.4.1.1 Analiza lokusov STR ali profiliranje STR	23
2.5 TIPIZACIJA DNA IZ TELOGENSKIH LAS	25
2.5.1 Kontaminacija vzorca s tujo DNA	27
2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO OZ. PCR	27
2.6.1 Kontaminacija produktov PCR	28
2.6.2 PCR v realnem času	29
2.7 KAPILARNA ELEKTROFOREZA	32
3 MATERIALI IN METODE.....	35
3.1 VZORCI LAS	35

3.2 MORFOLOŠKA PREISKAVA LAS	36
3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN	36
3.4 ORGANSKA EKSTRAKCIJA DNA IZ LAS	37
3.5 EKSTRAKCIJA DNA IZ SLINE PO METODI CHELEX	40
3.6 KVANTIFIKACIJA DNA – METODA PCR V REALNEM ČASU ..	40
3.7 METODA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO (PCR).....	43
3.7.1 Pomnoževanje klasičnih lokusov STR	43
3.7.2 Pomnoževanje lokusov miniSTR.....	45
3.7.2.1 Kontrolna DNA	45
3.7.2.2 Vzorci	48
3.8 PROFILIRANJE STR.....	49
3.8.1 Kapilarna elektroforeza	49
3.8.2 Notranji velikostni standard (ROX)	50
3.8.3 Alelna lestvica	51
4 REZULTATI	53
4.1 MORFOLOŠKA STRUKTURA LAS	53
4.2 USPEŠNOST IZOLACIJE DNA IZ LAS	54
4.3 PROFILIRANJE STR.....	59
4.3.1 Negativne kontrole.....	59
4.3.2 Pozitivna kontrola	60
4.3.3 Vzorci, ki smo jih pomnoževali s standardnimi začetnimi oligonukleotidi iz komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification kit" (Applied Biosystems).....	61
4.3.4 Vzorci, ki smo jih pomnoževali z novimi začetnimi oligonukleotidi (miniSTR).....	67
4.3.4.1 Kontrolna DNA	67
4.3.4.2 Vzorci	73
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	77
5.1 RAZPRAVA	77
5.2 SKLEPI	82
6 POVZETEK.....	83
7 VIRI	84
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1:	Biomolekularne karakteristike lasnih komponent (McNevin in sod., 2005a)	str. 10
Preglednica 2.2:	Primerjava minisatelitov in mikrosatelitov (Tautz, 1993)	str. 19
Preglednica 3.1:	Oznaka vzorcev, pridobljenih od osmih različnih oseb	str. 35
Preglednica 3.2:	Pogoji pomnoževanja s PCR v realnem času	str. 41
Preglednica 3.3:	Koncentracije vzorcev standardnih DNA, uporabljenih za izris standardne krivulje (Quantifiler kits..., 2005)	str. 42
Preglednica 3.4:	Količini DNA in vode, ki smo ju dodali v PCR reakcijsko mešanico za posamezen vzorec pri uporabi komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus"	str. 44
Preglednica 3.5:	Pogoji pomnoževanja za komercialni komplet "AmpFISTR SGM Plus"	str. 44
Preglednica 3.6:	Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in velikost končnega fragmenta	str. 45
Preglednica 3.7:	Aleli kontrolne DNA 007, ki je del komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification..., 2004)	str. 46
Preglednica 3.8:	Reakcijski mešanici za pomnoževanje kontrolne DNA	str. 46
Preglednica 3.9:	Pogoji pomnoževanja 1 – mini BKA1	str. 47
Preglednica 3.10:	Pogoji pomnoževanja 2 - mini BKA2	str. 47
Preglednica 3.11:	Pogoji pomnoževanja 3 - mini STR1	str. 48
Preglednica 3.12:	Reakcijska mešanica za pomnoževanje alelne lestvice in vzorčnih DNA	str. 48
Preglednica 3.13:	Notranji velikostni standard "GS 500 ROX" (Perkin Elmer)	str. 50
Preglednica 3.14:	Aleli alelne lestvice komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification..., 2004)	str. 51

Preglednica 4.1:	Rezultati kvantifikacije vzorcev po metodi PCR v realnem času	str. 55
Preglednica 4.2:	Povprečne koncentracije DNA v ng/ μ l za različne vzorce telogenskih las po ekstrakciji v različnih ekstrakcijskih raztopinah	str. 57
Preglednica 4.3:	Rezultati profiliranja STR s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus", ki smo jih dobili pri analizi s kapilarno elektroforezo	str. 62
Preglednica 4.4:	Uspeh profiliranja STR glede na postopek izolacije DNA iz telogenskih las	pril. A

KAZALO SLIK

Slika 2.1:	Shematski prerez lasu, ki prikazuje glavne komponente lasnega stebila (Harding in Rogers, 1999)	str. 6
Slika 2.2:	Shematski prikaz strukture kutikule (Zviak in Dawber, 1986)	str. 9
Slika 2.3:	Lasni cikel (Ellis in sod., 2002)	str. 11
Slika 2.4:	Anageni folikel (Orfanos, 1979)	str. 12
Slika 2.5:	Mikroskopski prikaz lasu osebe A v anageni fazi pri 40-kratni povečavi	str. 13
Slika 2.6:	Katageni folikel (Orfanos, 1979)	str. 15
Slika 2.7:	Telogeni folikel (Orfanos, 1979)	str. 16
Slika 2.8:	Mikroskopski prikaz lasu osebe A v telogenski fazi pri 40-kratni povečavi	str. 17
Slika 2.9:	Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Arko, 2004)	str. 31
Slika 2.10:	Sistem kapilarne elektroforeze (Capillary electrophoresis..., 2006)	str. 33
Slika 3.1:	Mikrocentrikonka Microcon YM-30 (Millipore Catalogue..., 2006)	str. 39
Slika 3.2:	Elektroferogram alelna lestvice in notranjega velikostnega standarda.	str. 52
Slika 4.1:	Mikroskopski prikaz (pri 40-kratni povečavi) koreninskega predela las z vidnim okoliškim tkivom, izpuljen osebi A, označen z A24.	str. 53
Slika 4.2	Mikroskopski prikaz (pri 40-kratni povečavi) koreninskega predela las, izpadlih osebi A.	str. 53
Slika 4.3:	Elektroferogram negativne kontrole pri uporabi razgradne raztopine z dodanim CaCl_2 , pri pomnoževanju s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus"	str. 59
Slika 4.4:	Elektroferogram negativne kontrole pri uporabi raztopine BKA, pri pomnoževanju s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus"	str. 60

Slika 4.5:	Elektroferogram kontrolne DNA 007 pri uporabi komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus"	str. 61
Slika 4.6:	Elektroferogram vzorca A19	str. 64
Slika 4.7:	Elektroferogram vzorca A17	str. 65
Slika 4.8:	Elektroferogram vzorca A16	str. 66
Slika 4.9:	Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri pogojih mini BKA1	str. 68
Slika 4.10:	Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri pogojih mini STR1	str. 69
Slika 4.11:	Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri pogojih mini BKA2	str. 70
Slika 4.12:	Elektroferogram kontrolne DNA 007 in vzorca alelne lestvice	str. 72
Slika 4.13:	Elektroferogram vzorca osebe G in vzorca alelne lestvice	str. 73
Slika 4.14:	Elektroferogram vzorca alelne lestvice in vzorca A3	str. 75

KAZALO PRILOG

Priloga A: Uspeh profiliranja STR glede na postopek izolacije DNA iz
telogenških las

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

bp	bazni par
BSA	"bovine serum albumin", goveji serumski albumin
CCD	"charge-coupled device", optični sistem, ki sprejema fluorescentne signale in jih pretvarja v digitalno vrednost
CODIS	"Combined DNA Index System", podatkovna baza DNA profilov
C _T	"threshold cycle", cikel, pri katerem je presežen fluorescenčni prag
DNA/RNA	deoksiribonukleinska kislina/ribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
F	"forward primer", vodilni začetni oligonukleotid
IF	intermediarni filament
IPC	"internal PCR control", interna kontrola PCR
KAP	"keratin associated proteins", s keratinom povezani proteini
mtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kislina
nt	nukleotid
PCR	"polymerase chain reaction", verižna reakcija s polimerazo
R	"reverse primer", povratni začetni oligonukleotid
RFLP	"restriction fragment length polymorphism", analiza polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov
STR	"short tandem repeat", kratke tandemske ponovitve
VNTR	"variable number tandem repeat", variabilno število tandemskih ponovitev

1 UVOD

Z besedno zvezo biološke sledi lahko označimo sledi človeškega izvora. Biološke sledi lahko delimo glede na to, ali vsebujejo genetski material, torej DNA, ali ne. V kriminalističnem preiskovanju imajo velik pomen, saj nastajajo na različnih mestih in pri zelo različnih kaznivih dejanjih. Na podlagi sledi lahko identificiramo storilca kaznivega dejanja ali ga povežemo s krajem kaznivega dejanja (Drobnič, 2004). Na kraju zločina velikokrat najdemo las. Lasje so lahko nosilci genetskega materiala oz. DNA in kot taki povsem primerni in uporabni za forenzične preiskave (Majdič, 2004). Lasje v anagenski fazi odpadejo med travmatičnimi dogodki (nasilno puljenje), medtem ko lasje v telogenski fazi naravno izpadejo (50 do 150 na dan). Ponavadi na kraju zločina najdemo telogenske lase (McNevin in sod., 2005a).

V preteklosti so kot ustrezni vzorci las za tipizacijo veljali le lasje z adherentinimi celicami (torej tisti, pri katerih so prisotne epitelne celice – to so lasje v anagenski fazi). Namreč pri vzorcih las, kjer epitelnih celic ni bilo več, je bil uspeh tipiziranja zelo slab. Problem pa je, ker na kraju zločina večinoma najdemo prav lase oz. dlake v telogenski fazi (to pomeni brez adherentnih celic). Jedrna DNA se namreč v takih vzorcih razgradi na fragmente dolge približno 100 bp (Hellman in sod., 2001).

V zadnjih letih je tipizacija DNA lokusov STR postala eno izmed najboljših orodij v forenzičnih preiskavah. Tudi zelo majhne količine DNA, pridobljene iz različnih vzorcev, so ustrezne za profiliranje DNA. To tehnologijo so forenzični znanstveniki začeli uporabljati tudi na vzorcih las. Razvili so začetne oligonukleotide, ki tvorijo produkte PCR (amplikone), krajše od 110 bp. Rezultati študij so pokazali, da se je učinkovitost tipiziranja s skrajšanjem dolžine ampikonov STR povečala (Hellman in sod., 2001).

Primerna strategija za skrajšanje dolžine ampikonov je skrajšanje dolžine robnih (angl. flanking) regij, kar dosežemo tako, da izberemo začetne oligonukleotide, ki se vežejo bližje tandemskih ponovitev (Butler in sod., 2003; Hellman in sod., 2001).

1.1 NAMEN DELA

Namen moje diplomske naloge je bil izboljšati metodo profiliranja jedrne DNA in jo prilagoditi tipizaciji las iz telogenske faze.

Uporabili smo nove začetne oligonukleotide, s katerimi smo želeli skrajšati produkte PCR na manj kot 110 bp. Nato smo ugotavljali učinkovitost genetske tipizacije las v telogenski fazi (v primerjavi s klasično metodo tipizacije).

Poleg tega smo uporabili novo metodo izolacije DNA (modificiran postopek klasične izolacije), ki je omogočila popolno razgradnjo las, kar naj bi pripomoglo k večji učinkovitosti pri izolaciji DNA iz keratiniziranih celic.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bo nova metoda izolacije omogočala večji izkoristek pri izolaciji DNA iz keratiniziranih celic v laseh iz telogenske faze.

Predpostavili smo tudi, da bomo z novimi začetnimi oligonukleotidi lahko določili profile STR lasem iz telogenske faze, pri tem pa bodo nastali specifični produkti PCR, krajši od 100 bp.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOLOŠKE SLEDI

Biološka sled (v ožjem pomenu) se nanaša predvsem na sledi človeškega izvora. Biološke sledi lahko delimo glede na to, ali vsebujejo genetski material (DNA) ali ne. DNA se lahko uspešno izolira iz sveže krvi in krvnih madežev, sperme, lasu oz. dlake s korenino, sline, urina ali izbruhka, tkiva in celic, kosti in organov, ne more pa se izolirati iz človeških izločkov in sledi, ki nimajo celic z jedrom; to so serum (tekoči del krvi brez celic), solze in znoj (sam po sebi sicer nima celic, vendar lahko vsebuje kožni epitel in takrat je analiza mogoča). Biološke sledi v širšem pomenu pa tvorijo vse tiste materialne spremembe, ki so nastale ob izvrševanju kaznivega dejanja; lahko so človeškega, živalskega ali rastlinskega izvora (Drobnič, 2004).

Biološke sledi imajo v kriminalističnem preiskovanju velik pomen, saj nastajajo na različnih mestih in pri zelo različnih kaznivih dejanjih. Tako je biološke sledi mogoče najti na kraju ali v okolici kaznivega dejanja, na storilcu in njegovih oblačilih, na žrtvi in njenih oblačilih, na predmetih, ki so povezani s kaznivim dejanjem, storilcem ali žrtvijo. Na podlagi sledi lahko identificiramo storilca kaznivega dejanja ali ga povežemo s krajem kaznivega dejanja, lahko ugotovimo potek dogodka, način storitve kot tudi gibanje žrtve, storilca ali uporabo morilskega predmeta (Drobnič, 2004).

Uspešnost preiskave DNA je odvisna od vrste vzorca kot tudi od njegove ohranjenosti. Ponavadi gre za količinsko skromne vzorce, zato je nevarnost njihove kontaminacije, izgube, napačnega zavarovanja, pomešanja ali razgradnje zelo velika (Drobnič, 2004).

2.2 LAS

Lasje so lahko nosilci genetskega materiala oz. DNA in kot taki povsem primerni in uporabni za forenzične preiskave. V forenziki so lasje zanimivi predvsem v dveh pogledih: kot morfološko izredno raznolik biološki material in pogojno kot nosilci genetskega materiala (Majdič, 2004).

Las je sestavljen iz lasnega stebila, ki raste iz lasnega korena, usidranega v lasnem mešičku v koži lasišča. Razen bujno rastočih in delečih se celic v bazi lasnega korena je las mrtvo tkivo, zgrajeno iz keratina in sorodnih proteinov. Las nastaja z relativno hitro delitvijo proliferativnih celic v lasnem mešičku, ki je dobro prekrvavljen in tako oskrbovan s hranili oz. gradbenimi elementi, potrebnimi za njegovo rast. Novo nastajajoče celice se kmalu, že v lasnem mešičku, diferencirajo oz. preoblikujejo, keratinizirajo in pigmentirajo ter tvorijo mrtvo lasno steblo. Lasno steblo vsebuje vodo, lipide, minerale in pigment melanin, glavni gradbeni material pa je keratin. Las zraste povprečno 0,5 mm na dan, njegova življenjska doba pa je od 3 do 5 let. Vsak normalno poraščen človek ima v lasišču približno 100.000 do 150.000 las. Od vseh teh las jih je približno 90 % v fazi rasti (anagena faza), ostalih 10 % pa v fazi odmiranja (katagena in telogena faza) (Majdič, 2004).

2.2.1 Zgradba lasu

Lasni folikel ali mešiček imenujemo drobno jamico cevaste oblike, iz katere raste las. Na dnu mešička je las priraščen in odebeljen v lasno čebulico. Sestavljena je iz celic, ki z delitvijo tvorijo las. Čebulica je vgnezdена v mešičku in tvori matriks. V spodnjem delu se k čebulici stiska lasna brbončica ali papila, v kateri so krvne žilice. Lasna brbončica je pomemben sestavni del mešička, ki nadzira stanje in rast lasu. Če brbončica odmre, odmre tudi las. Če las zaradi katerega koli vzroka odmre, npr. da je bil izpuljen s korenino, brbončica pa je ostala nepoškodovana, na njegovem mestu zraste nov las (Zgradba lasu ..., 2006).

Anatomsko se las razdeli na lasno korenino, lasno steblo in lasni vrh. Lasno steblo je vidni del lasu, ki je nad površino kože, lasna korenina pa se nahaja v koži in jo obkroža lasna ovojnica, s katero tvori lasno čebulico. Lasni vrh je različnih oblik, lahko je naravno koničast, strižen, obrabljen, razcepljen itd. (Majdič, 2004; Zgradba lasu ..., 2006).

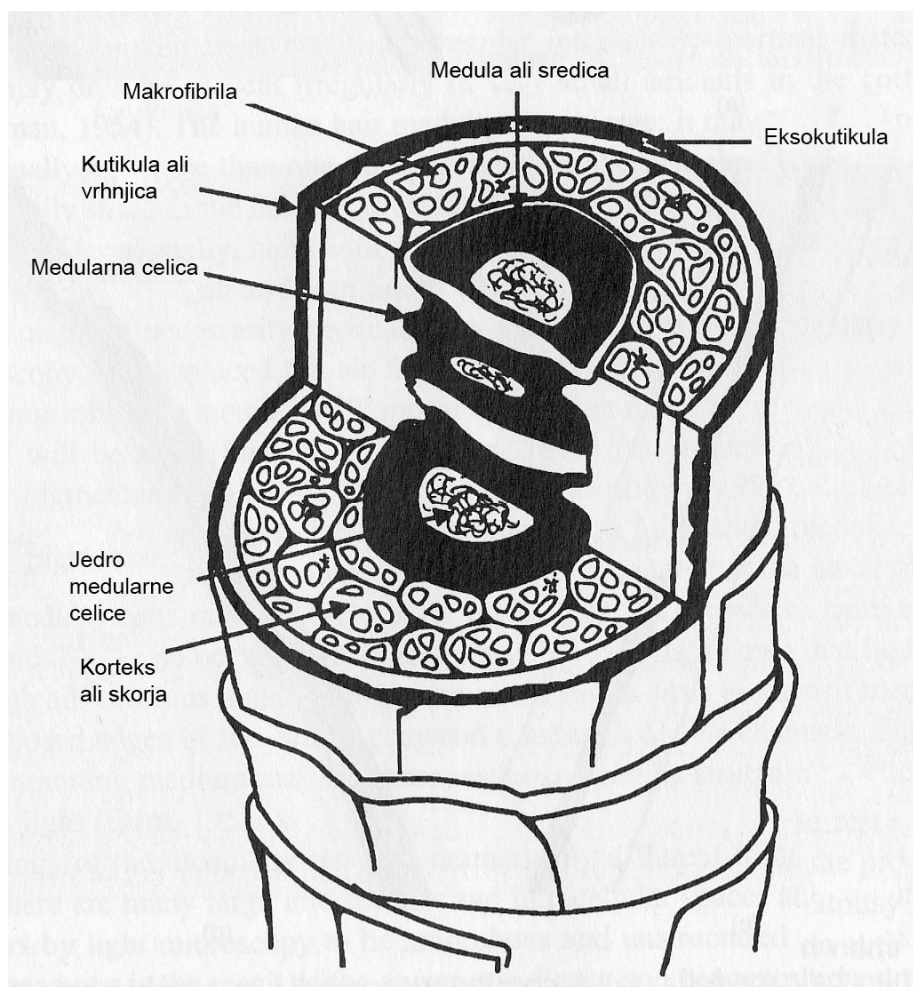
Dermalna papila ali brbončica je sestavljena iz skupine celic fibroblasta, ki se vihajajo v epitelni del lasnega folikla. To je edini dermalni oz. kožni element v foliklu in je odgovoren za nadzor lasnega cikla. Velikost nastalega lasu je direktno povezana z velikostjo papile. Če dermalno papilo odstranimo, preprečimo nadaljnjo rast. Med samim ciklom ni večjih sprememb v morfologiji papile (Zviak, 1986).

Lasna korenina je proliferativni del lasnega folikla. Dva do trije sloji bazalnih celic predstavljajo papilo, te celice so predhodniki vseh celic, ki se premikajo proti površini. Lasni steber predstavlja le eno tretjino celic, ki se diferencirajo iz lasne čebulice. Znotraj lasne čebulice se nahaja tudi melanocitna populacija – to so dendritne celice, ki prispevajo pigment. V spodnji čebulici so matrične celice enotne oblike, celice v zgornji čebulici pa začnejo z diferenciacijo v 6 koncentričnih cilindrov – notranji 3 predstavljajo "bodoči" las, zunanji 3 pa intrinzične sloje notranje koreninske plasti (Zviak, 1986).

Zunanja koreninska plast (angl. outer root sheath) je kontinuirana s površino epidermisa in mu je tudi podobna po strukturi. Lasni folikel obdaja po celi dolžini, ne obdaja pa spodnje čebulice. Notranja koreninska plast (angl. inner root sheath) ima 3 sloje: kutikula, Huxleyev sloj, Henlejev sloj. Funkcija koreninskih plasti ni točno znana, predvidevajo pa, da vzdržujeta razvijajoči se las, nadzorujeta stopnjo gibanja celic in določata končno obliko lasnega vlakna (Zviak, 1986).

Lasno steblo je dolg, tanek cilinder iz visoko organiziranih keratiniziranih celic in je običajno sestavljen iz treh komponent (slika 2.1) (Harding in Rogers, 1999; Zviak, 1986):

- medula ali sredica
- korteks ali skorja
- kutikula ali vrhnjica



Slika 2.1: Shematski prerez lasu, ki prikazuje glavne komponente lasnega stebra (Harding in Rogers, 1999)

Medula ali sredica

Medulo sestavljajo medularne celice. Med nastankom se celice sesedejo na tak način, da medula dobi videz mreže celičnih povezav z luknjami, ki so napolnjene z zrakom. Ta mreža je pri nekaterih sesalcih vrstno značilna in zato uporabna za diagnostične namene (Harding in Rogers, 1999).

Medula ni prisotna v vseh človeških laseh. Lahko je kontinuirana ali diskontinuirana; diskontinuirana je lahko zaradi dveh razlogov: ker je fragmentirana ali pa ker je prekinjena. Pri nekaterih osebah so celo ugotovili, da imajo dvojno medulo (Harding in Rogers, 1999).

Morfologija medularnega tkiva se močno razlikuje glede na morfologijo ostalih lasnih komponent. Značilni so številni večji medcelični in znotrajcelični prostori, proteinski material v celicah je amorfen in nestrukturiran. Od proteinov korteksa in kutikule se proteini medule razlikujejo v tem, da v peptidni verigi vsebujejo aminokislino citrulin (preglednica 2.1). Značilno je tudi, da so proteini medule netopni, kar je posledica obsežnih navzkrižnih povezav peptidne verige. Medularni proteini so zelo dovzetni za razgradnjo s proteolitičnimi encimi, posledično prihaja do izgube medularne strukture (Harding in Rogers, 1999).

Korteks ali skorja

Korteks sestavljajo fuziformne celice (to so celice posebne oblike, in sicer so na sredini širše, proti koncema pa se ožajo), dolge 80-100 μm in 5-10 μm široke v najširšem delu. Postavljene so vzporedno vzdolžni osi lasnega stebra in med seboj močno prepletene (Harding in Rogers, 1999).

Med seboj so močno povezane preko medceličnih povezav; ta kompleks povezav imenujemo medcelični membranski kompleks oz. celično membranski kompleks (CMC). Od teh povezav je odvisna tudi čvrstost lasu (Harding in Rogers, 1999).

Celice korteksa so napolnjene s keratinskimi makrofibrilami, vsebujejo pa tudi ostanke jedra in pigmentne granule (Harding in Rogers, 1999).

Vsaka makrofibrila je sestavljena iz keratinskih mikrofibril oz. keratinskih intermediarnih filamentov (keratinski IF proteini), ki so vpeti v matriks, ki ga sestavljajo proteini KAP (preglednica 2.1) (Harding in Rogers, 1999).

Pigmentne granule vsebujejo pigment melanin, ki daje lasem barvo. Značilna sta dva tipa pigmentov: evmelanin (črno-rjava barva las) in fevmelanin (rumeno-rdeča barva las) (Harding in Rogers, 1999). Od razmerja med tema pigmentoma je odvisna barva las (Zgradba lasu ..., 2006).

Ostanke jedra lahko opazimo v keratiniziranih celicah korteksa, DNA iz originalnega kromatina pa ni vidna. Ugotovili so, da je nekaj DNA tudi v korteksu (večji del je v kutikuli), vendar zelo malo (Harding in Rogers, 1999).

Kutikula ali vrhnjica

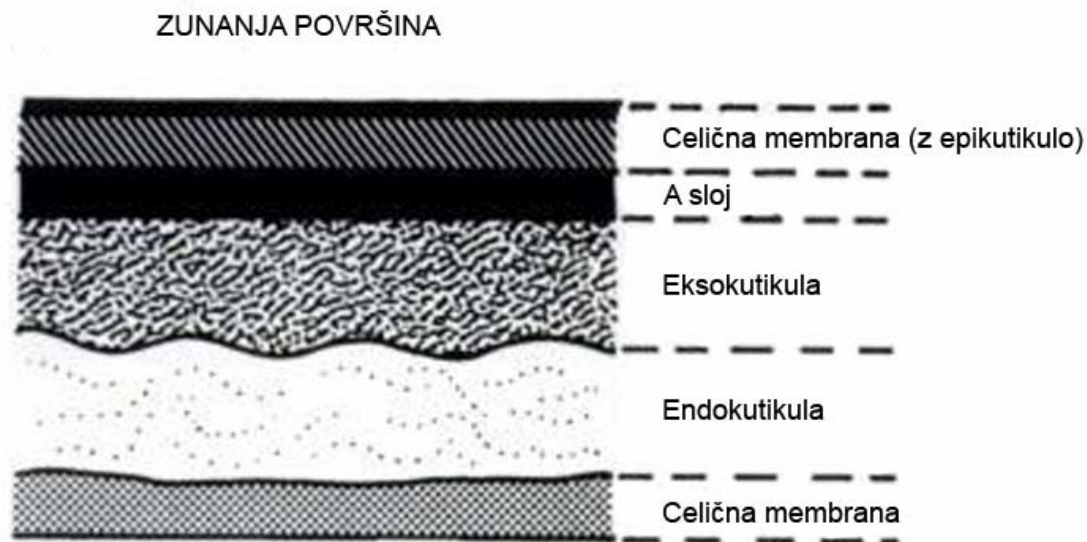
Kutikula je sestavljena iz sploščenih, prekrivajočih se celic, ki spominjajo na strešnike ali luske in potekajo od korenine proti koncu lasu. Celice se prekrivajo vzdolžno in lateralno in tako las popolnoma obdajo (Harding in Rogers, 1999).

Celice kutikule tvorijo značilen vzorec, ki ga lahko mikroskopsko opazujemo na površini lasu. Ta vzorec med vrstami variira in na podlagi tega lahko delamo identifikacijo (Harding in Rogers, 1999).

Če je las močno poškodovan, se debelina prekrivajočega sloja celic zmanjša do točke, ko kutikule več ni in je korteks odkrit, ni več zaščiten. V tem primeru korteks lahko razpade. Glavna funkcija kutikule je zaščita korteksa (Harding in Rogers, 1999).

Ločimo tri sloje celic kutikule (slika 2.2) (Harding in Rogers, 1999):

- endokutikula (notranja stran)
- eksokutikula (zunanja stran)
- A sloj (na zunanjem robu eksokutikule)



Slika 2.2: Shematski prikaz strukture kutikule (Zviak in Dawber, 1986)

Proteini v eksokutikuli so bogati s cisteinom in glicinom. Proteini endokutikule vsebujejo malo cisteina, veliko pa kislih in bazičnih aminokislin (preglednica 2.1) (Harding in Rogers, 1999).

Jedro oz. njegove ostanke najdemo v endokutikuli. Jedrna DNA ni vidna, vendar vseeno ni popolnoma razgrajena (Harding in Rogers, 1999).

A sloj je debel približno 110 nm in vsebuje veliko žvepla, kar omogoča nenavadno trdnost površine lasu (Harding in Rogers, 1999).

Vsaka celice kutikule je obdana z epikutikulo. To je hidrofobni membranski sloj, debel približno 10 nm in tvori zunanjo površino lasu. Odporen je na kemijski in encimski napad, in sicer zato, ker so njegovi proteini navzkrižno povezani z disulfidnimi in izpopeptidnimi vezmi (Harding in Rogers, 1999).

Preglednica 2.1: Biomolekularne karakteristike lasnih komponent (McNevin in sod., 2005a)

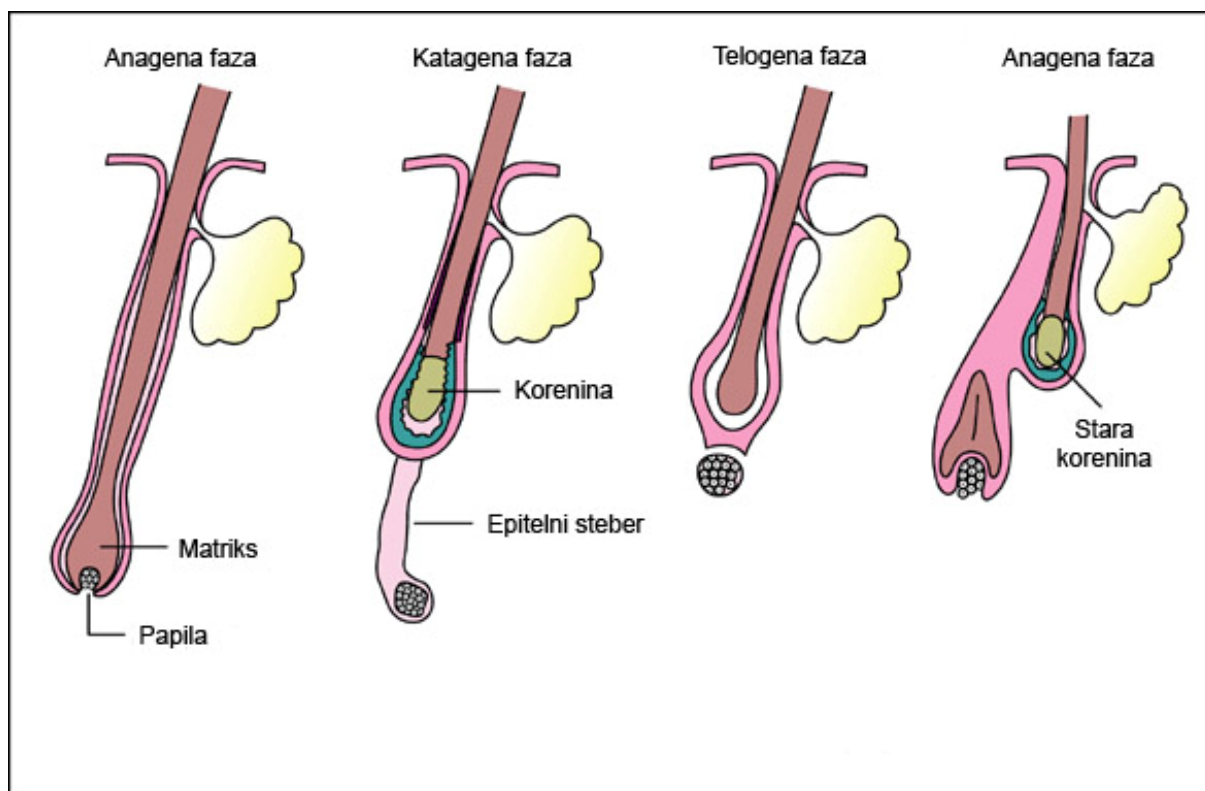
Karakteristika	Medula	Korteks	Kutikula
% skupne teže	2%	88%	10%
glavne proteinske oblike	trihohialin	keratinske fibrile (IF), KAP proteini	trihohialin, proteini KAP
glavne AK	glutamat, glutamin, citrulin, levcin	cistein, serin, glutamat	cistein, serin, prolin, glicin, glutamat
povezave med proteini	glutamil-lizin	disulfidne vezi, hidrofozni ostanki	disulfidne vezi, izopeptidne vezi

2.2.2 Lasni cikel

Lasje rastejo med fazo rasti folikla, nato pa sledi faza mirovanja. Temu potem sledi nova rastna faza, ki omogoča nastanek novih las, ki lahko stare izrinejo ali pa rastejo poleg njih. Ta vzorec rasti, izgube in regeneracije imenujemo lasni cikel (Harding in Rogers, 1999).

Lasni cikel je dinamičen, kontinuiran proces, razdeljen v 3 faze (slika 2.3) (Harding in Rogers, 1999):

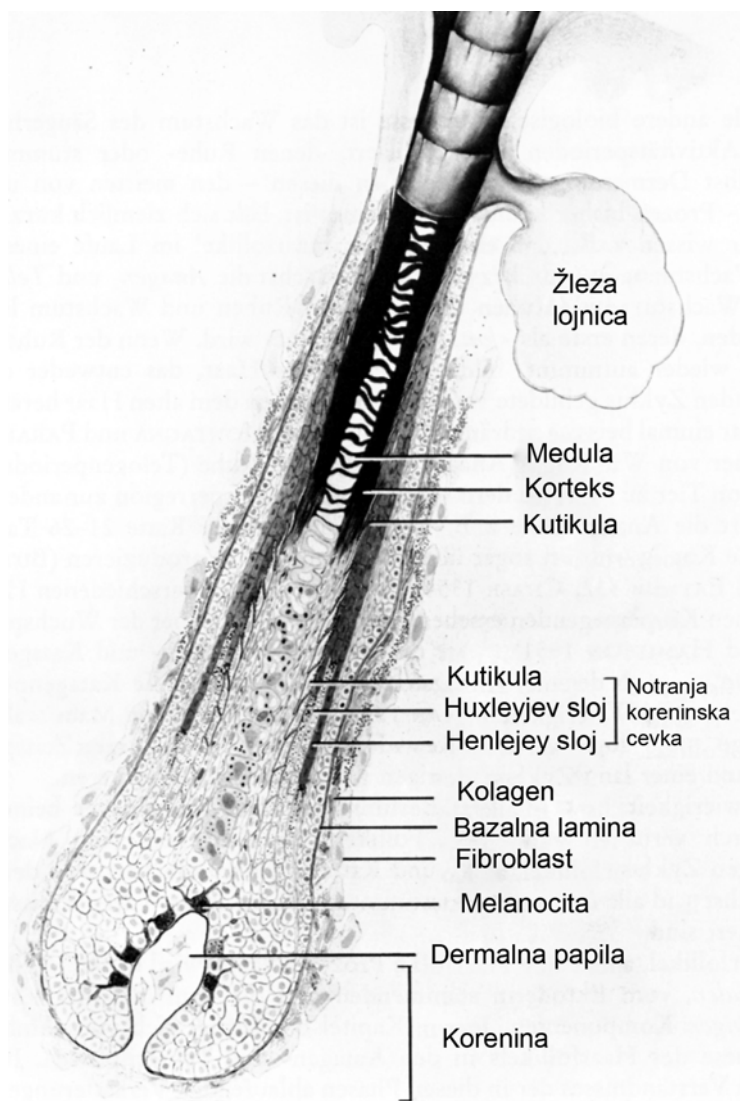
- anagena faza ali faza rasti
- katagena ali prehodna faza
- telogena faza ali faza mirovanja



Slika 2.3: Lasni cikel (Ellis in sod., 2002)

Anagen faza

Definirana je kot najdaljši del rastoče faze. Gre za fazo z visoko metabolno in mitotsko aktivnostjo. Traja tri do šest let. Folikel se ponovno oblikuje po prejšnji mirujoči fazi v procesu podobnem začetnemu razvoju s to razliko, da je lasni zametek že prisoten in je lasni kanal, ki ga povezuje s površino kože že vzpostavljen (Harding in Rogers, 1999).



Slika 2.4: Anageni folikel (Orfanos, 1979)

Anageno fazo lahko razdelimo na več podfaz: anagena faza I – VI. Lahko jih označimo tudi s črkami A – F ali pa z izrazi proanagena faza (I – IV), mesanagena faza (V) in metanagena faza (VI) (Harding in Rogers, 1999).

Anagena faza I: lasni zametek začne z mitotsko aktivnostjo.

Anagena faza II: folikel raste navzdol okrog dermalne papile, začne se tudi prva diferenciacija germinativnih celic v notranji koreninski plasti.

Anagena faza III: folikel pridobi svojo maksimalno dolžino 4-5 mm, lasna čebulica obda dermalno papilo. V čebulici lahko vidimo melanocite, nastane notranja koreninska plast.

Anagena faza IV: visoka mitotska aktivnost v celicah čebulice lasu. Vidimo tudi sintezo korteksa in medule ter pigmentne granule. Las se še ne podaljša prek notranje koreninske plasti.

Anagena faza V: folikel doseže karakteristično obliko čebulice, pri čemer spodnji del čebulice obda dermalno papilo. Konica novega lasu stran odrine starega in doseže epidermis. Proces do te faze traja približno 3 tedne.

Anagena faza VI: las je viden nad površino kože in naprej raste brez nadaljnjih sprememb folikla dokler se ne začne katagena faza (Harding in Rogers, 1999).

Če hočemo izpulit las v anageni fazi, moramo močno povleči, da las ločimo od dermalne papile. Korenine so temne, "mesnate", včasih pigmentirane (slika 2.5). Če anageni las na hitro izpulimo, je lahko pritrjen tudi del kožnega tkiva. Prisotni so vsi elementi spodnjega dela folikla, vključno s papilo (slika 2.4) (Harding in Rogers, 1999).



Slika 2.5: Mikroskopski prikaz lasu osebe A v anageni fazi pri 40-kratni povečavi

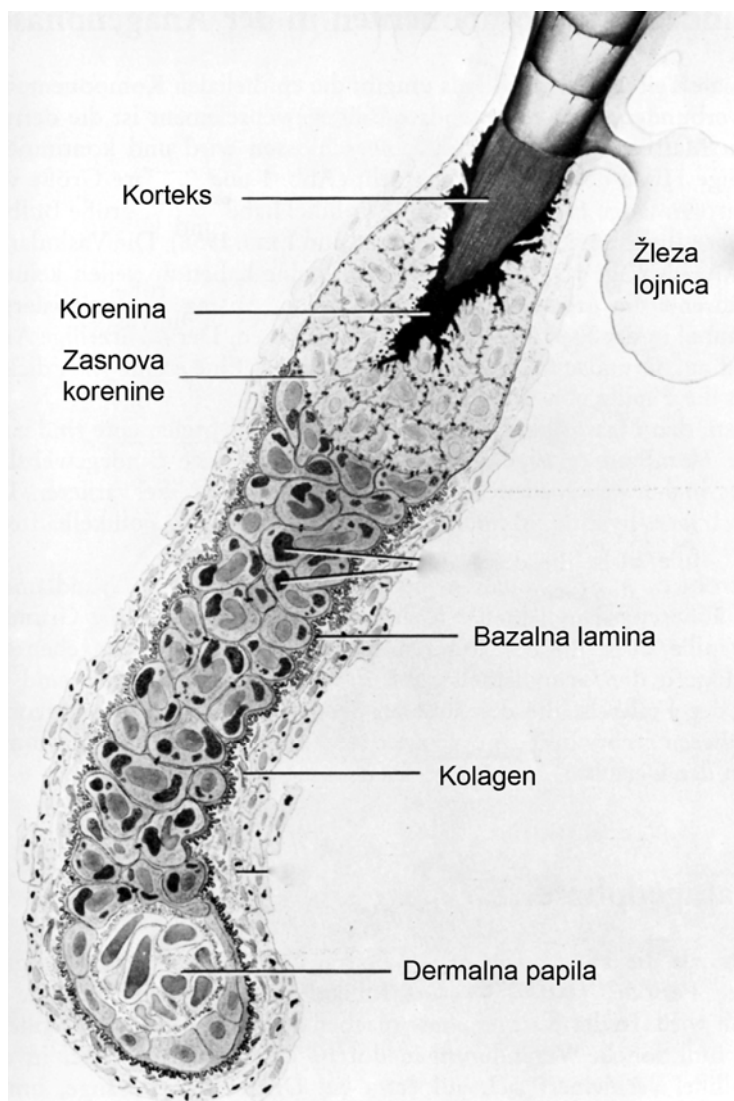
Katagena faza

V tej fazi pride do postopnih morfoloških in funkcijskih sprememb folikla medtem ko vstopa v fazo mirovanja (slika 2.6). Lasje postopoma nehajo rasti. Ta proces je relativno kratek, traja približno 2-3 tedne (Harding in Rogers, 1999).

Z začetkom katagene faze pride do razpada notranje koreninske plasti. Ustavi se sinteza melanina. Dendriti se skrčijo in pigment ni več injiciran v korteks, ki zato postane bled ali bel pri koncu korenine. Celične delitve v lasni čebulici se upočasnijo in sčasoma ustavijo. Celice v zgornjem delu čebulice še naprej potujejo navzgor do folikla in se diferencirajo, sinteza medule in kutikule se ustavi, le korteks ter notranja koreninska plast še vedno nastajata. Ostanjejo samo ostanki čebulice (Harding in Rogers, 1999).

V celicah spodnjega folikla nastanejo vakuole, ki vsebujejo hidrolitične encime. Esteraze in kisle fosfataze napadejo celice folikla, ki posledično razpade. Ostanki celičnega folikla tvorijo epitelno plast med dermalno papilo in lasno zasnovo. Zasnova oz. zametek lasu nastane iz zunanje koreninske plasti nekje na sredini folikla (iz te zasnove oz. zametka se ob iniciaciji rasti tvori nov folikel). Folikel se zmanjša na približno tretjino njegove dolžine (Harding in Rogers, 1999).

Lasje v tej fazi običajno ostanejo pritrjeni na ostanke folikla, če pa so izpuljeni iz korenin, izgledajo nepigmentirani, podobni krtači, včasih jih obdaja še epitelna kapsula (Harding in Rogers, 1999).



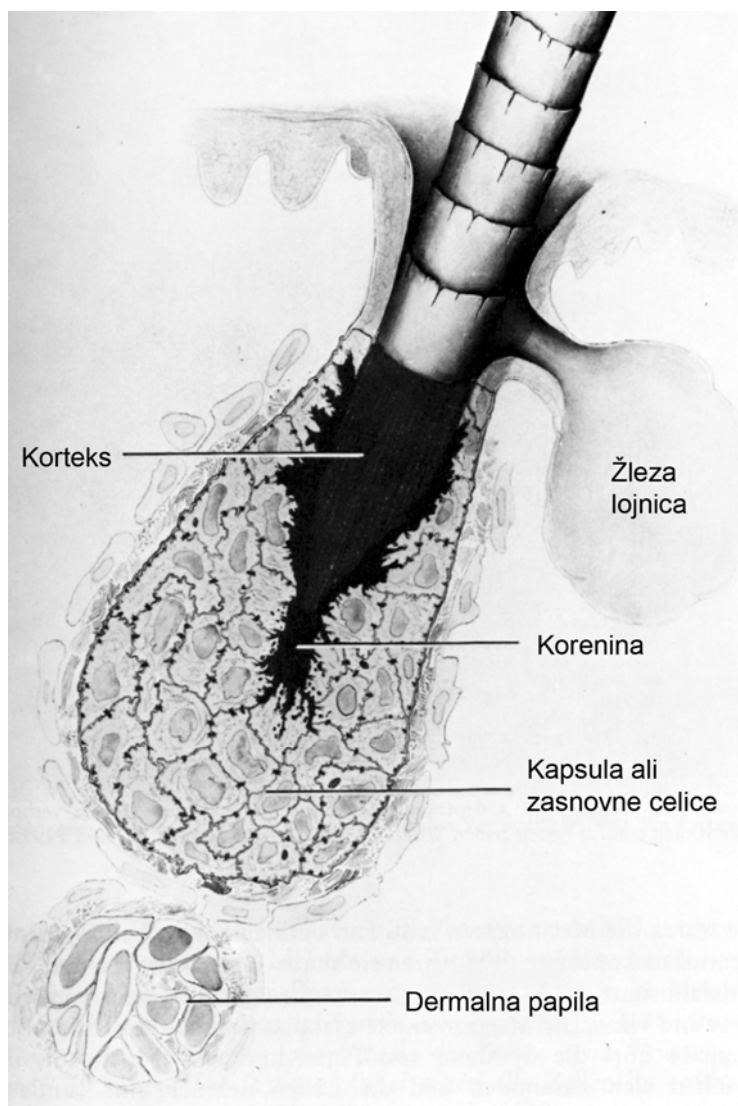
Slika 2.6: Katageni folikel (Orfanos, 1979)

Telogenska faza

Telogenska faza je zrela, stabilna faza rasti las. Las je usidran v folikel s korenino (angl. club root). Telogenski folikel je zelo kratek, približno tretjino dolžine anagenškega folikla (slika 2.7) (Harding in Rogers, 1999).

Če primerjamo lasni folikel v anagenški in telogenski fazi ugotovimo, da je v telogenski fazi dermalna papila kot kroglja celic ločena, locirana pod epitelno kapsulo. Germinativnih celic, kutikule in zunanje ter notranje koreninske plasti ni (Harding in Rogers, 1999).

Celice v spodnji regiji folikla so mitotsko neaktivne in vsebujejo manj DNA kot celice v lasni čebulici anagenske faze. Faza traja 3-4 mesece (Harding in Rogers, 1999).



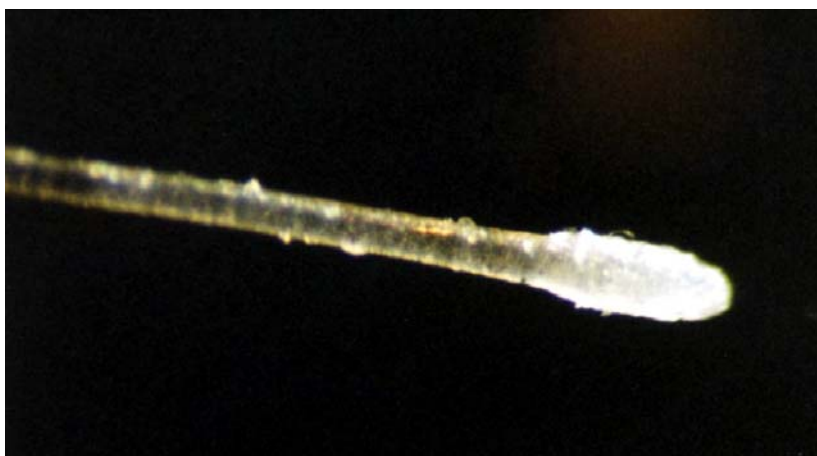
Slika 2.7: Telogeni folikel (Orfanos, 1979)

V nasprotju s splošnim prepričanjem, zreli lasje ne izpadajo. Izpadejo le, če so izpuljeni (npr. med česanjem, umivanjem las ipd.). Pogosto pa pride do tega, da novi lasje izpodrinejo stare, lahko pa tudi rastejo poleg njih (Harding in Rogers, 1999).

Lasje v telogenski fazi predstavljajo večino "naravno izpadlih" las, ki jih najdemo na oblekah ipd. Ponavadi nimajo pritrjene koreninske plasti in nimajo medule v bližini korenine ter niso oz. so slabo pigmentirane. Telogenska faza se zaključi, ko se začne nova

anagenska faza (Harding in Rogers, 1999). Slika 2.8 kaže mikroskopsko sliko lasu v telogenski fazi.

Vsakič ko nastane nov las, mora nastati nov folikel, soroden prvotnemu. Prva mitotska aktivnost pri nastanku novega lasu se pojavi v bazalnih celicah spodnjega folikla, ki raste navzdol kot trden steber nediferenciranih in delečih se celic in obda dermalno papilo ter začne novo anagensko fazo (Harding in Rogers, 1999).



Slika 2.8: Mikroskopski prikaz lasu osebe A v telogenski fazi pri 40-kratni povečavi

2.3 REPETITIVNA OZ. PONAVLJAJOČA ZAPOREDJA V ČLOVEŠKEM GENOMU

Značilnost človeške jedrne DNA je, da njen velik del (30%) zavzemajo ponavljajoča zaporedja DNA, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna področja (Drobnič, 2004).

V skupino visoko repetitivnih oz. ponavljajočih zaporedij DNA sodijo tudi minisateliti, ki tvorijo variabilno število tandemskih ponovitev (VNTR, angl. variable number tandem repeat) in mikrosateliti, ki tvorijo kratke tandemske ponovitve (STR, angl. short tandem repeat). VNTR in STR sta najpomembnejši skupini genetskih označevalcev, ki jih uporabljajo za ugotavljanje identitete posameznika. Minisateliti so bili originalna podlaga

za preučevanje genetskega prstnega odtisa ("DNA fingerprinting"), ki ga uporabljajo v forenzični znanosti (Sudbery, 1998).

Za repetitivna zaporedja so značilne številne genetske variacije med posamezniki, s čimer se kaže večja diverziteta kot pri unikatnih zaporedjih DNA. Prav zato so v forenzični znanosti tako pomembna. Ena izmed prednosti repetitivne DNA je tudi, da so zaporedja, ki so prisotna v večih kopijah, zaznavna pri manjših količinah, kot pa zaporedja DNA, ki so prisotna v enojnih kopijah. Ker so ponavadi forenzični vzorci zelo omejeni (majhne količine), je količina tarčnega zaporedja signifikantna (Fowler in sod., 1988). Izredno vlogo so imeli pri prvih analizah oz. pri analizah prstnega odtisa DNA (angl. DNA fingerprinting), ki so temeljile na hibridizaciji večlokusnih sond na repetitivne dele DNA.

Repetitivna DNA je visoko polimorfna. Polimorfizmi, ki so povezani s tandemskimi ponovitvami, nastanejo zaradi homologne rekombinacije, genske konverzije in replikacijskega zdrsa. Ti namreč omogočijo nastanek segmentov, ki vsebujejo variabilno število ponovitev (Goldstein in Schlotterer, 2000).

2.3.1 Minisateliti in mikrosateliti

Minisateliti so sestavljeni iz 10-100 bp dolgih zaporedij, ki se tandemsko ponavljajo, in sicer te ponovitve variirajo 0,5-40 kb. Pogosto se pojavljajo v bližini telomer, našli pa so jih tudi drugje (preglednica 2.2). Minisateliti kažejo variiranje v številu ponovitev, zato jih imenujejo tudi VNTR oz. variabilno število tandemskih ponovitev (Sudbery, 1998).

Mikrosateliti oz. kratke tandemske ponovitve STR so genomske sekvence, ki sestojijo iz mono-, di-, tri- ali tetranukleotidnih motivov, ki se ponavljajo v številnih tandemskih kopijah (preglednica 2.2) (Jeffreys in Pena, 1993).

Najbolj pogosto v človeškem genomu najdemo dimer $(CA)_n-(GT)_n$, imenovan tudi CA-ponovitev. V človeškem genomu je približno 50-100.000 kopij CA-ponovitev, ki se pojavijo na vsakih 30 kb v evkromatinski DNA. Mikrosateliti s tri- ali tetranukleotidnimi

ponovitvami so za identifikacijo v forenziki med najbolj primernimi. Tri- in tetramerne tandemske ponovitve se pojavljajo na 300-500 kb v človeškem kromosomu X in so pri teh frekvencah razpršeni po celotnem genomu (približno 10000 lokusov). Tipizacija teh regij, predvsem tetranukleotidnih ponovitev, ima visoko uporabnost, ker združujejo kratke dolžine alelov, ki so esencialni za študijo vzorcev z degradirano DNA (Jeffreys in Pena, 1993).

Preglednica 2.2: Primerjava minisatelitov in mikrosatelitov (Tautz, 1993)

	Minisateliti	Mikrosateliti
Stopnja ponavljanja	dve do več sto na vsakem lokusu	pet do sto na vsakem lokusu
Število lokusov	verjetno več tisoč, vendar vsak lokus kaže točno določeno repetitivno enoto	10^4 - 10^5 za kratke motive, manj za daljše motive
Dolžina ponovitvene enote	9-100 baznih parov	1-6 baznih parov
Lokacija	razpršeni, pogosto se grupirajo v telomernih regijah	bolj ali manj naključno razpršeni po genomu, pogosto v transkripcijskih enotah

Tako kot pri minisatelitih, tudi pri mikrosatelitih variira število ponovitev, kar vpliva na končno velikost. Mikrosateliti so polimorfni in so pomembni genetski označevalci. V primerjavi z minisateliti so bolj uporabni, ker je njihova genomska porazdelitev bolj enotna, konstantna. Najbolj pogosto se uporablja mikrosatelit strukture $(CA)_n$. Tetramerni STR-ji so podlaga metode profiliranja DNA v forenzičnih preiskavah (Sudbery, 1998).

Polimorfizem je posledica insercije oz. delecije. Posledično pride do podaljšanja oz. skrajšanja fragmenta. Dolžina ponovitvenih enot, ki so vstavljene oz. odstranjene, je ponavadi med 10 in 64 bp. Vzrok za izgubo oz. pridobitev števila ponovitev je lahko zdrs DNA-polimeraze med replikacijo ali pa neenakomerna rekombinacija med tandemskimi ponovitvami (Fowler in sod., 1988).

2.3.1.1 Nomenklatura minisatelitov in mikrosatelitov

Nomenklatura minisatelitov in mikrosatelitov se loči glede na položaj, kje v genomu posameznikov se nahajajo. V primeru, da ležijo znotraj določenega gena, nosijo njegovo oznako (npr. HUMvWA31 je mikrosatelit, ki je v intronu 40 gena za von Willebrandov faktor, ki leži v kromosomu 12). Ko pa minisatelit ali mikrosatelit leži zunaj genov, temelji nomenklatura na štirikomponentnem sistemu, in sicer je sestavljena iz črke D (označuje DNA), sledi ena od števil 1 do 22 (nespolni kromosomi) ali črka (X ali Y, spolna kromosoma), kar označuje v katerem kromosomu je mikrosatelit; sledijo črke S, Z ali F (označujejo ponovljivost področja; S – lokus je edinstven, Z – lokus je zelo ponavljajoč, F – družine homolognih lokusov) in na koncu številke od 1 dalje, ki označujejo zaporedno številko polimorfizma, najdenega v tem kromosomu. Tako npr. D3S1358 pomeni področje DNA, ki leži v kromosomu 3, je v eni kopiji in je 1358. odkriti polimorfizem v kromosomu 3 (Olaisen in sod., 1998).

2.4 PREISKAVE DNA

Preiskave DNA imajo danes nedvomno nenadomestljivo vlogo v forenzičnih preiskavah. Metoda prstnega odtisa DNA (angl. DNA fingerprinting), ki temelji na analizi polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), je bila zgodovinsko prva genetska identifikacijska metoda (Drobnič, 2004). Imela je dobro definiran začetek; 7. marca 1985 je Alec Jeffreys s sodelavci opisal razvoj prve večlokusne sonde, ki je hkrati lahko razkrila hipervariabilnost večih lokusov v človeškem genomu – postopek so imenovali "DNA fingerprinting" oz. metoda prstnega odtisa DNA. Metoda se je še nekaj let nazaj rutinsko uporabljala v forenzičnih laboratorijih, tako pri dokazovanju očetovstva kot tudi v kriminalističnih primerih (Jeffreys in Pena, 1993), danes pa jo je nadomestila metoda profiliranja DNA.

Najbolj variabilni lokusi, ki so jih odkrili v človeškem genomu, sestavljajo tandemsko ponavljajoči se minisateliti, imenovani tudi VNTR. Ugotovili so, da minisateliti vsebujejo

jedrno zaporedje (angl. core sequence) dolgo 10-15 bp, bogato z G in C, ki je podobno *chi* zaporedju pri *E. coli*, ki predstavlja signal za homologno rekombinacijo. Jedrno zaporedje, na katerega se vežejo večlokusne sonde, predstavlja osnovo za tipizacijo DNA oz. metodo prstnega odtisa DNA (Jeffreys in Pena, 1993).

Odkritje minisatelitov je omogočilo spoznanje, da sonde, ki jih sestavljajo tandemske ponovitve jedrnega zaporedja, lahko zaznajo multiple variabilne človeške segmente DNA s hibridizacijo odtisa Southern in tvorijo individualno-specifične odtise DNA (Jeffreys in Pena, 1993).

2.4.1 Metode prstnega odtisa DNA in profiliranja DNA

Z napredovanjem tehnologije se tudi forenzične analize DNA spreminjajo. V poznih 80ih in do sredine 90ih let dvajsetega stoletja je bila aktualna analiza RFLP – ta je nadomestila biokemijske identifikacijske tehnike (npr. izoencimsko elektroforezo), ki so temeljile na proteinskih polimorfizmi. Nato je prišlo do razcveta tehnologije PCR in njene uporabe na številnih področjih, med drugim tudi pri forenzičnih genetskih preiskavah. Osnova tehnologije PCR je selektivno pomnoževanje tarčnih fragmentov DNA, za katere je značilen visok polimorfizem (v teh regijah se posamezniki razlikujejo) (Fourney, 2002).

Pri analizi RFLP uporabimo restrikcijski encim, ki DNA razreže v fragmente, le-te pa nato ločimo s pomočjo gelske elektroforeze. Sledi hibridizacija, pri čemer uporabimo z radioaktivnimi izotopi označene sonde, ki se vežejo na specifična zaporedja DNA. Dobimo specifične vzorce temnih lis, ki jih imenujemo prstni odtisi (DNA fingerprinting..., 2006).

Pri metodi določevanja prstnega odtisa DNA uporabimo večlokusno sondo VNTR, ki se veže na mesta znotraj zaporedja VNTR (jedrno zaporedje). V človeškem genomu obstaja do 30 različnih mest, na katera se lahko veže. Pri vsakem posamezniku nastane drugačna razporeditev temnih lis, ki predstavljajo fragmente DNA, na katere se je vezala sonda. Nastali vzorec je individualno specifičen. Od tod tudi ime prstni odtis DNA, saj so tudi prstni odtisi individualni (Drobnič, 2004).

Metoda ima kar nekaj omejitev, in sicer (Jeffreys in Pena, 1993):

- metoda je dolgotrajna in zaradi slabe ločljivosti zahteva izurjene laboratorijske tehnike;
- sonda ni povsem specifična za človeka, to pa pomeni, da se lahko veže tudi na DNA drugih živalskih vrst;
- potrebna je relativno velika količina DNA (40 % forenzičnih vzorcev ne vsebuje dovolj materiala);
- problematična je interpretacija rezultatov (zaradi velikega števila fragmentov in nizke ločljivosti);
- interpretacija mešanih vzorcev, ki pripadajo večim osebam, ni mogoča (lokusi, ki jih odkrije večlokusna sonda, niso definirani);
- problematično je izračunavanje verjetnosti, ker ni mogoče izračunati pogostosti posameznih alelov.

Zato so v naslednjih letih razvili novo metodo, pri kateri se uporabljajo enolokusne sonde VNTR. S to metodo so rešili večino prej navedenih težav. Enolokusne sonde VNTR so enostavnejše za interpretacijo, potrebujejo manjšo količino sledi in možna je analiza mešanih sledi (Jeffreys in Pena, 1993).

Značilnost enolokusnih sond VNTR je, da se vežejo na robna zaporedja lokusov VNTR, ki so enkratna za vsak posamezni lokus VNTR in enaka med različnimi ljudmi. Pri uporabi enolokusnih sond lahko vizualiziramo največ dva fragmenta. Če oseba podeduje od obeh staršev enaka alela, med preiskavo lahko odkrijemo le en fragment (alela na obeh kromosomih sta enako dolga). Oseba je homozigot za preiskovani lokus VNTR. Kadar pa oseba podeduje od staršev različna alela, med preiskavo odkrijemo dva fragmenta (alela na obeh kromosomih sta različno dolga). Oseba je za preiskovani lokus heterozigot. Izračunamo lahko populacijske alelne frekvence za vsak lokus. Alelni vzorec pri uporabi enolokusne sonde VNTR v primerjavi z večlokusno sondo VNTR ni individualno specifičen. Individualno specifičnost dosežemo z uporabo štirih do šestih enolokusnih sond VNTR. Dobljene genotipe imenujemo profil DNA ali genetski profil ali alelni vzorec,

metodo pa profiliranje DNA. Največja slabost tehnike enolokusnih sond, ki temelji na hibridizaciji odtisa Southern, je omejena moč razločevanja med posameznimi aleli, zaradi česar se porajajo dvomi v pravilnost določanja posameznega alela (Drobnič, 2004).

Z uporabo metode PCR (namesto enolokusnih sond) so se znebili dvoma v pravilnost določanja alelov, saj metoda omogoča nastanek diskretnih alelov, hkrati pa tudi omogoča pridobitev informacije iz količinsko zelo majhnih vzorcev. V primerjavi z metodo RFLP je torej največja prednost PCR natančnejša tipizacija in možnost analize bioloških vzorcev z majhno količino DNA ter vzorcev z razgrajeno DNA (DNA fingerprinting..., 2006).

Omenim naj še analizo mitohondrijske DNA, ki se uporablja predvsem kadar tipizacija jedrne DNA zaradi močne razgradnje vzorca ni mogoča. Uporabljamo lahko tudi analizo Y-kromosoma, ki je moško specifična, in sicer pri analizah mešanih bioloških sledih, ki vsebujejo majhno količino DNA moške osebe napram DNA ženske osebe (DNA fingerprinting..., 2006).

2.4.1.1 Analiza lokusov STR ali profiliranje STR

V zadnjem času je najbolj aktualna tehnika analiza lokusov STR ali profiliranje STR. Temelji na metodi PCR in lokusih STR. Kot je bilo v poglavju 2.3 že predstavljeno, so lokusi STR visoko polimorfne regije, ki vsebujejo kratka ponavljajoča zaporedja. Ker imajo različni ljudje različno število ponovitev, lahko te regije uporabljamo za razlikovanje med posamezniki. Začetni oligonukleotidi so izbrani tako, da se vežejo na konce lokusov STR, v različni oddaljenosti od tandemskih zaporedij. V forenzične genetske preiskave so izbrani tisti začetni oligonukleotidi, ki imajo nizko stopnjo mutacije. Nastale produkte PCR ali amplikone ločimo in detektiramo s pomočjo kapilarne elektroforeze (DNA fingerprinting..., 2006).

Polimorfizmi, ki jih kažejo različni lokusi STR niso zelo visoki, ponavadi si vsak polimorfizem deli približno 5-20 % posameznikov. Če pa v analizi preiščemo več lokusov hkrati, dobimo unikatne kombinacije polimorfizmov za vsakega posameznika in ravno

zaradi tega je ta metoda tako pomembna za razlikovanje in identifikacijo (DNA fingerprinting..., 2006).

Tehnika ima številne prednosti v primerjavi s tehniko prstnega odtisa DNA. Te prednosti so (Fourney, 2002; Sudbery, 1998):

- testi, ki temeljijo na metodi PCR, so hitri;
- testi so bolj občutljivi, potrebujejo le 0,1 ng DNA;
- rezultate lahko shranimo v računalniških bazah podatkov;
- zmožnost pridobitve uporabnih genetskih profilov iz vzorcev, ki vsebujejo razgrajeno DNA ali nezadostne količine DNA za druge postopke tipizacije;
- zmanjšana je dovzetnost za prednostno amplifikacijo (pri analizi lokusov STR običajno majhne količine kontaminantov ne bodo dale nenavadnih produktov PCR);
- pomembna prednost pri razrešitvi izvora specifičnih profilov DNA iz kompleksne mešanice vzorcev.

Interpretacija rezultatov je nedvomljiva in pri merjenju dolžin ne prihaja do nejasnosti, saj diskretne alele posameznega področja STR lahko neposredno primerjamo z znanimi aleli tega področja s t.i. alelno lestvico. Z razvojem metod, ki temeljijo na detekciji fluorescentno označenih produktov PCR, se je uspešnost analize STR še dodatno povečala, ker lahko naenkrat pomnožimo in hkrati analiziramo različna področja STR (do 16 različnih področij) (Drobnič, 2004).

Pri izboru kandidatnega lokusa STR je potrebno upoštevati več faktorjev (Gill, 2001):

- moč razlikovanja mora biti večja od 0,9 (opazovana heterozigotnost več kot 70 %);
- predvidena dolžina alelov mora biti med 90 in 500 bp (večja je molekularna teža, nižja je natančnost meritve in s tem tudi večja možnost napake; nižja kot je velikost lokusa STR, manjša je verjetnost lokusnega ali alelnega izpada zaradi razgradnje vzorca);
- lokacija v kromosomu (s tem zagotovimo, da tesno povezani lokusi niso izbrani);
- robustnost in ponovljivost rezultatov.

2.5 TIPIZACIJA DNA IZ TELOGENSKIH LAS

V zadnjih letih je tipizacija DNA lokusov STR postala eno izmed najboljših orodij v forenzičnih preiskavah. Tudi zelo majhne količine DNA, pridobljene iz različnih vzorcev, kot so ostanki sline na cigaretnih ogorkih, razgrajena DNA iz starih krvnih madežev, ostanki okostij, so dovolj za profiliranje DNA. V zadnjem času pa so forenzični znanstveniki to tehnologijo začeli uporabljati tudi na vzorcih las (Hellman in sod., 2001).

Če je DNA izpostavljena različnim okoljskim dejavnikom (npr. požar), lahko pride do razgradnje DNA zaradi bakterijskih, biokemičnih ali oksidativnih procesov. Poleg tega so lahko v okolju prisotni razni kontaminanti, ki se pomešajo s forenzičnimi dokazi. V takih primerih lahko pri analizi dobimo le delni genetski profil z izgubo alelov in/ali celotnih lokusov (Butler in sod., 2003).

V preteklosti so kot ustrezni vzorci las za tipizacijo veljali le lasje z adherentinimi celicami (torej tisti, pri katerih so prisotne epitelne celice – to so lasje v anagenski fazi). Namreč pri vzorcih las, kjer epitelnih celic ni bilo več, je bil uspeh tipiziranja zelo slab. Problem pa je, ker na kraju zločina večinoma najdemo prav lase oz. dlake v telogenski fazi (to pomeni brez adherentnih celic). Jedrna DNA se namreč v takih vzorcih razgradi na fragmente, dolge približno 100 bp (Hellman in sod., 2001).

V primerih, kjer analiza lokusov STR ni mogoča, se uporablja analiza hipervariabilnih regij mtDNA. Problemi pri mtDNA pa so (Butler in sod., 2003; Hellman in sod., 2001; McNevin in sod., 2005a):

- dolgotrajen proces;
- haploidna narava dedovanja mtDNA (mtDNA se deduje samo po materini strani);
- pojav heteroplazmije v genotipih mtDNA (heteroplazmija je soobstajanje dveh ali več mtDNA v eni celici);
- rezultatov, pridobljenih z analizo mtDNA ne moremo primerjati z DNA profili v narodnih in mednarodnih bazah podatkov genotipov STR;

- stopnja razločevanja z analizo mtDNA je bistveno nižja kot pri analizi profilov STR.

Rešitev je uporaba novih začetnih oligonukleotidov, ki tvorijo amplikone, krajše od 110 bp. Rezultati študij so pokazali, da se je učinkovitost tipiziranja s skrajšanjem dolžine amplikonov STR povečala (Hellman in sod., 2001). Prednost miniSTR pa je tudi, da lahko v računalniškem sistemu vzdržujemo bazo podatkov profilov miniSTR obsojenih storilcev ali osumljencev, kar omogoča primerjavo novih vzorcev, z vzorci že obsojenih storilcev ali osumljenih, shranjenih v bazi. Prva država, ki je v Evropi zakonsko legitimirala vzpostavitev narodne baze podatkov profilov DNA, je bila Anglija, in sicer že leta 1996. Sledile so Škotska, Severna Irska, Nizozemska, Nemčija in Slovenija. V Sloveniji je bila z Zakonom o policiji leta 1998 vzpostavljena zakonska osnova za vodenje in vzdrževanje baze podatkov profilov DNA. V ZDA imenujejo narodno bazo podatkov CODIS (angl. Combined DNA Index System). Prve podatkovne baze so vsebovale profile STR, dobljene s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi, katerih dolžina amplikonov je med 100 in 500 bp. Nove podatkovne baze pa vsebujejo tudi profile miniSTR-ov (Butler in sod., 2003; Hellman in sod., 2001).

Primerna strategija za skrajšanje dolžine amplikonov je skrajšanje dolžine robnih (angl. flanking) regij, kar dosežemo tako, da izberemo začetne oligonukleotide, ki se bodo vezali bližje ponovitev (Butler in sod., 2003; Hellman in sod., 2001). Tako je v principu možno pomnožiti iste alele določenega lokusa neodvisno od pozicije začetnih oligonukleotidov. Moramo pa upoštevati možnost izpada alela (angl. drop out) zaradi mutacij na vezavnih mestih novih začetnih oligonukleotidov (Hellman in sod., 2001). To pomeni, da lahko med seboj primerjamo profile STR, določene s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi, s profili STR, določenimi z novimi začetnimi oligonukleotidi. Na istih lokusih STR lahko tako primerjamo profile miniSTR s profili STR, shranjenimi v podatkovnih bazah, kar omogoča najdbo storilca kaznivega dejanja iz baze podatkov profilov STR.

Ti novi začetni oligonukleotidi so torej primerni za vse biološke vzorce, pri katerih je DNA močno razgrajena (ne samo za lase). Pomembna pa je kombinacija novih začetnih

oligonukleotidov in učinkovitih ekstrakcijskih postopkov (modifikacija klasičnih ekstrakcijskih postopkov) (Hellman in sod., 2001).

2.5.1 Kontaminacija vzorca s tujo DNA

Za vzorce, ki vsebujejo razgrajeno DNA, obstaja večje tveganje kontaminacije z eksogeno DNA. Če je količina endogene DNA nizka, lahko že nizke količine kontaminantne DNA vplivajo na rezultate. Zaradi naravno nizke koncentracije DNA v lasu, je le-ta pogosto bolj dovzeten za kontaminacijo (Gilbert in sod., 2005).

Lasje so lahko naravno odporni na kontaminacijo z eksogeno DNA. Hidrofobna narava proteinov, ki sestavljajo celice kutikule, ter keratinsko pakiranje celic naredijo neprepusten ščit okoli korteksa. To lahko pojasni odpornost vzorcev na penetracijo kontaminantne DNA (Gilbert in sod., 2005).

Pred vsakim postopkom izolacije DNA iz las, je potrebno las dobro očistiti, da odstranimo možne kontaminante. To storimo s spiranjem v sterilni destilirani vodi in v etanolu.

Obstaja tudi verjetnost, da je v vzorcu kontaminantna DNA sicer prisotna, vendar v tako majhnih količinah, da ne vpliva na izid analiz PCR. Še ena možnost pa je kontaminacija od donorja samega (Gilbert in sod., 2005).

2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO OZ. PCR

PCR je oblika *in vitro* kloniranja in jo lahko uporabljamo za pomnoževanja majhnih količin DNA. Odvisna je od DNA-polimeraze termofilne bakterije, ki je lahko kos temperaturam do 95 °C in ima temperaturni optimum pri 72 °C. DNA-polimeraza lahko sintetizira novo DNA s podaljševanjem 3' konca obstoječega začetnega oligonukleotida. To izkorišča za novo sintezo območja med mestoma, kjer se vežeta začetna oligonukleotida (Sudbery, 1998).

V vsakem ciklu se matrična DNA najprej denaturira s segrevanjem do 95 °C, sledi faza prileganja začetnih oligonukleotidov pri temperaturnem razponu med 52 in 61 °C in nato inkubacija pri 72 °C, pri kateri polimeraza sintetizira novo DNA (kot matrico uporabi tarčno DNA). Tako se lahko v 30-ih ciklih iz majhne količine DNA (celo ene same molekule) namnoži in tvori mikrogramske količine tarčne DNA. Reakcija poteka v posebnih cikličnih termostatih, ki jih lahko programiramo, da izvedejo ustrezno število ciklov pri ustreznih temperaturah (Sudbery, 1998).

Dolžina začetnih oligonukleotidov je ponavadi okrog 20 baz, dolžina in kompozicija baz določata osnovni optimum temperature prileganja (Sudbery, 1998). Dejansko pa je potrebno optimalno temperaturo prileganja kot tudi čas prileganja preveriti in določiti eksperimentalno.

2.6.1 Kontaminacija produktov PCR

Kontaminacija vzorca lahko zasenči pravo DNA, zato moramo vedno upoštevati možnost kontaminacije. Pomembni sta dve kategoriji kontaminacije:

- kontaminacija med vzorci pred samim pomnoževanjem z metodo PCR (angl. sample-to-sample) in
- kontaminacija vzorca, ki ga nameravamo pomnoževati s PCR z DNA iz že pomnoženega vzorca (angl. PCR to sample) (Higuchi in Blake, 1989).

Kontaminacija med vzorci je problem vseh diagnostičnih testov. Vendar pa je pri metodi PCR še dodaten razlog za previdnost, kadar imamo v preiskavi vzorce z majhno količino DNA. Pomembno je, da ločeno pripravljamo različne vzorce za PCR. Kapljica vzorca A, ki ostane na rokavici, lahko kontaminira vzorec B med njegovo pripravo. Posledično se DNA vzorca A namnoži skupaj z vzorcem B in nimamo več čistega vzorca. Do tega lahko pride tudi, če pozabimo zamenjati pipetni nastavek po uporabi. Ta tip kontaminacije lahko ugotovimo s prisotnostjo več kot dveh alelov v vzorcu. Preventivni ukrep je ločena

priprava vzorcev z visoko koncentracijo in vzorcev z nizko koncentracijo DNA (Higuchi in Blake, 1989). Pri forenzičnih vzorcih je potrebna še posebna pozornost, saj velik del forenzičnih vzorcev vsebuje DNA več oseb, zaradi česar velikokrat ni mogoče ugotoviti ali gre za kontaminacijo.

Možna pa je tudi prenosna kontaminacija, ko se prenese DNA iz že pomnožene DNA (po PCR) v vzorec s še ne pomnoženo DNA. Problem je, če že pomnožena DNA (A) pride v vzorec še ne pomnožene DNA (B), ki vsebuje nizko količino DNA. Namreč DNA A je že pomnožena, zato ta vzorec, četudi ena sama kapljica, vsebuje ogromno število kopij (10^{12}). Torej, če ta pride v vzorec B, se bo v PCR zaradi stohastičnega učinka (ena DNA močno prevladuje nad drugo DNA) še dodatno namnožila, medtem ko bo DNA vzorca B izginila. Tovrstne kontaminacije običajno ne zasledimo, saj na posamzenem lokusu ne zasledimo več kot dveh alelov. Da do tega pojava ne pride, vzorcev s produkti PCR ne smemo obravnavati hkrati z vzorci, ki še niso bili pomnoženi. To najlažje dosežemo z ločitvijo priprave vzorcev (vzorci, ki še niso bili pomnoženi pripravljamo v drugem prostoru oz. laboratoriju kot vzorce, ki so že pomnoženi). Pomembno je tudi, da uporabljamo različne pipete za vzorce pred in vzorce po pomnoževanju, ločene reagentne in zamenjamo zaščitne rokavice pri prehodu v drug prostor (Higuchi in Blake, 1989).

2.6.2 PCR v realnem času

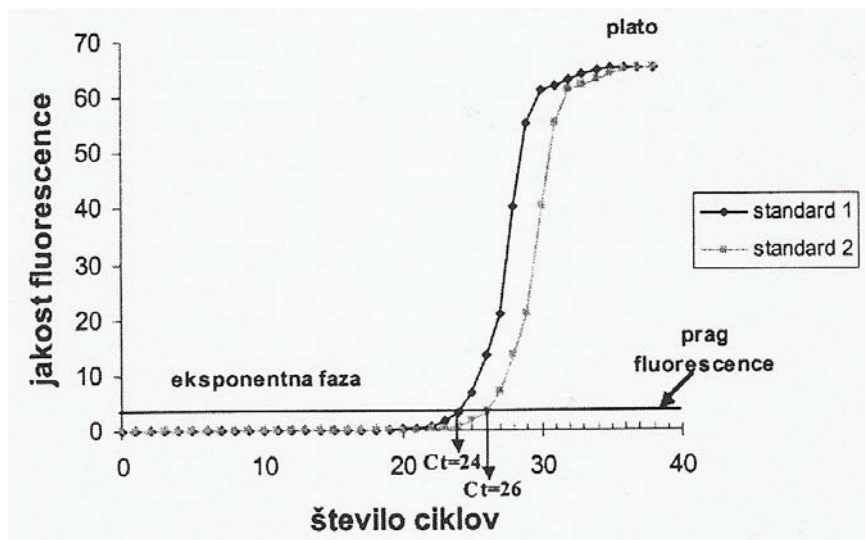
PCR v realnem času je pravzaprav nadgradnja konvencionalne PCR in temelji na merjenju fluorescence. Pri PCR v realnem času potekata pomnoževanje in detekcija produktov PCR hkrati. Najpomembnejša prednost PCR v realnem času je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin (Arko, 2004).

Teoretično se število kopij želenega odseka v vsakem ciklu PCR podvoji, to naj bi vodilo v eksponentno naraščanje kopij matrične DNA. Dejansko količina produkta narašča eksponentno samo v začetnih ciklih, kasneje pa se reakcija postopno upočasnjuje zaradi porabe sestavin reakcijske zmesi, manjše aktivnosti DNA-polimeraze in kopičenja inhibitornih produktov (Arko, 2004). Število kopij se ne podvoji več v vsakem ciklu,

ampak narašča počasneje, dokler ne doseže nivoja, ko se reakcija ustavi in s povečevanjem števila ciklov se količina produkta PCR ne večja več (Arko, 2004; Ginzinger, 2002). Primernost merjenja produktov PCR med njihovim kopičenjem oz. v realnem času je le, dokler je reakcija v eksponentni fazi. Saj le v eksponentni fazi PCR lahko iz količine produkta PCR sklepamo na začetno število kopij matrične (osnovne) DNA v vzorcu (Ginzinger, 2002).

Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da zmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov (slika 2.9). Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga (Arko, 2004).

Med eksponentno fazo določimo linijo fluorescenčnega praga (slika 2.9), ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. C_T (threshold cycle) je število ciklov pri fluorescenčnem pragu. Vrednosti C_T so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice in na osnovi njih primerjamo vzorce med seboj. S primerjavo vrednosti C_T vzorcev z vrednostmi C_T standardov z znanim številom kopij matrice, lahko določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu (Arko, 2004; Ginzinger, 2002).



Slika 2.9: Krivulja pomnoževanja pri PCR v realnem času (Arko, 2004)

Danes se uporablja več različnih načinov detekcije:

- uporaba sond *TaqMan*
- uporaba molekularnih svetil
- uporaba barvila "SYBR Green"

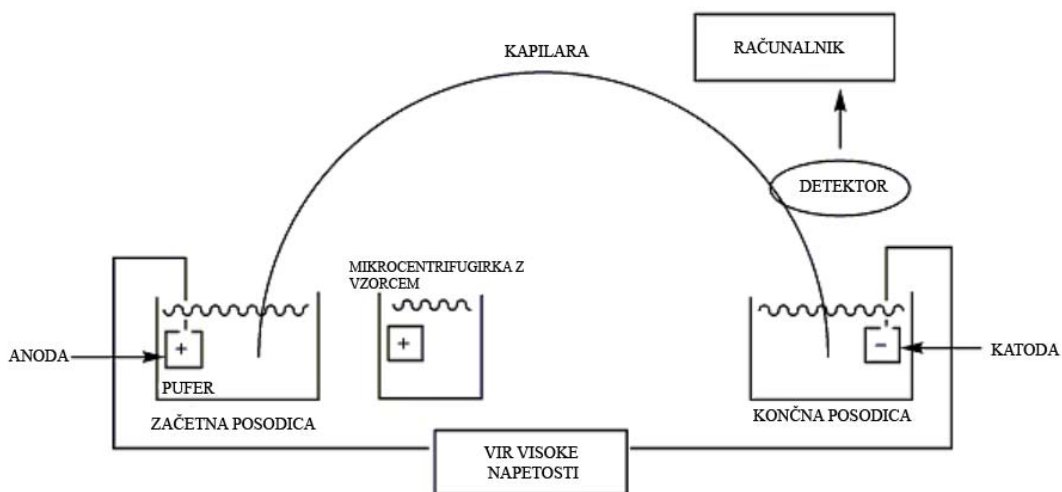
Mi smo uporabljali sondo *TaqMan*. Ta način detekcije sloni na 5' eksonukleazni aktivnosti DNA-polimeraz (npr. *TaqMan*). V reakcijsko zmes dodamo sondo, ki specifično prepozna in se veže na tarčno zaporedje v DNA. Prve sonde so imele na 3' in 5' koncu vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo (angl. reporter), vezano na 5' koncu, prestreže drugo barvilo, imenovano dušilec (angl. quencher), ki je vezano na 3' koncu. Tekom PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnosti *Taq* DNA-polimeraze hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde v stopnji podaljševanja. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in tako je onemogočeno prestrezanje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (Arko, 2004; Ginzinger, 2002). Novejše sonde pa na dušilec na 3' koncu nimajo več vezanega barvila, ampak krajšo enojno verigo DNA s posebno strukturo v obliki brazde (angl. minor groove binder), ki prav tako deluje kot dušilec fluorescence, dokler je oddaljenost med reporterskim barvilom in vezano DNA na dušilcu majhna.

Prednost te sonde je v zmanjšanju fluorescentnega ozadja, ki moti pri natančnem določevanju koncentracije DNA, zaradi fluorescence, ki jo drugače samo po sebi oddaja barvilo na 3' koncu. Prednost določevanja koncentracije DNA s sondo *TaqMan* je še v tem, da omogoča detekcijo le specifične DNA. V našem primeru je bila to človeška DNA, saj so izbrani začetni oligonukleotidi in sonda specifični za človeka, in sicer na intronsko regijo gena za telomerazno reverzno transkriptazo človeka. Metoda omogoča natančno določitev koncentracije človeške DNA v vzorcu, saj zaradi specifičnosti druge vrste DNA ne zaznajo. Pri danjšnjih forenzičnih preiskavah DNA je natančna določitev koncentracije DNA izrednega pomena, zato ima tak način določevanja koncentracije DNA veliko prednosti pred drugimi nespecifičnimi metodami.

2.7 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza poteka po principu elektrokinetike (gibanje zaradi električnega polja). Metoda ima visoko ločljivost, saj omogoča razlikovanje med fragmenti DNA, ki se razlikujejo v dolžini enega baznega para. Produkta PCR injiciramo v kapilaro, ki je napolnjena s polimerom. DNA, ki je negativno nabita, potuje po kapilari zaradi električnega polja proti anodi, in sicer krajši fragmenti potujejo hitreje od daljših. Fragmente nato detektiramo s pomočjo fluorescence, kajti začetni oligonukleotidi so označeni s fluorokromi. Zaradi izredne natančnosti, ki jo omogoča tak način detekcije, s fluorokromom označimo le en začetni oligonukleotid v paru. Običajno tistega, ki ga imenujemo vodilni (angl. forward) začetni oligonukleotid. Zaradi zmožnosti sočasne detekcije različnih fluorokromov, lahko hkrati pomnožujemo več lokusov STR, saj alele, ki sodijo v isti velikostni razred, označimo z različnimi fluorokromi, kar nam omogoči razlikovanje med njimi. Lokuse STR, ki imajo alele v različnih velikostnih razredih pa označimo z istim fluorokromom, saj jih lahko razlikujemo na osnovi dolžine. Velikosti alelov določimo z uporabo označenih velikostnih standardov, ki jih dodamo k vsakemu vzorcu. Velikostne standarde uporabljamo tudi za ugotavljanje primernosti primerjave dveh profilov STR, če je odstopanje med dvema enako dolgima velikostnima standaroma večje od 0,5 bp, profilov STR med seboj ne moremo primerjati. Število ponovitev oz. tip alelov določimo s primerjavo velikosti z alelno lestvico. V obeh primerih se pri analizi

uporablja računalniške programe, ki so veljavni in omogočajo avtomatizacijo preiskave. Programi se med seboj razlikujejo glede na vrsto aparature za določevanje nukleotidnega zaporedja in glede na uporabljen komercialni komplet (Fourney, 2002).



Slika 2.10: Sistem kapilarne elektroforeze (Capillary electrophoresis..., 2006)

Slika 2.10 kaže glavne komponente sistema kapilarne elektroforeze. Ti so mikrocentrifugirka z vzorcem, začetna (angl. source) posodica, končna (angl. destination) posodica, kapilara, elektrode, izvor visoke napetosti, detektor in naprava za obdelavo podatkov (računalnik) (Capillary electrophoresis..., 2006).

Kapilare so sestavljene iz kremenovega stekla in običajno merijo 50-100 μm v premeru. Dolge so 25-75 cm (Butler, 2005).

Začetno in končno posodico ter kapilaro napolnimo z elektrolitno raztopino. Kapilaro potopimo v raztopino vzorca v mikrocentrifugirki, nato pa jo po parih sekundah aparat samodejno prestavi v začetno posodico. Migracija DNA se začne z vzpostavitvijo električnega polja. Ločitev produktov PCR teče z njihovo migracijo zaradi elektroforetske mobilnosti, detekcija pa teče ob prehodu mimo okenca v kapilari na mestu detektorja (Capillary electrophoresis..., 2006). Večje molekule DNA potujejo počasneje v primerjavi

z manjšimi fragmenti DNA (Butler, 2005). Pri prehodu preko detektorja, ki ga sestavljata laser in kamera CCD (angl. charge-coupled device), pride zaradi obsevanja s fluorokromi označenih fragmentov PCR z laserskimi žarki do fluorescenčne emisije na kamero CCD, ki sevanje razkloni glede na valovno dolžino. Podatke nato sprejme računalniški program, ki jih nadalje obdeli na osnovi analiznih algoritmov. Pride do pretvorbe analognega (zveznega) signala v digitalno (diskretno) obliko. Podatki se izpišejo v obliki elektroferograma. Posamezen produkt PCR vidimo v obliki pikov ali vrhov z različnimi retencijskimi časi (Fourney, 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI LAS

V preiskavo smo vzeli lase, izpadle osmim osebam, in sicer petim osebam ženskega spola ter trem osebam moškega spola. Od osebe A smo poleg tega pridobili še primerjalni vzorec slin. Sorodstvena razmerja med osebami so sledeča:

Oseba A: naključno izbrana ženska.

Oseba B: moški (brat osebe A)

Oseba C: ženska (mati oseb A in B).

Oseba D: moški (oče oseb A in B).

Oseba E: ženska.

Oseba F: ženska.

Oseba G: ženska.

Oseba H: moški.

} naključno izbrane nesorodne osebe iz slovenske
populacije

Preglednica 3.1: Oznaka vzorcev, pridobljenih od osmih različnih oseb

Oseba	Vzorci
A	A1-A4: telogenski lasje, raztopina BKA A5-A8: telogenski lasje, Razgradna (angl. digest) raztopina A9-A12: telogenski lasje, Razgradna raztopina s CaCl_2 A13-A16: telogenski lasje, raztopina BKA A17-A19: telogenski lasje, Razgradna raztopina A20-A23: telogenski lasje, Razgradna raztopina s CaCl_2 A24: anagenski las, raztopina BKA A25: slina
B	B1-B5: telogenski lasje, raztopina BKA
C	C1-C5: telogenski lasje, raztopina BKA
D	D1-D5: telogenski lasje, raztopina BKA
E	E1-E5: telogenski lasje, raztopina BKA E6-E10: telogenski lasje, Razgradna raztopina s CaCl_2
F	F1-F5: telogenski lasje, raztopina BKA
G	G1-G5: telogenski lasje, raztopina BKA
H	H1-H5: telogenski lasje, raztopina BKA

3.2 MORFOLOŠKA PREISKAVA LAS

Osebe, ki so sodelovale v eksperimentu, so nekaj dni zbirale svoje izpadle lase. Lasje so bili pobrani s posteljne blazine. Od posamezne osebe smo dobili v preiskavo 20 do 30 izpadlih las, razen od osebe A, ki jih je zbrala preko 100. Izpadale lase smo hranili v ločenih papirnatih kuvertah, vendar ne več kot 1 mesec. Izpadle lase smo najprej mikroskopsko pregledali s stereomikroskopom pri 40 x povečavi in izmed njih odbrali le tiste, ki so bili nedvoumno v telogenski fazi. Preostanek las smo zavrgli. Prvih enajst izbranih las v telogenski fazi, izpadlih osebi A, smo tudi fotografirali. Pri osebi A smo za primerjavo morfološke preiskave in preiskave DNA vzeli tudi en las v anagenski fazi. Tudi ta las smo zaradi prikaza morfološke razlike med anagensko in telogensko fazo fotografirali.

Število izpadlih las, vzetih v preiskavo DNA pri posamezni osebi, vrsta uporabljene raztopine in njihova oznaka so podani v preglednici 3.1.

3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN

Raztopina BKA (50 ml):

- 0,5 ml 1 M Tris HCl (pH=8,0)
- 1 ml 5 M NaCl
- 50 µl 1 M CaCl₂
- 5 ml 20-odstotni (w/v) SDS
- 43,45 ml H₂O

Razgradna (angl. digest) raztopina (100 ml):

- 1 ml 1 M Tris HCl (pH=8,0)
- 2 ml 0,5 M EDTA*
- 1 ml 5 M NaCl

- 10 ml 20-odstotni SDS
- 86 ml H₂O

* EDTA (etilendiamintetraocetna kislina) je kelator in veže (mono-, di-, tri- in tetravalentne) kovinske ione (Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺) (McNevin in sod., 2005a).

Razgradna raztopina s CaCl₂ (10 ml):

- 10 ml Digestivnega pufra
- 10 µl 1 M CaCl₂

Priprava proteinaze K (10 mg/ml, 10 ml):

Raztopili smo 100 mg proteinaze K v 10 ml sterilne destilirane vode, nato pa dobljeno raztopino razdelili po 100 µl v manjše plastične sterilne mikrocentrifugirke, ki smo jih do uporabe hranili pri -20 °C. Proteinaza K (endopeptidaza K) razgradi keratin in ščiti ekstrahirano nukleinsko kislino pred ribonukleazami. Aktivirajo jo kalcijevi ioni (McNevin in sod., 2005a).

Priprava DTT (1 M Ditiotreitol, 10 ml):

Raztopili smo 1,54 g ditiotreitola (C₄H₁₂O₂S₂) v 10 ml sterilne vode, nato pa smo dobljeno raztopino razdelili na 100 µl v manjše plastične sterilne mikrocentrifugirke, ki smo jih do uporabe hranili pri -20 °C. DTT razbije disulfidne mostičke med polipeptidi (McNevin in sod., 2005a).

3.4 ORGANSKA EKSTRAKCIJA DNA IZ LAS

Vsak las smo pred preiskavo DNA skrajšali pri vrhu na končno dolžino 2 cm. Teža las osebe A je variirala med 0,134 in 0,154 mg/cm. Lase smo nežno prijemali s pinceto. Pri delu smo nosili masko in imeli zaščitne rokavice. Lase smo najprej sprali v 50 ml sterilne destilirane vode in nato splaknili z alkoholom (96-odstotni etanol) ter posušili na čisti papirnati brisači. Vsak posamezen odrezan, očiščen in posušen las smo nato dali v svojo mikrocentrifugirko (le v vzorce A4, A8, A12 smo dali po 3 lase v eno mikrocentrifugirko).

DNA smo izolirali v treh različnih raztopinah: BKA, razgradni, in razgradni raztopini z dodanim CaCl_2 . V mikrocentrifugirko z lasom smo dodali 200 μl ene od treh raztopin, 16 μl DTT in 10 μl proteinaze K. Vzorce smo nato inkubirali preko noči pri 56 °C.

DNA smo iz las izolirali po naslednjem postopku:

- vzorcem smo dodali 200 μl fenol-kloroform-izoamil alkohola;
- mikrocentrifugirko smo 30 s stresali na vibracijskem mešalniku;
- centrifugirali smo 5 min pri obratih 14 000 min^{-1} (uporabljali smo centrifugo Eppendorf 5417 C in pripadajoči rotor F-45-30-11);
- odpipetirali smo zgornjo fazo (vodna faza, ki vsebuje DNA) in jo prenesli v Microcon mikrocentrikonke YM-30;
- centrifugirali smo 9 min pri obratih 14 000 min^{-1} ;
- dodali smo 200 μl vode in ponovno centrifugirali 9 min pri obratih 14 000 min^{-1} ;
- dodali smo 200 μl vode in ponovno centrifugirali 9 min pri obratih 14 000 min^{-1} ;
- k vzorcem z razgradno raztopino in razgradno raztopino z dodanim CaCl_2 smo dodali 200 μl vode in ponovno centrifugirali pri obratih 14 000 min^{-1} , nato pa dodali 40 μl vode;
- k vzorcem z raztopino BKA smo dodali 40 μl vode;
- mikrocentrikonke smo obrnili na glavo v mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 5 min pri 1000 x g;
- mikrocentrikonke smo zavrgli, mikrocentrifugirke z izolirano DNA pa zamrznili.

Pri izolaciji smo uporabljali mikrocentrikonke YM-30 znamke Amicon (slika 3.1) (Millipore, Eschborn, Germany). Gre za filtrirno kolono, ki omogoča enostavno in učinkovito koncentriranje in razsoljevanje DNA z uporabo centrifuge. Lastnosti celulozne membrane, ki jo vsebuje mikrocentrikonka, so nizkovezavnost, anizotropičnost in hidrofilnost. Membrana prepušča RNA/DNA dolžine 60 nukleotidov (enoverižna) oz. 50 nukleotidov (dvoverižna). Pri tem je potrebno omeniti, da se običajno pri izolaciji DNA iz forenzičnih bioloških vzorcev uporablja mikrocentrikonka tipa YM-100, pri katerem membrana prepušča RNA/DNA dolžine 300 nukleotidov (enoverižna) oz. 120 nukleotidov (dvoverižna). V našem primeru je bila uporaba mikrocentrikonke tipa YM-30 bolj smiselna, saj je šlo za izolacijo degradirane DNA, katere dolžina je krajša od 100 nukleotidov (Microcon YM-30..., 2002).



Slika 3.1: Mikrocentrifonka Microcon YM-30 (Millipore Catalogue..., 2006)

Pri izolaciji DNA iz las smo organsko ekstrakcijo uporabili zato, ker omogoča odstranjevanje inhibitorjev PCR. Metoda Chelex sicer odstrani polivalentne kovinske ione, ki so inhibitorji PCR, vendar pa ne odstrani ostalih inhibitorjev PCR (npr. melanin) (McNevin in sod., 2005a).

Pomemben korak je tudi ultrafiltracija z mikrocentrifonkami, ki omogoča koncentriranje in odstranjevanje soli očiščene ekstrahirane DNA. Soli so pogosto prisotne v razgradnih/lizirajočih raztopinah in pospešujejo obarjanje oz. "salting out" proteinov med organsko ekstrakcijo ("salting out" je metoda ločevanja proteinov, ki temelji na principu, da so proteini slabše topni pri visoki koncentraciji soli) (Miller in sod., 1988). Poleg tega so prisotne soli inhibitorji PCR. Natrijevi ioni namreč vplivajo na temperaturo taljenja dvoverižne DNA in posledično spremenijo optimalne pogoje za PCR (McNevin in sod., 2005a).

3.5 EKSTRAKCIJA DNA IZ SLINE PO METODI CHELEX

S to metodo smo želeli preveriti pravilnost dobljenih rezultatov analize DNA iz las, odpadlih osebi A.

Postopek izolacije je bil sledeč:

- najprej smo z vatirano palčko podrgnili po ustni votlini osebe;
- vatirani del palčke smo prenesli v mikrocentrifugirko;
- dodali smo 400 μ l 5-odstotne suspenzije Chelex;
- mikrocentrifugirko smo stresali 10 s na vibracijskem mešalniku;
- inkubirali smo 30 min pri 56 °C;
- mikrocentrifugirko smo stresali 10 s na vibracijskem mešalniku;
- vzorec smo inkubirali 8 min v vreli kopeli;
- mikrocentrifugirko smo stresali 10 s na vibracijskem mešalniku;
- centrifugirali smo 3 min pri obratih 14 000 min^{-1} (uporabljali smo centrifugo Eppendorf 5417 C in pripadajoči rotor F-45-30-11);
- supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in do uporabe hranili pri -20 °C.

3.6 KVANTIFIKACIJA DNA – METODA PCR V REALNEM ČASU

Metodo PCR v realnem času smo uporabili za določevanje količine izolirane človeške DNA. Pri tem smo uporabili komercialni komplet "Quantifiler Human Quantification kit" proizvajalca Applied Biosystems, pri katerem se sonda veže na gen za telomernazno reverzno transkriptazo človeka (Quantifiler Kits..., 2005). Za uspešno določitev koncentracije DNA v vzorcu mora biti dolžina fragmentov DNA daljša od 62 bp.

Po navodilih proizvajalca smo pripravili ustrezno reakcijsko mešanico (Quantifiler kits..., 2005).

In sicer (količine so podane za en vzorec):

- 12,5 µl mešanice "Quantifiler™ PCR Reaction Mix",
- 10,5 µl mešanice "Quantifiler™ Human Primer Mix".

Mešanica "Quantifiler™ PCR Reaction Mix" vsebuje dNTP-je, raztopino, AmpliTaq Gold® DNA-polimerazo in referenčni standardm, označen s fluorescenčnim barvilom ROX™.

Mešanica "Quantifiler™ Human Primer Mix" vsebuje tarčno-specifična začetna oligonukleotida ter sondo, označeno s fluorescenčnim barvilom FAM™, ki se vežejo na gen za telomerazno reverzno transkriptazo človeka. Vsebuje tudi sistem za interno kontrolo pomnoževanja s PCR (IPC), in sicer umetno sintetizirano DNA, začetna oligonukleotida, ki se prilegata na sintetizirano DNA, in sondo, označeno s fluorescenčnim barvilom VIC.

V ploščico s 96 žepki smo v posamezen žepik nanesti prej pripravljeno reakcijsko mešanico, in sicer v vsak žepik po 23 µl. Nato smo v prvih 16 žepkov dodali po 2 µl standardne DNA različnih koncentracij (preglednica 3.3), v en žepik 2 µl vode (negativna kontrola), v ostale žepke pa po 2 µl vzorčne DNA. Nato smo na ploščico z nanešenimi vzorci nalepili plastično folijo in vse skupaj pokrili z gumijastim pokrovčkom (zmanjšanje možnosti kontaminacije med samim procesom). Ploščico smo položili v napravo "ABI Prism 7000 Sequence Detection System" (Applied Biosystems).

Pogoji pomnoževanja so navedeni v preglednici 3.2.

Preglednica 3.2: Pogoji pomnoževanja s PCR v realnem času

	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA-polimeraze	600	95	40
Denaturacija	15	95	
Prileganje in podaljševanje	60	60	

Za podajanje rezultatov smo uporabili programsko opremo "ABI Prism 7000 SDS Software" (Applied Biosystems). S pomočjo znanih koncentracij standardne DNA (preglednica 3.3) nam programska oprema "ABI Prism 7000 SDS Software" (Applied

Biosystems) izriše standardno umeritveno krivuljo. Iz naklona krivulje preverimo uporabnost standardne umeritvene krivulje za našo analizo, in sicer mora biti vrednost naklona med -3,3 in -3,1. Če je vrednost naklona nižja, krivulje ne moremo uporabiti za določitev koncentracije naših vzorcev, saj kaže na to, da je bila učinkovitost pomnoževanja slaba. Primernost krivulje preverimo še s parametrom R^2 , t.i. koeficient razhajanja, ki meri bližino prileganja med linijo standardne umeritvene krivulje in C_T posameznega standarda. Vrednost parametra R^2 mora biti najmanj 0,98; če je nižja, ni primerna za izračun koncentracij naših vzorcev. C_T (angl. threshold cycle) je cikel, pri katerem je presežen fluorescenčni prag (v forenziki je ta 0,2 in je že določen v programu) – ta predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja (Arko, 2004; Ginzinger, 2002).

Preglednica 3.3: Koncentracije vzorcev standardnih DNA, uporabljenih za izris standardne krivulje (Quantifiler kits..., 2005)

Standard	Koncentracija (ng/ μ l)
1	50 000
2	16 700
3	5 560
4	1 850
5	0,620
6	0,210
7	0,068
8	0,023

3.7 METODA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO (PCR)

Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) smo pomnoževali DNA, izolirano iz las in primerjalnih vzorcev moških in ženskih oseb.

3.7.1 Pomnoževanje klasičnih lokusov STR

Zaradi ugotavljanja razgrajenosti DNA v telogenskih laseh smo najprej DNA pomnoževali z uporabo komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems). Ta komercialni komplet vsebuje vse potrebne reagente za pomnoževanje desetih lokusov STR in dela amelogeninskega gena (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification ..., 2004). Dolžina amplikonov je v razponu od 113 do 350 bp.

Priprava reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA z uporabo kompleta "AmpFISTR SGM Plus" (količine so podane za en vzorec):

- 10,5 µl mešanice "PCR Reaction Mix"
- 0,5 µl *Taq* Gold DNA-polimeraze
- 5,5 µl mešanice "STR SGM Plus Primer Set"

V vsako mikrocentrifugirko smo dali 15 µl reakcijske mešanice in dodali še 10 µl mešanice izolirane DNA in sterilne vode. Razmerje je bilo odvisno od koncentracije izolirane DNA; optimalna količina DNA za PCR je pri kompletu "AmpFISTR SGM Plus" med 0,5 in 1,5 ng/µl (preglednica 3.4). Zaradi razgrajenosti DNA smo pri določenih vzorcih koncentracijo povečali celo na 4 ng/µl, da bi dobili dovolj DNA za uspešno profiliranje STR

Pogoji pomnoževanja so navedeni v preglednici 3.5.

Preglednica 3.4: Količini DNA in vode, ki smo ju dodali v reakcijsko mešanico PCR za posamezen vzorec pri uporabi komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus"

vzorci	koncentracija DNA (ng/ μ l)	DNA (μ l)	voda (μ l)
A3	1,9600	5	5
A4	2,3550	1,5	8,5
A7	2,0560	8	2
A10	1,7900	10	0
A15	2,8000	10	0
A16	2,3000	10	0
A17	3,1700	10	0
A19	2,7600	10	0
A21	2,1800	10	0
A23	1,0700	10	0
A24	2,0940	0,1	9,9
A25	0,6050	0,1	9,9
B4	4,2500	10	0
C2	2,9880	3	7
C5	0,6200	4	6
D4	0,4880	4	6
E1	0,0680	10	0
E3	0,0330	10	0
E5	0,0240	10	0
E7	0,0495	10	0
E8	/	5	0
E10	0,0650	10	0
F3	0,1470	10	0
G4	0,4550	10	0
H5	0,5380	10	0

Preglednica 3.5: Pogoji pomnoževanja za komercialni komplet "AmpFISTR SGM Plus"

Program	Čas (s)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA-polimeraze	660	95	
Denaturacija	60	94	28
Prileganje	60	59	
Podaljševanje	60	72	
Zaključno podaljševanje	2700	60	

3.7.2 Pomnoževanje lokusov miniSTR

Pri tej metodi smo za pomnoževanje DNA uporabili 5 parov začetnih oligonukleotidov (preglednica 3.6), ki prilegajo na 5 istih lokusov STR, ki so tudi v komercialnem kompletu "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems), le da prilegajo bližje variabilnemu delu lokusov STR in tvorijo amplikone, krajše od 110 bp. Vsi vodilni začetni oligonukleotidi so bili označeni s fluorokromom 5'-FAM, ki oddaja fluorescenco v modri svetlobi.

Preglednica 3.6: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov in velikost končnega fragmenta

Lokus	Nukleotidno zaporedje		Velikost končnega fragmenta (bp)
FGA	F	[FAM] GGCATATTTACAAGCTAGTTTCT	65-100
	R	ATTTGTCTGTAATTGCCAGC	
vWA	F	[FAM] TGACTTGGATTGATCTATCTGT	60-85
	R	GATAAATACATAGGATGGATGGA	
TH01	F	[FAM] CCTGTTCCCTCCCTTATTTCC	55-85
	R	GAACACAGACTCCATGGTG	
D3S1358	F	[FAM] AGCAAGACCCTGTCTCATAGA	55-85
	R	GTCAACAGAGGCTTGCATGTA	
Amelogenin	F	[FAM] CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG	103-109
	R	ATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	

* F pomeni vodilni začetni oligonukleotid (angl. forward), R pa povratni začetni oligonukleotid (angl. reverse).

3.7.2.1 Kontrolna DNA

Najprej smo pomnoževali kontrolno DNA 007, ki je del komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) in s tem preverili uspešnost pomnoževanja lokusov miniSTR v PCR z uporabo naših začetnih oligonukleotidov.

Podatki o kontrolni DNA 007 so navedeni v preglednici 3.7.

Preglednica 3.7: Aleli kontrolne DNA 007, ki je del komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification..., 2004)

Lokus STR	Aleli
D3S1358	15, 16
vWA	14, 16
D16S539	9, 10
D2S1338	20, 23
amelogenin	X, Y
D8S1179	12, 13
D21S11	28, 31
D18S51	12, 15
D19S433	14, 15
TH01	7, 9.3
FGA	24, 26

Postopek priprave reakcijskih mešanic je naveden v preglednici 3.8. Da smo določili optimalne pogoje pomnoževanja, smo preizkušali več različic. Različni pogoji pomnoževanja so navedeni v preglednicah 3.9, 3.10 in 3.11.

Preglednica 3.8: Reakcijski mešanici za pomnoževanje kontrolne DNA

reagent	reakcijska mešanica 1	reakcijska mešanica 2
10X raztopina <i>Taq</i> Gold (μl) *	2,5	2,5
<i>Taq</i> Gold DNA-polimeraza (μl)	0,4	0,4
začetni oligonukleotid F (μl) **	0,25 (50 mmol/l)	1 (12,5 mmol/l)
začetni oligonukleotid R (μl) **	0,25 (50 mmol/l)	1 (12,5 mmol/l)
kontrolna DNA 007 (μl) (0,1 ng/μl)	5	5
voda (μl)	16,6	15,1
skupni volumen (μl)	25	25

*Sestava 10X raztopine *Taq* Gold (AmpFISTR Reaction Mix):

- MgCl₂
- deoksinukleozid trifosfati (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- goveji serumski albumin (BSA)
- 0,05-odstotni natrijev azid (NaN₃)

** Uporabili smo 5 različnih parov začetnih oligonukletotidov za sledeče lokuse: FGA, vWA, THO1, D3S1358, amelogenin.

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico 1 (preglednica 3.8) in DNA pomnoževali pri pogojih 1 - mini BKA 1 (preglednica 3.9), vendar pomnoževanje ni bilo uspešno. Nato smo povečali koncentracijo začetnih oligonukleotidov (reakcijska mešanica 2 - preglednica 3.8), pomnoževanje prav tako ni bilo uspešno. Nato smo določili nove pogoje pomnoževanja, napisani so v preglednicah 3.10 in 3.11. Pri obeh pogojih smo uporabili reakcijsko mešanico 2. Pri prvi varianti, torej pogojih 2 – mini BKA 2 (preglednica 3.10), smo se odločili podaljšati čas denaturacije, prileganja in pomnoževanja, kot tudi čas zaključnega podaljševanja. Pri drugi varianti, torej pogojih 3 – mini STR1 (preglednica 3.11), je čas denaturacije, prileganja in pomnoževanja ter čas zaključnega podaljševanja ostal enak pogojem 2, spremenili pa smo temperaturo prileganja, ki smo jo zvišali s 54 °C na 59 °C. Najbolj ustrezna različica so bili pogoji 2 – mini BKA 2.

Preglednica 3.9: Pogoji pomnoževanja 1 – mini BKA1

Program	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA-polimeraze	660	95	
Denaturacija	30	94	34
Prileganje	30	54	
Podaljševanje	30	72	
Zaključno podaljševanje	1800	60	

Preglednica 3.10: Pogoji pomnoževanja 2 - mini BKA2

Program	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA-polimeraze	660	95	
Denaturacija	60	94	34
Prileganje	60	54	
Podaljševanje	90	72	
Zaključno podaljševanje	2700	60	

Preglednica 3.11: Pogoji pomnoževanja 3 - mini STR1

Program	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA-polimeraze	660	95	
Denaturacija	60	94	34
Prileganje	60	59	
Podaljševanje	90	72	
Zaključno podaljševanje	2700	60	

Pri pogojih pomnoževanja je še potrebno poudariti, da smo število ciklov povečali iz 28 na 34, v primerjavi s pomnoževanjem klasičnih lokusov STR.

3.7.2.2 Vzorci

Za pomnoževanja lokusov miniSTR smo na podlagi rezultatov kvantitativne PCR in profiliranja s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) izbrali dva vzorca telogenskih las, označena z G4 in A3. Z istimi začetnimi oligonukleotidi smo pomnoževali tudi DNA iz vzorca alelna lestvice, ki smo ga uporabili za določitev vrste alela pri pomnožitvi lokusov miniSTR.

Postopek priprave reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA iz vzorca alelna lestvice in DNA iz zavarovanih vzorcev telogenskih las je naveden v preglednici 3.12.

Preglednica 3.12: Reakcijska mešanica za pomnoževanje alelna lestvice in vzorčnih DNA

reagent	alelna lestvica	G4	A3	A3
10X raztopina <i>Taq</i> Gold (μl)	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>Taq</i> Gold DNA-polimeraza (μl)	0,4	0,4	0,4	0,4
začetni oligonukleotid F (μl)	1	1	1	1
začetni oligonukleotid R (μl)	1	1	1	1
DNA (μl)	1*	10 (0,445 ng/μl)	5 (1,960 ng/μl)	2 (0,784 ng/μl)
voda (μl)	19,1	10,1	15,1	18,1
skupni volumen (μl)	25	25	25	25

* Koncentracija DNA vzorca alelne lestvice ni poznana.

** Koncentracija začetnih oligonukleotidov je 12,5 mmol/l..

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju alelne lestvice in vzorčnih DNA, so za posamezni vzorec sledeči:

- alelna lestvica: uporabili smo začetne oligonukleotide za lokuse vWA, TH01, amelogenin
- G4: uporabili smo začetne oligonukleotide za lokuse vWA, TH01, amelogenin
- A3: uporabili smo začetna oligonukleotida za lokus TH01

Uporabili smo pogoje pomnoževanja 2 - mini BKA 2 (preglednica 3.10).

3.8 PROFILIRANJE STR

3.8.1 Kapilarna elektroforeza

Fragmente PCR, dobljene s pomnoževanjem DNA, smo ločili s kapilarno elektroforezo. Uporabili smo avtomatsko napravo za določevanje nukleotidnega zaporedja "310 Genetic Analyzer" (Perkin Elmer). Ločevanje pri kapilarni elektroforezi poteka v tekočem mediju POP (angl. performance optimized polymer). Zaznava pomnoženih produktov temelji na fluorescenci, ki jo oddajajo s fluorokromi označeni začetni oligonukleotidi.

Avtomatsko napravo za določanje nukleotidnega zaporedja smo morali najprej pripraviti. In sicer, najprej smo namestili kapilarno v aparaturu ter izvedli kalibracijo nosilca vzorca. Stekleno brizgalko smo nato do polovice napolnili s POP 4 ter jo čvrsto pritrdili na blok. Plastično brizgalko smo napolnili z raztopino 1X ter jo rahlo privili na blok, ki smo ga napolnili z raztopino 10X EDTA, s čimer smo odstranili zračne mehurčke (ti bi sicer povzročali nihanje toka). S pomočjo steklene brizgalke smo nato napolnili blok s POP 4. Nato smo posodici za anodno in katodno raztopino napolnili z raztopino 1X in ju namestili v aparaturu (posodico z anodno raztopino smo namestili na blok, posodico s katodno raztopino pa pod kapilarno). Potem smo nosilec z vzorci vstavili ter aparaturu zaprli. Grelna

ploščo smo segreli na 60 °C, medtem pa napisali seznam vzorcev ter ga prenesli v seznam zaporednega injiciranja vzorcev. Izbrali smo tudi primeren elektroforezni modul, ki določa naslednje pogoje za ločevanje fragmentov DNA:

- o temperatura: 60 °C,
- o predhodno injiciranje: 120 s,
- o čas polnjenja kapilare s polimerom iz brizge: 150 s,
- o čas injiciranja vzorca: 5 oz. 2 s,
- o napetost pri injiciranju vzorca: 15 kV,
- o elektroforezna napetost: 15 kV,
- o čas ločevanja: 24 min.

Ko je bila aparatura pripravljena, smo pripravili naslednjo mešanico (količine podane za en vzorec):

- 12 µl formamida (formamid denaturira DNA)
- 0,5 µl ROX (ROX je interni standard)

V vsako mikrocentrifugirko smo nato odpipetirali 12,5 µl pripravljene mešanice in dodali še 1 µl vzorca oz. alelne lestvice (alelno lestvico smo potrebovali za določevanje alelov).

3.8.2 Notranji velikostni standard (ROX)

Za avtomatsko določanje dolžin amplifikacijskih produktov smo morali predhodno definirati noranji velikostni standard. Uporabili smo notranji velikostni standard "GS 500 ROX" (Perkin Elmer), ki vsebuje 16 enoverižnih fragmentov DNA znanih dolžin, ki so označeni s fluorescentnim barvilom ROX (preglednica 3.13). Edini fragment, ki smo ga pri analizi izvzeli, je fragment dolg 250 nt, ker je zelo občutljiv za temperaturno spremembo, kar lahko povzroči napačno določitev dolžine alela.

Preglednica 3.13: Notranji velikostni standard "GS 500 ROX" (Perkin Elmer)

standard	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
velikost (bp)	35	50	75	100	139	150	160	200	250	300	340	350	400	450	490	500

3.8.3 Alelna lestvica

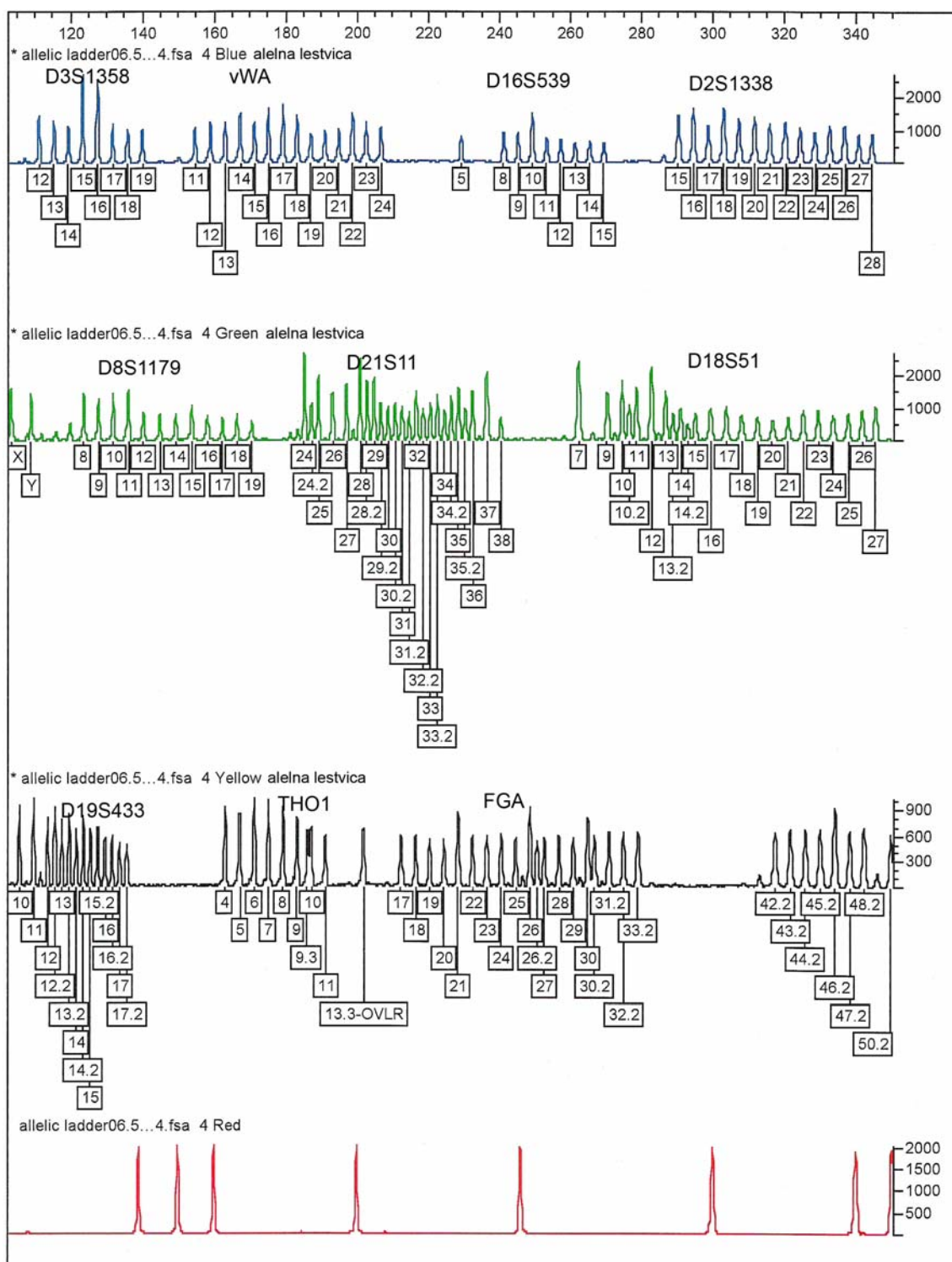
Za določitev tipa alela, za posamezni pomnoženi lokus, smo uporabili alelno lestvico iz komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) (preglednica 3.14), s čimer smo se izognili ročnemu določanju posameznih tipov alelov (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification..., 2004).

Preglednica 3.14: Aleli alelne lestvice komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification" (Applied Biosystems) (AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification..., 2004)

lokus STR	aleli v alelni lestvici	fluorescentno barvilo
D3S1358	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	5-FAM
vWA	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	5-FAM
D16S539	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	5-FAM
D2S1338	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	5-FAM
amelogenin	X, Y	JOE
D8S1179	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	JOE
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	JOE
D18S51	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	JOE
D19S433	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED
TH01	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	NED
FGA	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	NED

Začetni oligonukleotidi alelne lestvice imajo vezana različna fluorescentna barvila. Na sliki 3.2 vidimo, da so v prvi vrsti produkti pomnoževanja lokusov STR (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338), označeni z modrim fluorescentnim barvilom 5-FAM. V drugi vrstici so produkti pomnoževanja dela amelogeninskega gena in lokusov STR (D8S1179, D21S11, D18S51), označeni z zelenim fluorescentnim barvilom JOE. V tretji vrstici so produkti pomnoževanja lokusov STR (D19S433, TH01, FGA), označeni z rumenim fluorescentnim barvilom NED. V četrti vrstici pa vidimo notranji velikostni standard ROX.

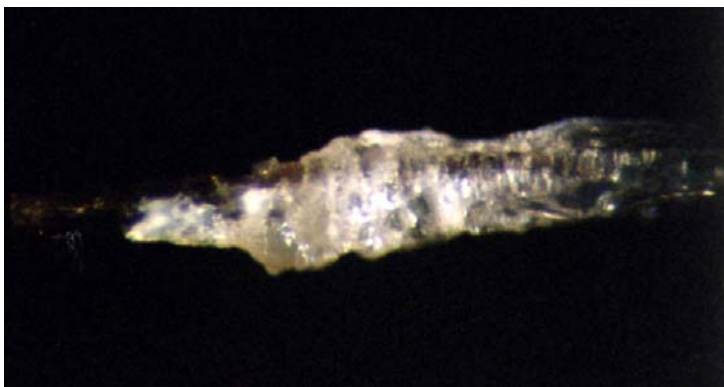
Različna fluorescentna barvila se uporabljajo, da ne pride do prekrivanja lokusov STR enakih velikostnih razredov, to bi namreč lahko povzročilo nepreglednost rezultatov.



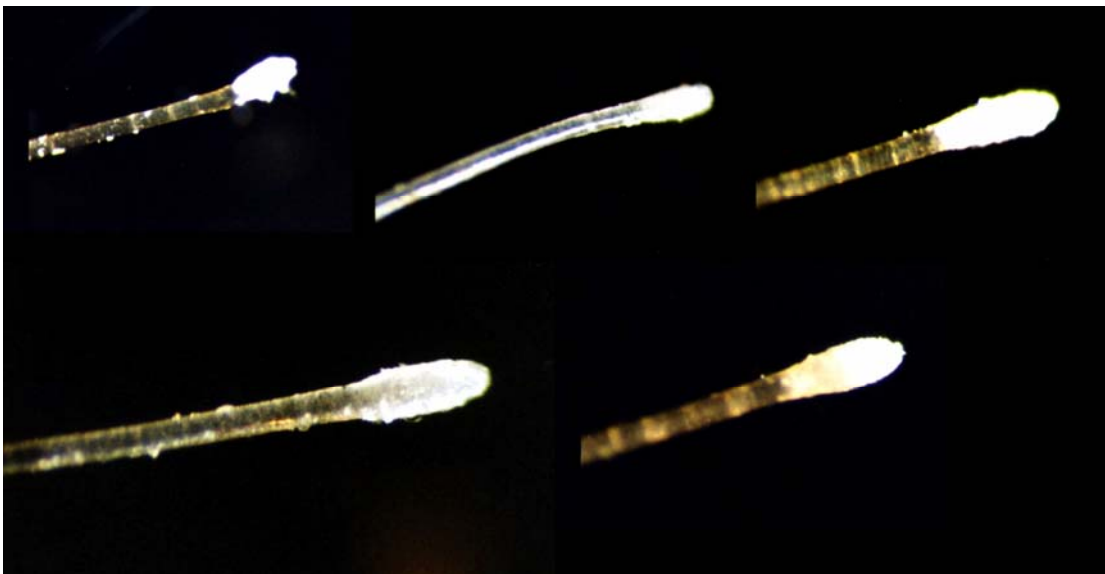
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOŠKA STRUKTURA LAS

Morfološka razlika v koreninskem predelu lasu, ki se nahaja v anagenski ali telogenski fazi, je prikazana na slikah 4.1 in 4.2. Pri lasu v anafazi je na koreninskem delu lepo vidno pritrjeno kožno tkivo, medtem ko je korenina las v telogenski fazi, ki so prikazani na sliki 4.2, gola.



Slika 4.1: Mikroskopski prikaz (pri 40-kratni povečavi) koreninskega predela lasu z vidnim okoliškim tkivom, izpuljen osebi A, označen z A24.



Slika 4.2. Mikroskopski prikaz (pri 40-kratni povečavi) koreninskega predela las, izpadlih osebi A. Vzorci las, označeni z A13, A14, A15, A16 in A17, si sledijo od leve proti desni ter od zgoraj navzdol. Pri vseh je dobro vidna gola korenina.

4.2 USPEŠNOST IZOLACIJE DNA IZ LAS

Zaradi ugotavljanja učinkovitosti izolacije DNA iz las glede na ekstrakcijsko raztopino, smo DNA izolirali iz 23 telogenskih las osebe A z uporabo treh različnih raztopin. DNA smo iz vzorcev, označenih z A1-A4 in A13-16, izolirali z uporabo raztopine BKA (Hellman in sod., 2001). Iz vzorcev, označenih z A5-A8 in A17-19, smo DNA izolirali z uporabo razgradne raztopine, ki se ob dodatku proteinaze K in občasno še DTT na splošno uporablja za izolacijo DNA iz bioloških vzorcev, medtem ko smo vzorce, označene z A9-A12 in A20-23, izolirali z uporabo razgradne raztopine z dodatkom CaCl_2 . Bistvena razlika med raztopinami je, da raztopina BKA ne vsebuje EDTA ter da so koncentracije soli pri raztopini BKA še enkrat višje v primerjavi z razgradno raztopino z dodatkom ali brez CaCl_2 . Rezultati koncentracij DNA za posamezni vzorec so podani v tabeli 4.1.

Povprečna koncentracija DNA, izolirane po postopku z raztopino BKA iz enega lasu v telogenski fazi, je bila 440 pg/ μl (preglednica 4.2). Povprečna koncentracija DNA, izolirane z razgradno raztopino, je bila 307 pg/ μl , pri uporabi iste raztopine z dodatkom CaCl_2 pa je bila povprečna koncentracija 106 pg/ μl (preglednica 4.2). Uspešnost izolacije z raztopino BKA je bila približno 40 % višja, kot pri uporabi razgradne raztopine in kar 4-krat višja, kot pri uporabi razgradne raztopine z dodatkom CaCl_2 . To bi morda lahko pojasnili z neprimerno kombinacijo kemikalij v razgradni raztopini s CaCl_2 (EDTA je znan kelator, ki nase veže kalcijeve ione, zato lahko pride do slabše aktivnosti proteinaze K). Zaradi nizke koncentracije DNA, izolirane z uporabo razgradne raztopine s CaCl_2 , kar je v nasprotju s predhodno objavljenimi rezultati, smo vpliv obeh raztopin na učinkovitost izolacije preverili pri osebi E. Iz petih telogenskih las smo DNA izolirali po postopku z raztopino BKA, iz drugih petih pa z razgradno raztopino s CaCl_2 . Povprečna koncentracija DNA, izolirana z uporabo raztopine BKA je bila 2,52 pg/ μl , z uporabo razgradne raztopine s CaCl_2 pa 2,29 pg/ μl (preglednica 4.2). Razlika v učinkovitosti med obema raztopinama je 11 %. Dobljeni rezultati kažejo, da bi dodatek kalcijevih ionov v razgradno raztopino, lahko vplival na znižanje aktivnosti proteinaze K. Za potrditev te hipoteze bi bilo potrebno preiskati večje število vzorcev, ker pa je bil namen diplomske naloge določiti najprimernejšo ekstrakcijsko raztopino, teh preiskusov nismo izvedli.

Preglednica 4.1: Rezultati kvantifikacije vzorcev po metodi PCR v realnem času

Vzorec	C _T *	Koncentracija DNA (ng/μl)
A1	30.99	0,376000
A2	30.46	0,542000
A3	30.93	0,392000
A4	28.91	1,570000
A5	31.14	0,340000
A6	31.17	0,333000
A7	31.55	0,257000
A8	30.02	0,734000
A9	35.23	0,020500
A10	32.07	0,179000
A11	31.66	0,238000
A12	34.81	0,027400
A13	35.81	0,009680
A14	32.20	0,121000
A15	31.00	0,280000
A16	31.25	0,230000
A17	30.84	0,317000
A18	nezaznavno	/
A19	31.03	0,276000
A20	33.70	0,042400
A21	31.37	0,218000
A22	34.82	0,019300
A23	32.38	0,107000
A24	24.87	20,94000
A25	26.64	6,050000
B1	33.26	0,077700
B2	32.27	0,161000
B3	32.60	0,126000
B4	30.96	0,425000
B5	31.79	0,230000
C1	31.01	0,317000
C2	29.34	0,996000
C3	nezaznavno	/
C4	nezaznavno	/
C5	32.06	0,155000
D1	nezaznavno	/
D2	nezaznavno	/
D3	nezaznavno	/
D4	32.41	0,122000
D5	33.04	0,077000
E1	36.29	0,006880
E2	nezaznavno	/

nadaljevanje, preglednica 4.1: Rezultati kvantifikacije vzorcev po metodi PCR v realnem času

Vzorec	C _T *	Koncentracija DNA (ng/μl)
E3	37.34	0,003300
E4	nezaznavno	/
E5	37.80	0,002400
E6	nezaznavno	/
E7	36.76	0,004950
E8	nezaznavno	/
E9	nezaznavno	/
E10	36.36	0,006500
F1	nezaznavno	/
F2	nezaznavno	/
F3	35.51	0,014700
F4	39.81	0,000608
F5	36.75	0,005840
G1	36.10	0,009440
G2	34.83	0,024200
G3	35.41	0,015800
G4	34.01	0,044500
G5	37.06	0,004660
H1	34.36	0,034400
H2	35.69	0,012800
H3	36.61	0,006510
H4	37.06	0,004660
H5	33.75	0,053800

* C_T = število ciklov pri fluorescenčnem pragu.

Preglednica 4.2: Povprečne koncentracije DNA v ng/μl za različne vzorce telogenskih las po ekstrakciji v različnih ekstrakcijskih raztopinah

Vzorci	Ekstrakcijska raztopina	Povpr. koncentracija DNA (ng/μl)
A1-A4	raztopina BKA	0,44000
A13-A16		
A5-A8	razgradna raztopina	0,30700
A17-A19		
A9-A12	razgradna raztopina s CaCl ₂	0,10600
A20-23		
E1-E5	BKA	0,00252
E6-E10	razgradna raztopina s CaCl ₂	0,00229
B1-B5	BKA	0,20400
C1-C5	BKA	0,29400
D1-D5	BKA	0,04000
F1-F5	BKA	0,00423
G1-G5	BKA	0,01972
H1-H5	BKA	0,02243

* na 200 μl raztopine, smo dodali 16 μl DTT in 10 μl proteinaze K

Glede na dobljene rezultate smo DNA iz vseh drugih vzorcev telogenskih las izolirali z uporabo raztopine BKA. Najvišje koncentracije DNA smo dobili pri osebi A, v povprečju 440 pg/μl, visoke koncentracije DNA pa smo dobili tudi pri osebah B, C in D. Povprečna koncentracija pri osebi B je bila 204 pg/μl, pri osebi C je bila 294 pg/μl in pri osebi D 40 pg/μl. Te osebe so med seboj tudi sorodstveno povezane (A in B sta sestra in brat, C in D pa njuna starša). Zelo nizke koncentracije DNA smo dobili pri osebah E (2,52 pg/μl) in F (4,23 pg/μl), nekoliko višje pa pri osebah G (19,72 pg/μl) in H (22,43 pg/μl).

Vzorca A24 in A25 sta iz primerjalne analize učinkovitosti izolacije DNA izvzeta, saj vzorec A24 predstavlja anagenski las, vzorec A25 pa bris sline. Iz rezultatov je razvidno, da je koncentracija DNA iz lasu v anagenski fazi pri osebi A, kar 20 ng/μl, kar je 45-krat višja koncentracija od povprečne koncentracije DNA, izolirane iz lasu v telogenski fazi pri osebi A, pri uporabi iste ekstrakcijske raztopine. Takšna razlika je posledica dejstva, da v anagenškem lasu DNA ni razgrajena, hkrati pa je v lasni korenini zaradi mitotsko aktivnega stanja prisotne več DNA, kot celicah v lasni korenini telogenske faze, poleg tega

pa je prisotno še adherentno tkivo (slika 4.1), ki dejansko največ doprinese k višji količini DNA v vzorcu.

Pri nekaterih vzorcih rezultata o koncentraciji DNA nismo dobili (nezaznavno). Možnih je več razlogov:

- v danem vzorcu ni bilo prisotne DNA;
- v danem vzorcu je bila DNA razgrajena na fragmente krajše od 62 bp, kot je dolžina amplikona pri kvantitativni PCR;
- lahko je prišlo do inhibicije.

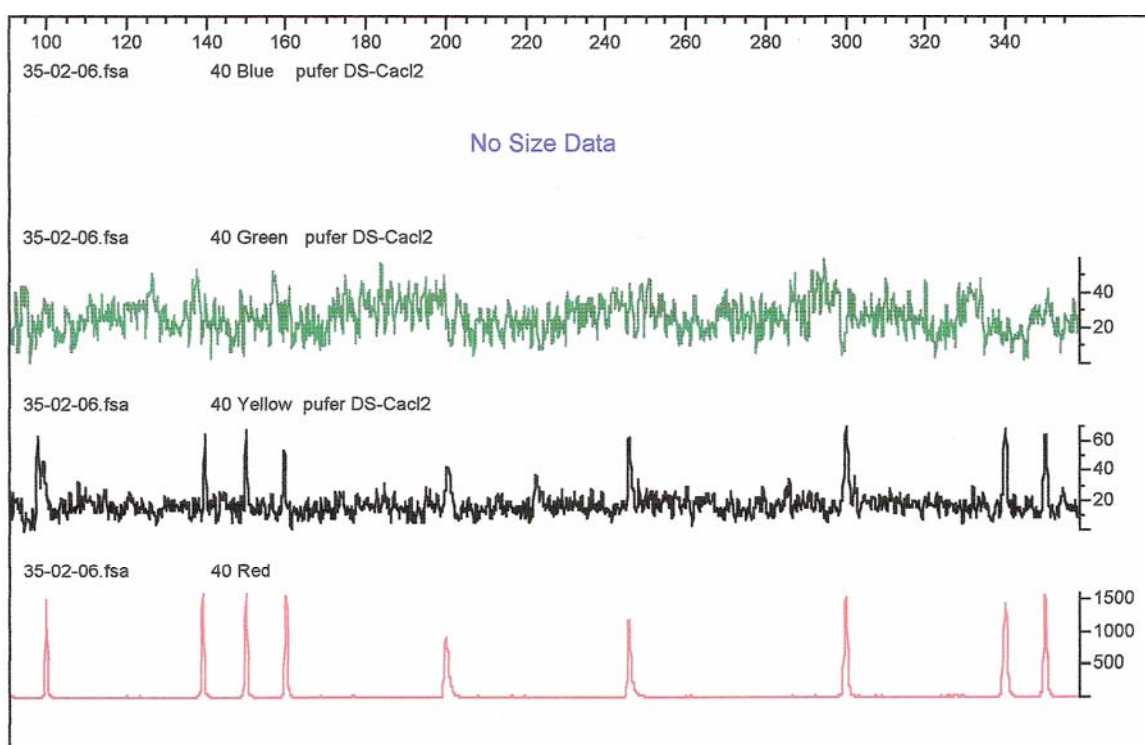
Kvantitativna PCR s sistemom IPC omogoča preverjanje inhibicije. V nobenem vzorcu nismo zasledili prisotnost inhibicije, zaradi česar koncentracije DNA v vzorcu ne bi bilo mogoče določiti.

Glede na rezultate ugotavljamo, da je izkoristek DNA iz telogenskih las odvisen od uporabljene ekstrakcijske raztopine, razlika je lahko do 4-kratna, vendar pa je v večji meri odvisen od posameznika (odvisnost od donorja), katerega lase smo uporabili v preiskavi. Razlike med posamezniki varirajo od najvišje koncentracije, ki je 440 pg/ μ l, do najnižje, ki znaša 2,52 pg/ μ l, kar je več kot 170-kratna razlika. Pri osebah, ki so v sorodstvenih odnosih, predvsem mati in oba otroka, smo ugotovili, da imajo njihovi lasje zelo visoko koncentracijo DNA, čeprav izolirano iz telogenskih las. Iz tega lahko sklepamo, da je količina DNA, ki jo lahko izoliramo iz posameznikovega lasu, verjetno genetsko pogojena. Vzrok pa ni poznan.

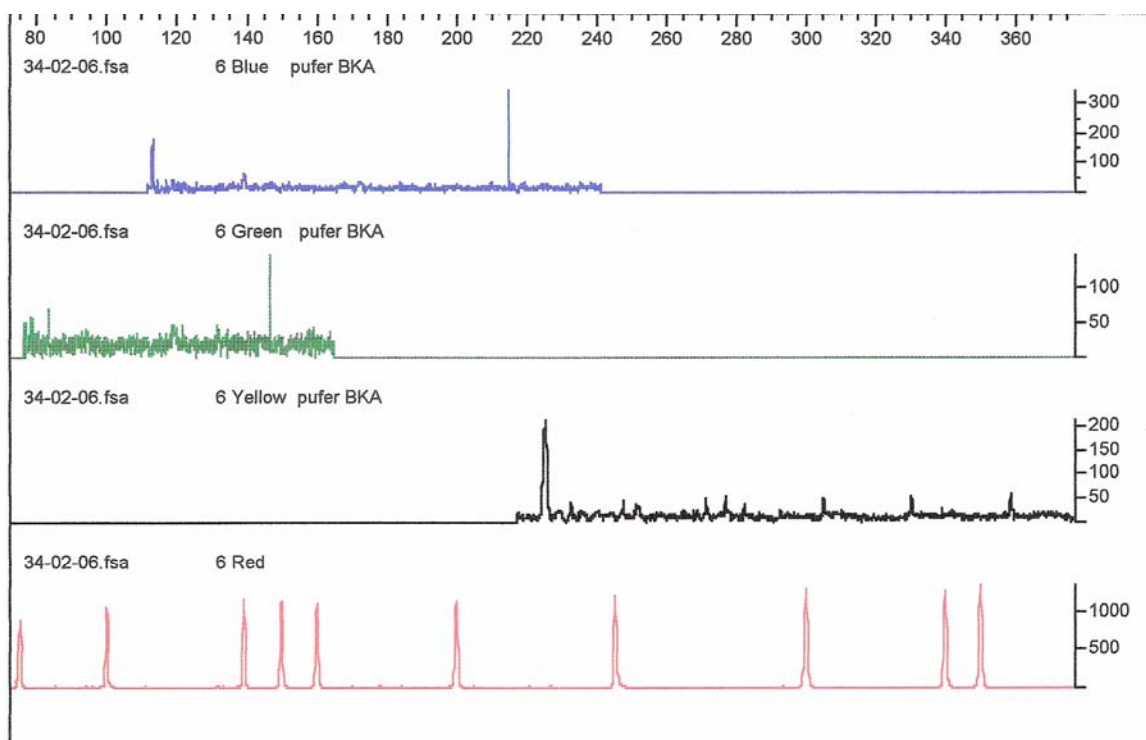
4.3 PROFILIRANJE STR

4.3.1 Negativne kontrole

Sliki 4.3 in 4.4 kažeta elektroferograma negativnih kontrol pri pomnoževanju s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus". Preverjali smo potencialno kontaminacijo ekstrakcijskih raztopin, razgradne z dodanim CaCl_2 in BKA, ki smo ju uporabljali pri izolaciji DNA iz las, tako da smo v reakcijsko mešanico namesto DNA dodali 10 μl posamezne raztopine. Iz elektroferogramov je razvidno, da ni prisotne nobene tuje DNA, torej raztopini nista bili kontaminirani.



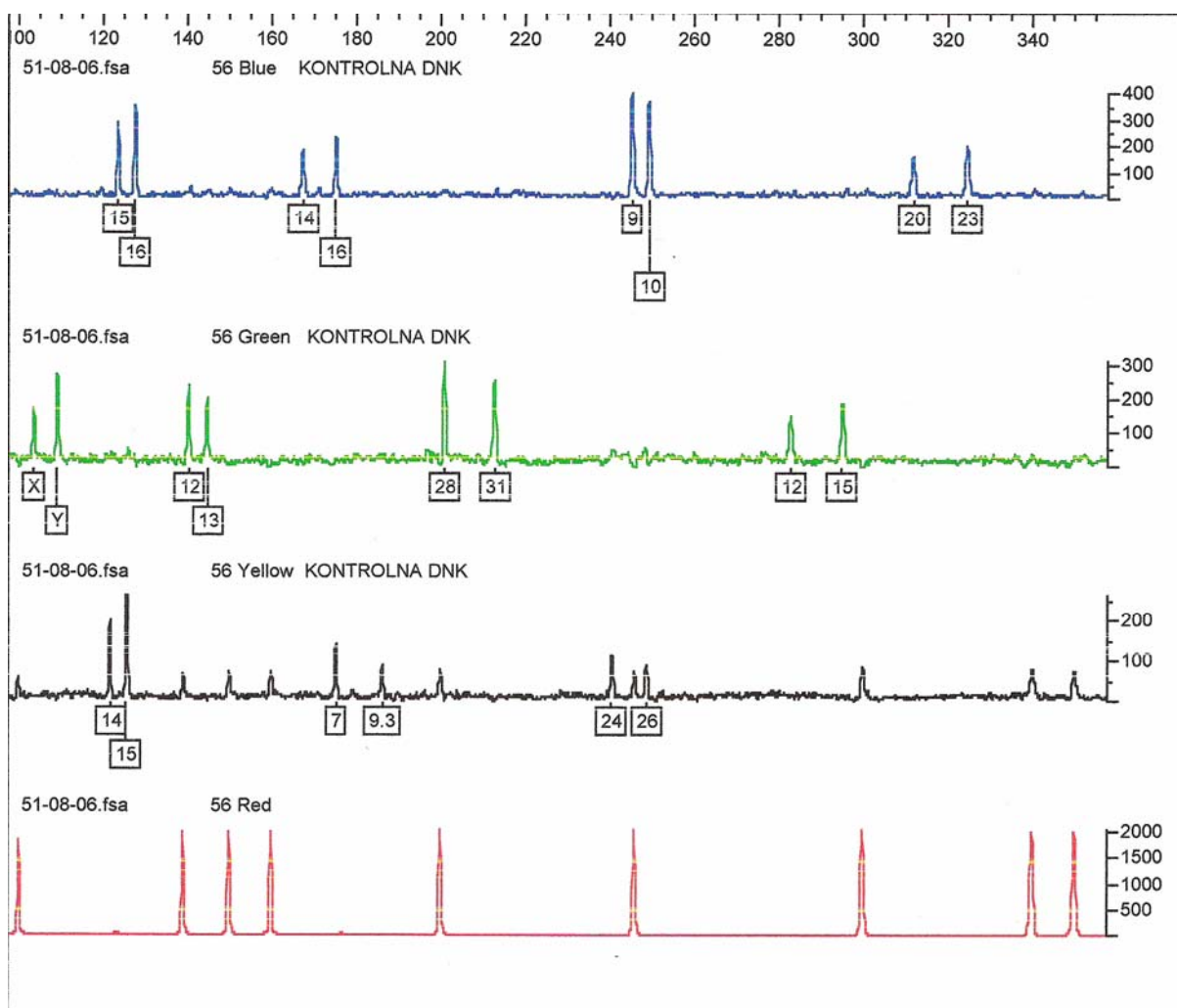
Slika 4.3: Elektroferogram negativne kontrole pri uporabi razgradne raztopine z dodanim CaCl_2 , pri pomnoževanju s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus"



Slika 4.4: Elektroferogram negativne kontrole pri uporabi raztopine BKA, pri pomnoževanju s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus"

4.3.2 Pozitivna kontrola

Pravilnost postopka PCR smo preverjali s pozitivno kontrolo DNA 007 iz komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus". Na sliki 4.5 vidimo, da smo dobili celoten profil STR, ki se tudi ujema s podatki o kontrolni DNA 007 (preglednica 3.7). Lahko torej trdimo, da smo postopek pravilno izvedli.



Slika 4.5: Elektroferogram kontrolne DNA 007 pri uporabi komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus"

4.3.3 Vzorci, ki smo jih pomnoževali s standardnimi začetnimi oligonukleotidi iz komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus Amplification kit" (Applied Biosystems)

Preden smo uporabili sistem za profiliranje z miniSTR smo morali preveriti učinkovitost profiliranja z uporabo klasičnih začetnih oligonukleotidov. Za prikaz učinkovitosti profiliranja STR smo izbrali komercialni komplet "AmpFISTR SGM Plus". V preglednici 4.3 so prikazani rezultati profiliranja STR s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus", ki smo jih dobili pri analizi s kapilarno elektroforezo za določen vzorec. Pri vzorcih

iz telogenskih las, označenih z A3, A4, A15, A19, B4, C2, D4, H5 smo lahko določili celoten profil STR, pri vzorcih A10, A17 in A21 delni profil STR, pri vzorcih A7, A16, A23, E1, E3, E5, E7, E8, E10, F3 in G4 pa profila STR nismo mogli določiti.

Vzorcema A24, anagenski las osebe A, in A25, primerjalni vzorec slin osebe A, smo v skladu s pričakovanji lahko določili celoten profil STR. Namen profiliranja STR teh dveh vzorcev je bil določiti kontrolni profil osebe A, potrditev, da je bila izolirana DNA iz lasu telogenske faze od osebe A in ne kontaminacije.

Preglednica 4.3: Rezultati profiliranja STR s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus", ki smo jih dobili pri analizi s kapilarno elektroforezo

Vzorec	Rezultat kapilarne elektroforeze
A3	cel profil
A4	cel profil
A7	negativno
A10	delni profil (7 lokusov)
A15	cel profil
A16	negativno
A17	delni profil (8 lokusov)
A19	cel profil
A21	delni profil (7 lokusov)
A23	negativno
A24	cel profil
A25	cel profil
B4	cel profil
C2	cel profil
D4	cel profil
E1	negativno
E3	negativno
E5	negativno
E7	negativno
E8	negativno
E10	negativno
F3	negativno
G4	negativno
H5	cel profil

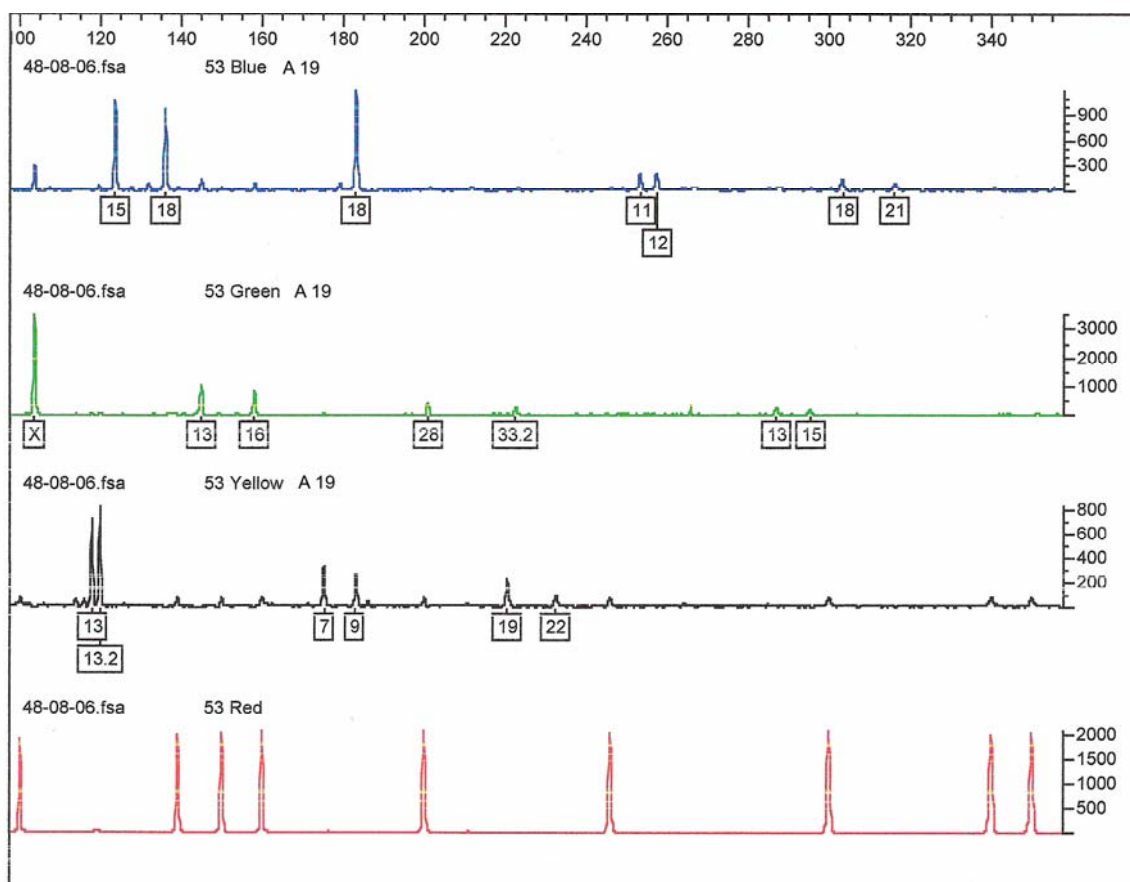
Preglednica 4.4 (glej prilogo A) kaže uspeh profiliranja STR glede na način izolacije DNA iz telogenskih las. Pri postopku izolacije DNA iz telogenskih las smo v mikrocentrifugirko s telogenim lasom dodali 200 μ l ekstrakcijske raztopine, 16 μ l DTT in 10 μ l proteinaze K. Testirali smo tri različne raztopine (BKA, razgradno, razgradno z dodanim CaCl_2).

S kvantitativno PCR smo ugotovili, da je bila koncentracija DNA, izolirana pri uporabi raztopine BKA, višja kot pri drugih dveh raztopinah. Vendar pa iz koncentracije DNA ni bilo mogoče razbrati ali je bila DNA razgrajena. Zato smo najprej proučevali profile STR 10. vzorcev DNA iz telogenskih las osebe A. Od teh smo štiri izolirali z raztopino BKA (A3, A4, A15 in A16), tri z razgradno raztopino (A7, A17 in A19) in tri z razgradno raztopino s CaCl_2 (A10, A21 in A23). Količina DNA, ki smo jo pomnožili s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus", je bila med 1 ng in 3 ng. Iz preglednice 4.4 je razvidno, da smo boljše rezultate (več celotnih ali vsaj delnih profilov) dobili pri izolaciji z raztopino BKA (v primerjavi z razgradno raztopino in razgradno raztopino z dodanim CaCl_2), kar pomeni, da je bila izolirana DNA pri uporabi raztopine BKA tudi manj razgrajena. Uspešnost profiliranja pa je bila boljša, ko smo pri ekstrakciji uporabili razgradno raztopino, kot ko smo uporabili razgradno raztopino z dodanim CaCl_2 . Glede na naše rezultate lahko sklepamo, da je za učinkovito razgradnjo keratinskega skeleta las potrebna proteinaza K, DTT in tudi kalcijevi ioni. Medsebojni negativni vpliv EDTA in CaCl_2 v raztopini, ki povzroči slabšo učinkovitost izolacije in bolj razgrajeno DNA, v primerjavi z uspešnostjo izolacije in profiliranja pri uporabi razgradne raztopine le z dodano proteinazo K in DTT, ne znamo povsem razjasniti. Ena od možnosti je, da je proteinaza K manj aktivna kot v razgradni raztopini brez dodatka kalcijevih ionov, vključno prisotnosti EDTA. Vendar pa zaradi majhnega števila vzorcev rezultati niso statistično dovolj verodostojni. Za potrditev hipoteze bi bile potrebne raziskave na večjem številu vzorcev, kar pa ni bil namen te diplomske naloge.

Primerjavo uspešnosti glede na vrsto uporabljene ekstrakcijske raztopine smo želeli preveriti tudi pri osebi E. Profile STR smo preučevali pri 3 vzorcih, označenih z E1, E3 in E5, izoliranih z raztopino BKA in 3 vzorcih, označenih z E7, E8 in E10, izoliranih z razgradno raztopino z dodatkom CaCl_2 . V vseh primerih smo zaradi nizke koncentracije

DNA v vzorcih lahko pomnoževali s komercialnim kompletom "AmpFISTR SGM Plus" le majhno količino DNA, in sicer med 20 in 60 pg. Profiliranje STR je bilo neuspešno, kar je bilo v skladu s pričakovanji. Količina DNA iz telogenskih las preostalih oseb, pri katerih smo proučevali profile STR, je bila med 500 pg in 4 ng, kar ustreza zahtevam proizvajalca komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus".

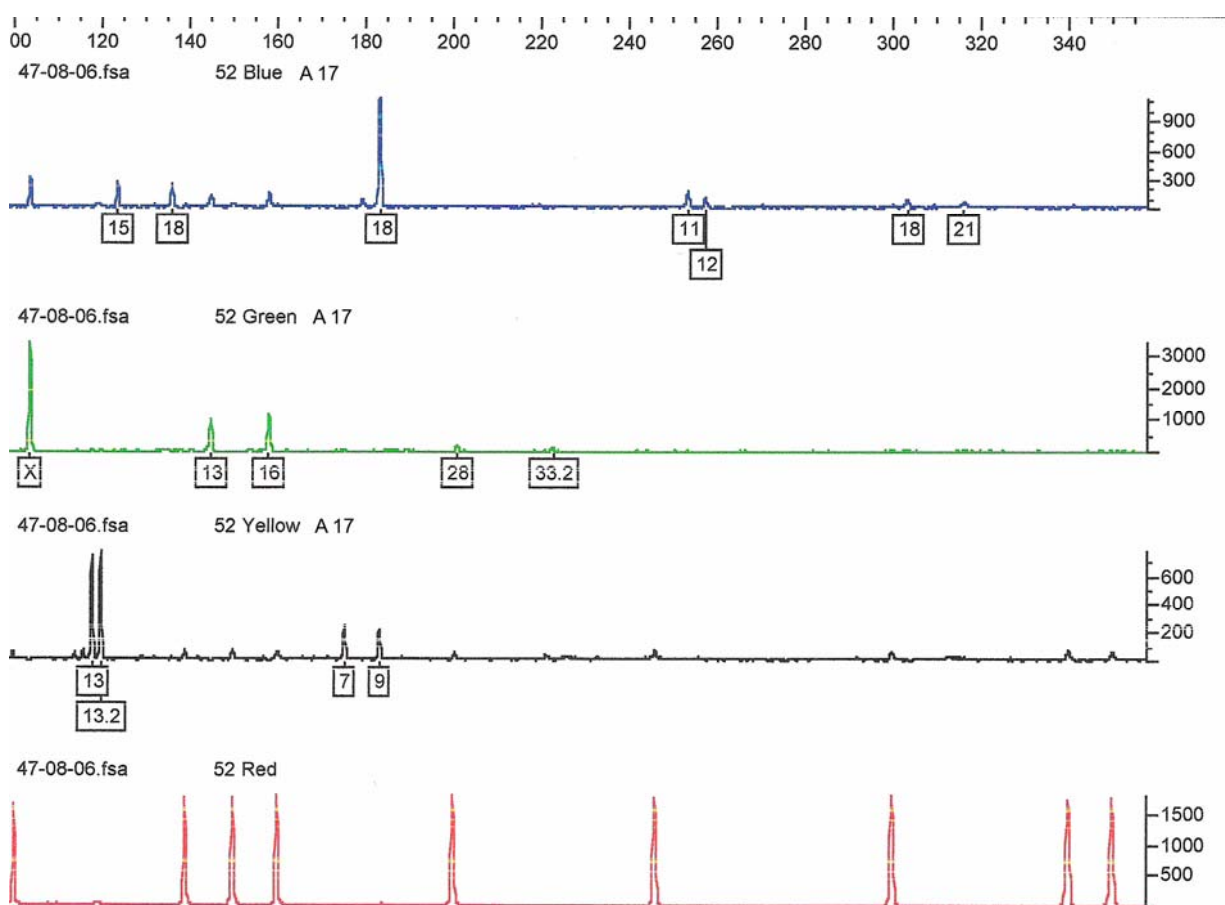
Profil STR osebe A, ki smo ga pridobili iz telogenskih las (vzorci A3, A4, A7, A10, A15, 16, A17, A19, A21, A23), smo primerjali s profilom osebe A, ki smo ga pridobili iz slin (A25) in iz anagenškega lasu (A24). V vseh primerih je pršlo do ujemanja profilov STR, kar pomeni, da DNA, izolirana iz telogenskih las, ni bila posledica kontaminacije.



Slika 4.6: Elektroferogram vzorca A19. Vidni so aleli v vseh desetih lokusih STR kot tudi v amelogeninskem delu.

Slika 4.6 kaže uspešnost profiliranja STR vzorca A19. Vidimo, da je bila izolacija DNA iz telogenskih las uspešna in smo dobili celoten profil STR osebe A. Podobno sliko (celotni

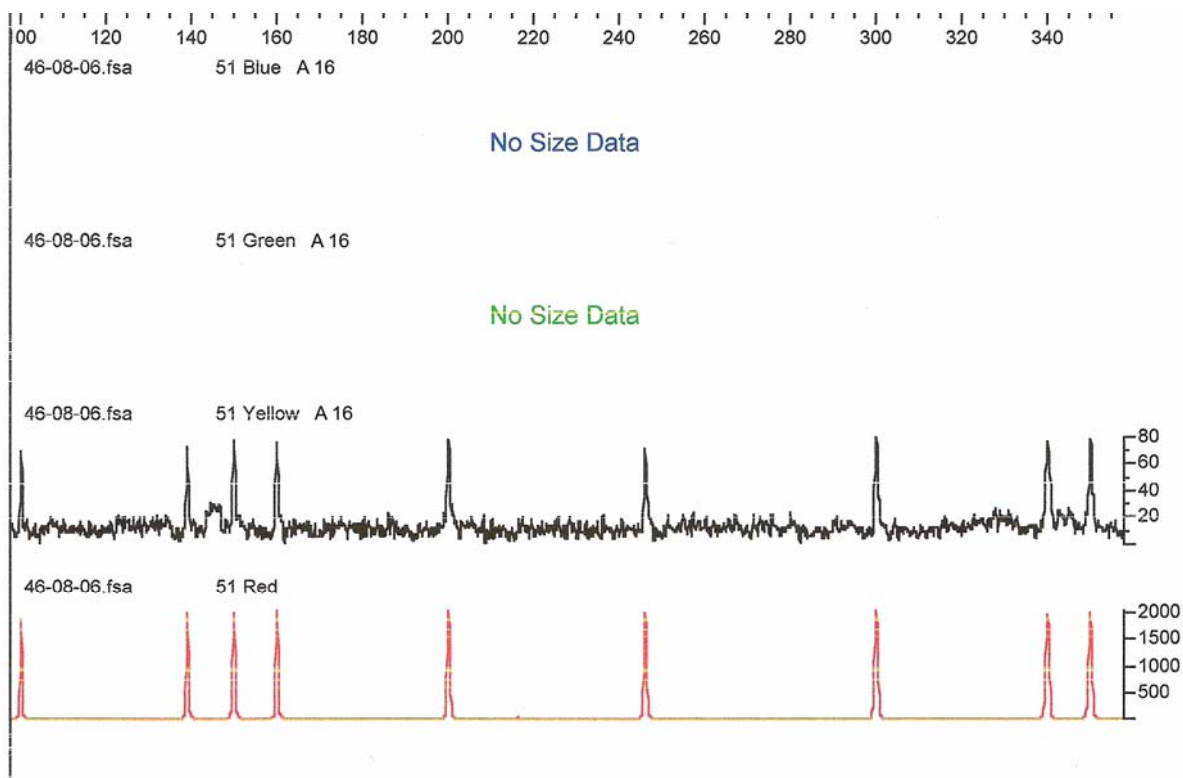
profil STR) smo dobili tudi pri vzorcih A3, A4, A15, A19, A24, A25, B4, C2, D4 in H5. Vzorec A24 je anagenski las osebe A, zato smo pri tem vzorcu pričakovali tak rezultat, enako velja tudi za vzorec A25 (bris slin). Pri ostalih vzorcih pa so rezultati v nasprotju z našimi pričakovanji. V literaturi (Hellman in sod., 2001; McNevin in sod., 2005a) so namreč poročali, da s standardnimi začetnimi oligonukleotidi izolacija DNA iz telogenskih las ni uspešna, zato so poleg različnih metod ekstrakcij razvili nove začetne oligonukleotide, ki tvorijo krajše amplikone.



Slika 4.7: Elektroferogram vzorca A17. Vidni so aleli v osmih lokusih STR kot tudi v amelogeninskem delu.

Slika 4.7 kaže profiliranje STR vzorca A17. Pri vzorcu A17 smo uspeli določiti le delni profil STR v 8 lokusih. Aleli, ki jih nismo mogli določiti, izvirajo iz lokusov D18S51 in

FGA, katerih dolžina je med 220 in 360 bp in sodijo med daljše alele, kar pomeni, da je DNA v vzorcu razgrajena. Podoben rezultat smo dobili tudi pri profiliranju STR vzorcev A10 (7 lokusov) in A21 (7 lokusov).



Slika 4.8: Elektroferogram vzorca A16. Profiliranje STR ni bilo uspešno.

Slika 4.8 kaže elektroferogram neuspešnega profiliranja STR vzorca A16. Iz slike je razvidno, da profila STR nismo dobili. Podobno sliko smo dobili tudi pri vzorcih A7, A23, E1, E3, E5, E7, E8, E10, F3 in G4. Rezultati so v skladu z našimi pričakovanji, saj smo pričakovali, da profiliranje STR v DNA iz telogenskih las s standardnimi začetnimi oligonukleotidi ne bo uspešno. Namreč DNA v telogenskih laseh je običajno močno razgrajena, zato je s standardnimi začetnimi oligonukleotidi ne moremo uspešno pomnožiti.

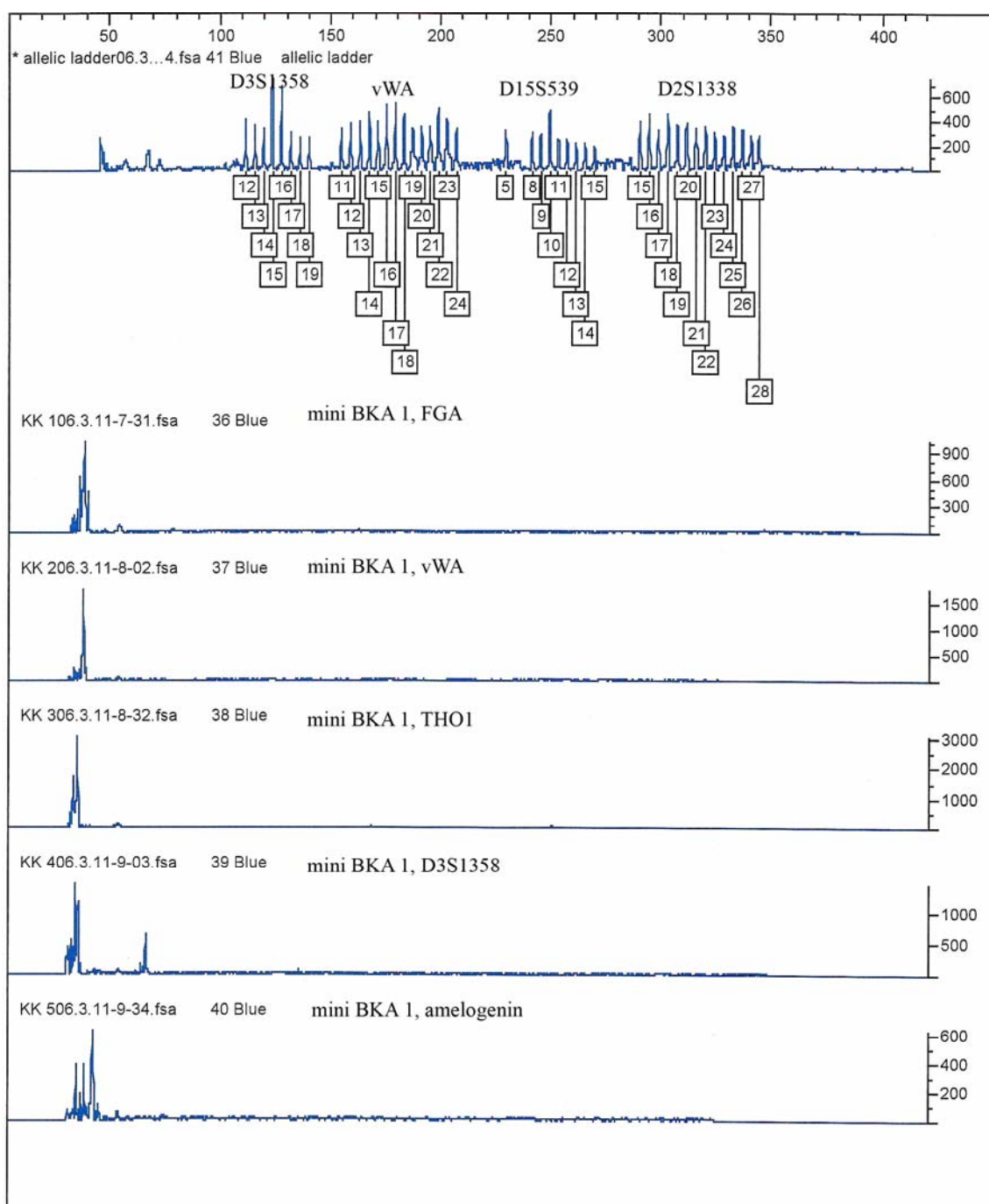
Iz naših rezultatov (slike 4.6, 4.7 in 4.8) lahko sklepamo, da je uspešnost določitve profila STR in s tem identifikacije posameznika, od katerega izvira las, odvisna predvsem od posameznika, od katerega las izvira. Nekateri posamezniki vsebujejo v laseh v telogenski

fazi še dovolj nerazgrajene DNA, da jim lahko določimo profil STR z uporabo komercialnih kompletov, ki vsebujejo klasične začetne oligonukleotide. Dobljeni rezultati so v nasprotju s predhodnimi rezultati drugih avtorjev (Hellmann sod., 2001; McNevin in sod., 2005b) saj smo dvema od petih nesorodnih oseb lahko določili profil STR iz telogenskih las. Pri drugih treh osebah je bila DNA v telogenskih laseh tako razgrajena, da določitev profila STR z uporabo klasičnih začetnih oligonukleotidov ni bila uspešna.

4.3.4 Vzorci, ki smo jih pomnoževali z novimi začetnimi oligonukleotidi (miniSTR)

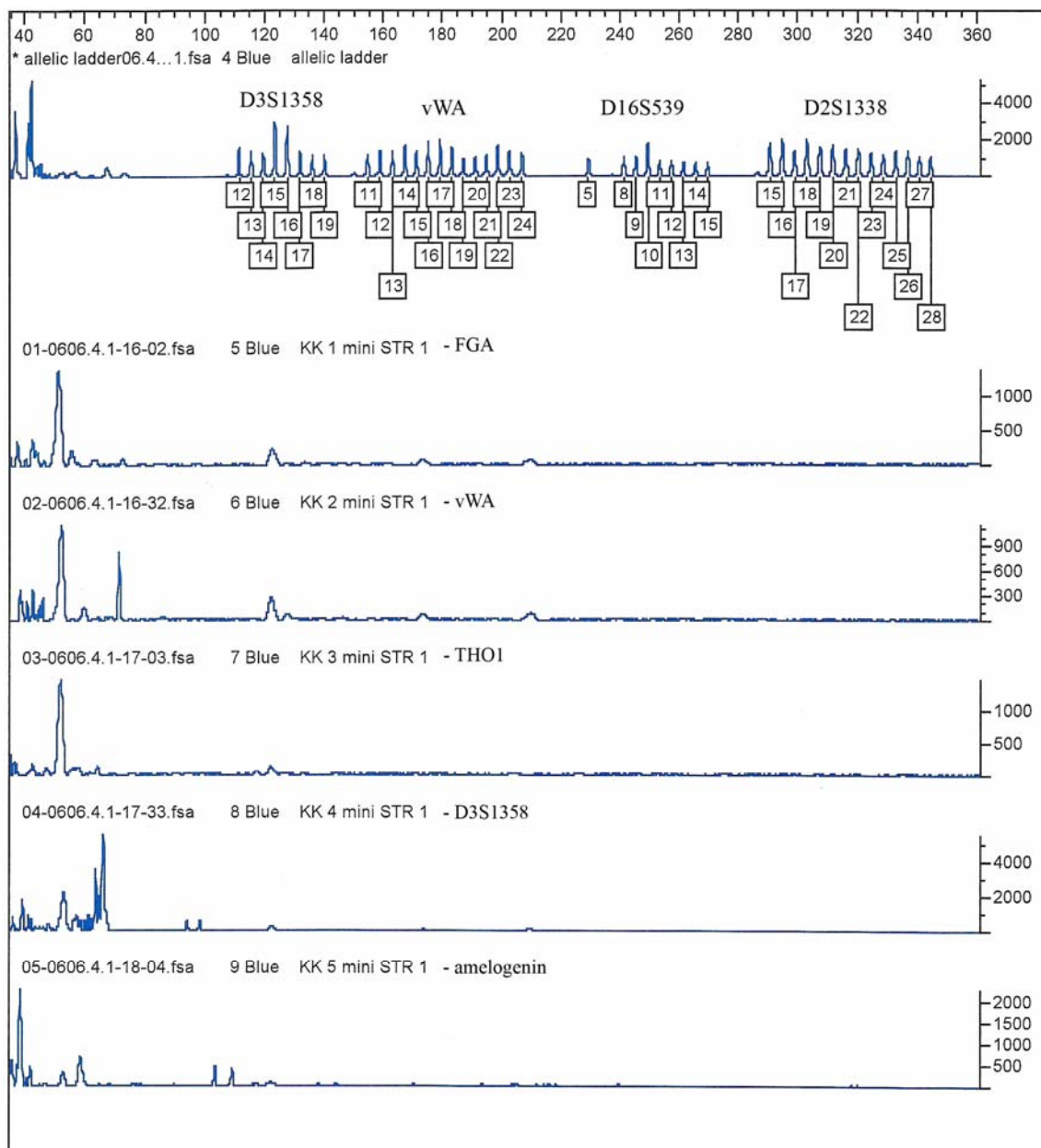
4.3.4.1 Kontrolna DNA

Zaradi določevanja primernih pogojev pomnoževanja lokusov miniSTR (za lokuse FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin) z novimi začetnimi oligonukleotidi smo za kontrolo učinkovitosti vzeli vzorec kontrolne DNA 007. Lokuse miniSTR smo pomnoževali pri treh različnih pogojih (mini BKA1, mini STR1, mini BKA2). Pomnoževanje pri pogojih mini BKA1 se je izkazalo za neuspešno, čeprav smo upoštevali pogoje PCR, ki jih navaja Hellmann s soavtorji, hkrati pa smo iste podatke dobili tudi pri osebni komunikaciji z enim od avtorjem (dr. Schmitter). Pomnoževanje smo ponovili pri istih pogojih mini BKA1, pri tem smo v reakcijsko mešanico dodali višjo koncentracijo začetnih oligonukleotidov, zaradi njihove morebitne nizke specifičnosti. Pomnoževanje je bilo prav tako neuspešno. Pogoje PCR smo nato spremenili, tako da smo podaljšali čas prileganja in podaljševanja (mini BKA2), v drugem primeru pa smo zaradi višje specifičnosti poleg podaljšanih časov še povišali temperaturo prileganja (mini STR1). Ugotovili smo, da je bilo pomnoževanje delno uspešno le pri pogojih mini BKA2, zato smo v nadaljevanju pri pomnoževanju vzorčnih DNA iz telogenskih las oseb G in A uporabili pogoje pomnoževanja mini BKA2.



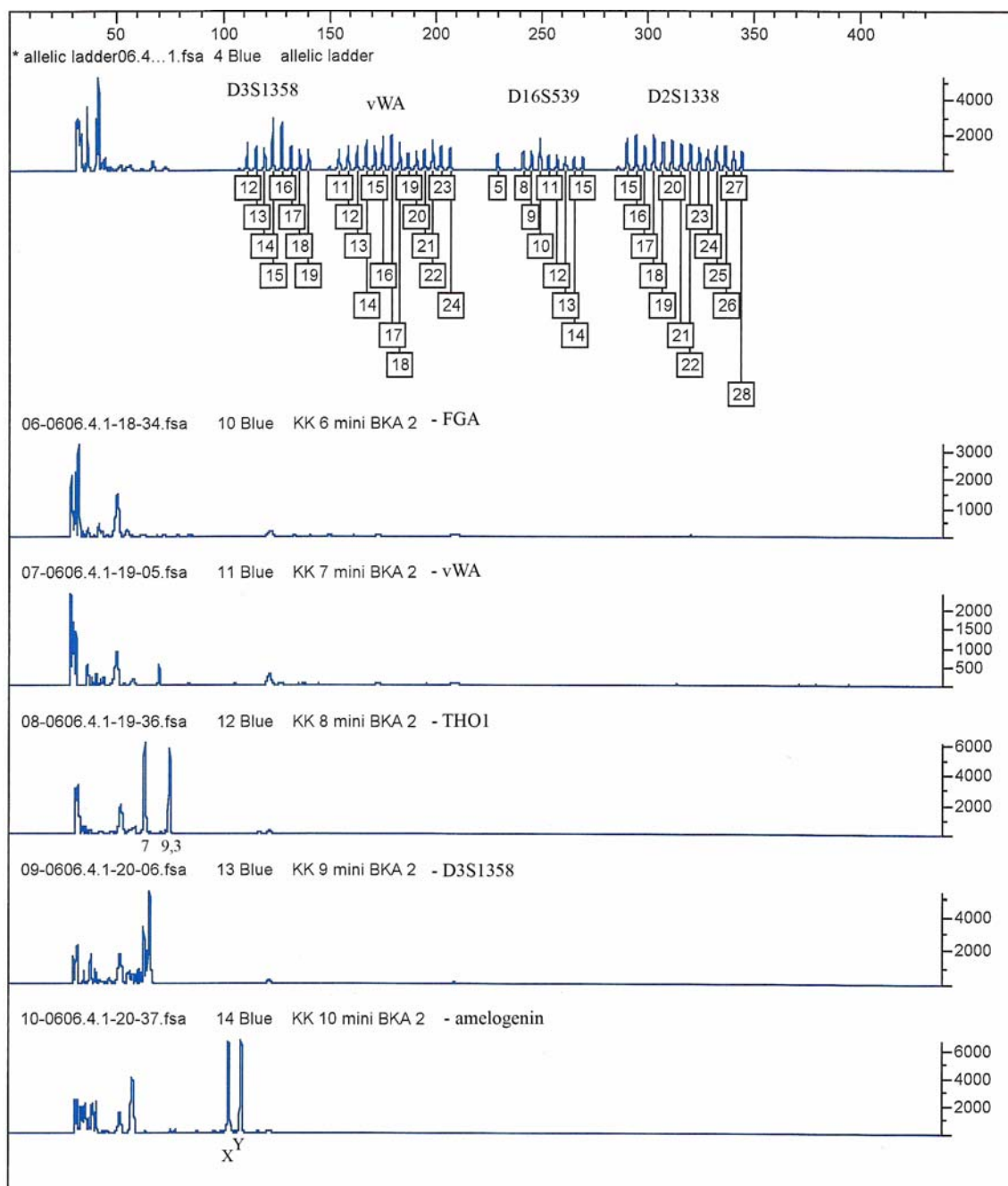
Slika 4.9: Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri pogojih mini BKA1

Slika 4.9 kaže pomnoževanje kontrolne DNA 007 z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (za lokus FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin). DNA smo pomnoževali pri pogojih mini BKA1. Iz slike je razvidno, da pomnoževanje pri omenjenih pogojih ni uspelo z nobenim od naštetih parov začetnih oligonukleotidov.



Slika 4.10: Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnimi oligonukleotidov pri pogojih mini STR1

Slika 4.10 kaže pomnoževanje kontrolne DNA 007 z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (za lokus FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin). DNA smo pomnoževali pri pogojih mini STR1. Iz slike je razvidno, da pomnoževanje pri omenjenih pogojih ni bilo uspešno z nobenim od naštetih parov začetnih oligonukleotidov.

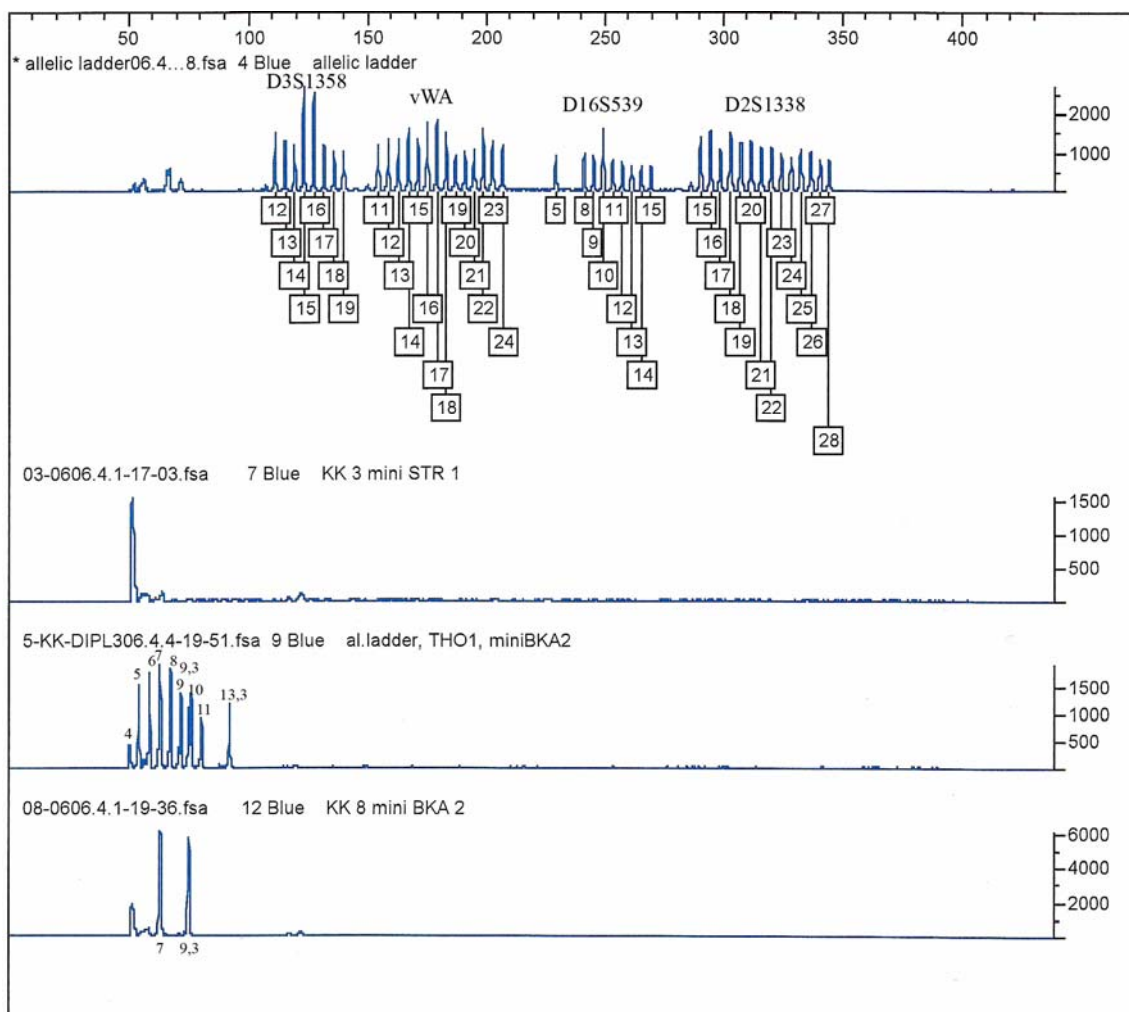


Slika 4.11: Elektroferogram pomnoževanja kontrolne DNA 007 s petimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov pri pogojih mini BKA2

Slika 4.11 kaže pomnoževanje kontrolne DNA 007 z različnimi pari začetnih oligonukleotidov (za lokus FGA, vWA, TH01, D3S1358, amelogenin) pri spremenjenih pogojih - mini BKA2. Iz slike je razvidno, da je bilo pomnoževanje uspešno le z začetnimi oligonukleotidi za TH01 in amelogenin.

V nadaljevanju preiskave smo se odločili uporabiti le začetna oligonukleotida, ki prilegata na lokus TH01, saj pri pomoževanju nastanejo amplikoni dolgi le od 55 bp do 85 bp, pri začetnih oligonukleotidih, ki so v komercialnem kompletu "AmpFISTR SGM Plus" pa je razpon njihove dolžine med 160 bp do 200 bp. Pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma za lokus amelogenin ne nastanejo krajši amplikoni, kot pri uporabi komercialnega kompleta "AmpFISTR SGM Plus". V preiskavo smo jih vključili le zato, ker naj bi bili primerni za sočasno pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih izbrali za pomnoževanje miniSTR.

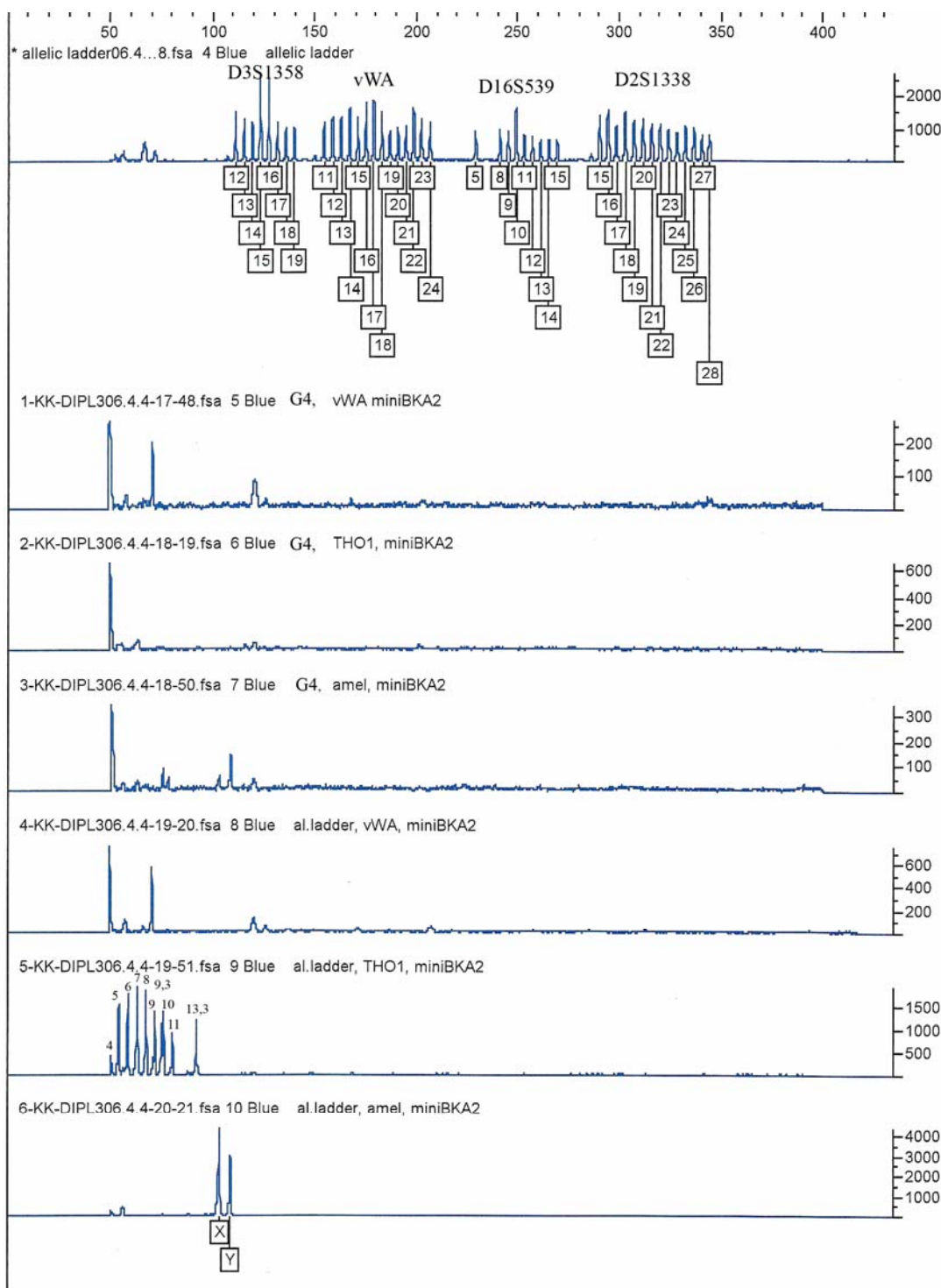
Da bi preverili pravilnost prileganja začetnih oligonukleotidov za lokus TH01 ter kasneje kot pomoč pri določevanju alelov za ta lokus pri vzorcih telogenskih las, smo v pomnoževanje najprej vključili DNA iz vzorca alelne lestvice. Pomnoževanje je teklo pri pogojih PCR mini BKA2.



Slika 4.12: Elektroferogram kontrolne DNA 007 in vzorca alelne lestvice. Prva in tretja vrstica elektroferograma kažeta pomnoževanje kontrolne DNA 007 z začetnima oligonukleotidoma za lokus TH01 pri pogojih mini STR1 in mini BKA2. Sredinska vrstica pa kaže pomnoževanje alelnega vzorca z začetnima oligonukleotidoma za lokus TH01 pri pogojih mini BKA2.

Slika 4.12 kaže uspešnost pomnoževanja DNA iz vzorca alelne lestvice z začetnima oligonukleotidoma za miniSTR v lokusu za TH01, pri pogojih mini BKA2 in pomnoževanje kontrolne DNA 007 pri različnih pogojih (mini STR1 in mini BKA2). Iz elektroferograma je razvidno, da smo pri pogojih mini BKA2 uspešno pomnožili kontrolno DNA 007, saj pomnožena alela (7, 9.3) ustrezata profilu kontrolne DNA za ta lokus. Za določitev alelov smo uporabili našo alelno lestvico, kot je razvidno iz elektroferograma. Iz elektroferograma je razvidno tudi, da pri pogojih mini STR1 pomnoževanje kontrolne DNA 007 ni bilo uspešno.

4.3.4.2 Vzorci

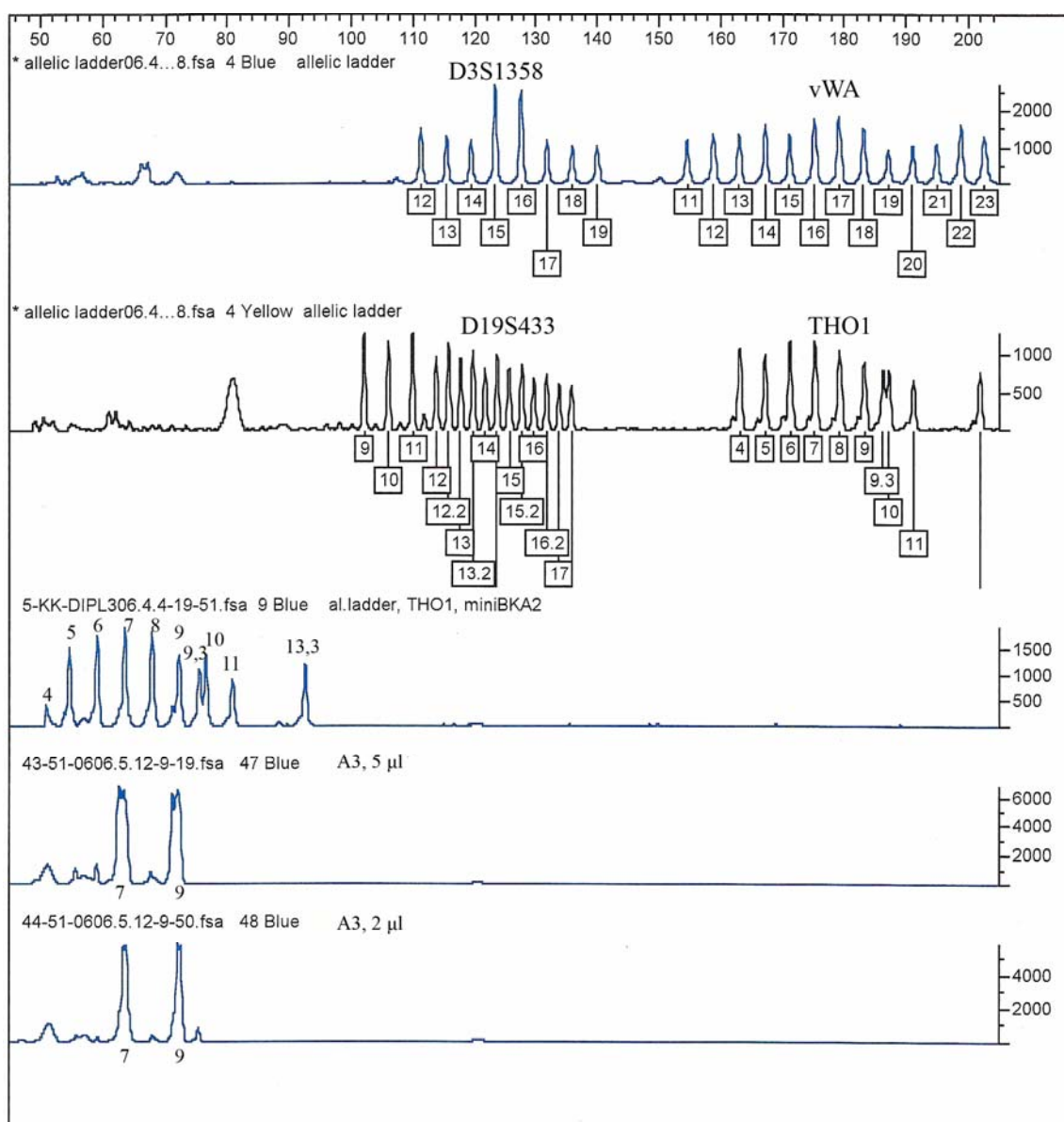


Slika 4.13: Elektroferogram vzorca osebe G in vzorca alelne lestvice. Prve tri vrstice elektroferograma kažejo pomnoževanje DNA osebe G s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov (vWA, THO1 in amelogenin) pri pogojih pomnoževanja mini BKA2, zadnje tri vrstice elektroferograma pa kažejo pomnoževanje DNA vzorca alelne lestvice z istimi tremi pari začetnih oligonukleotidov in pri enakih pogojih pomnoževanja.

Slika 4.13 kaže pomnoževanje DNA osebe G (vzorec G4) s tremi različnimi pari začetnih oligonukleotidov (za vWA, TH01 in amelogenin) pri pogojih mini BKA2. Pomnoževali pa smo tudi DNA iz vzorca alelne lestvice (pri pogojih mini BKA2), prilagojene krajšim amplikonom. Iz elektroferograma je razvidno, da smo DNA iz vzorca alelne lestvice uspešno pomnožili pri uporabi začetnih oligonukleotidov za lokus TH01 in amelogenin. Za posamezni lokus smo alele lahko tudi določili.

Vidimo tudi, da pomnoževanje DNA iz telogenskih las osebe G ni bilo uspešno. Možni sta dve razlagi. Prva je ta, da je prišlo do inhibicije zaradi melanina. Ta sicer ni vidna na kvantitativni PCR, vendar so lahko začetni oligonukleotidi za miniSTR bolj občutljivi nanj. Druga razlaga pa je, da je razgrajena DNA krajša od 80 bp, kolikor so dolgi naši fragmenti PCR, in daljša od 62 bp, kolikor morajo biti dolgi fragmenti pri kvantitativni PCR. Tako je določanje koncentracije pri kvantitativni PCR normalno teklo, pomnoževanje pa ne.

Kljub temu, da smo profil osebe A dobili že s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi za lokuse STR, smo želeli preveriti uspešnost začetnih oligonukleotidov, ki tvorijo krajše amplikone. Zato smo z začetnima oligonukleotidoma za lokus TH01, s katerim smo dobili pozitivne rezultate, pomnožili tudi vzorčno DNA osebe A (vzorec A3).



Slika 4.14: Elektroferogram vzorca alelne lestvice in vzorca A3. Prva vrstica elektroferograma kaže pomnoževanje DNA vzorca alelne lestvice z začetnima oligonukleotidoma za lokus THO1 pri pogojih pomnoževanja mini BKA2, druga in tretja vrstica elektroferograma pa prikazujeta pomnoževanje vzorca A3 z začetnima oligonukleotidoma za lokus THO1 pri pogojih pomnoževanja mini BKA2 pri čemer smo dodali različni koncentraciji DNA (1,96 ng/µl in 0,784 ng/µl).

Slika 4.14 kaže pomnoževanje DNA iz vzorca alelne lestvice, prilagojene krajšim amplikonom za lokus THO1 (pri pogojih mini BKA2) in pomnoževanje DNA osebe A (vzorec A3) z začetnima oligonukleotidoma za lokus THO1 (pri pogojih mini BKA2). V reakcijsko mešanico za PCR smo dodali različni koncentraciji DNA osebe A, v prvem primeru 1,96 ng/µl, v drugem pa 0,784 ng/µl. Iz slike je razvidno, da je prišlo do

pomnoževanja DNA pri obeh koncentracijah. Glede na dane rezultate lahko trdimo, da sta bila naša začetna oligonukleotida, ki smo ju prilagodili krajšim amplikonom, uspešna.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V preteklosti so kot ustrezni vzorci las za tipizacijo veljali le lasje z adherentinimi celicami (torej tisti, pri katerih so prisotne epitelne celice – to so lasje v anagenski fazi). Namreč pri vzorcih las, kjer epitelnih celic ni bilo več, je bil uspeh tipiziranja zelo slab. Problem pa je, ker na kraju zločina večinoma najdemo prav lase oz. dlake v telogenski fazi (to pomeni brez adherentnih celic). Jedrna DNA se v takih vzorcih razgradi na fragmente dolge približno 100 bp (Hellman in sod., 2001).

V zadnjih letih je postala tipizacija DNA lokusov STR eno izmed najboljših orodij v forenzičnih preiskavah. Tudi zelo majhne količine DNA, pridobljene iz različnih vzorcev, so lahko ustrezne za profiliranje DNA. To tehnologijo so forenzični znanstveniki začeli uporabljati tudi na vzorcih las. Razvili so začetne oligonukleotide, ki tvorijo produkte PCR (amplikone), krajše od 110 bp. Rezultati študij so pokazali, da se je učinkovitost tipiziranja s skrajšanjem dolžine ampikonov STR povečala (Hellman in sod., 2001).

Primerna strategija za skrajšanje dolžine ampikonov je skrajšanje dolžine bočnih (angl. flanking) regij, kar dosežemo tako, da izberemo začetne oligonukleotide, ki se bodo vezali bližje tandemskih ponovitev (Butler in sod., 2003; Hellman in sod., 2001).

Za uspešno tipizacijo DNA iz telogenskih las pa je potrebna tudi modifikacija klasičnih ekstrakcijskih postopkov, in sicer ekstrakcijske postopke je potrebno prilagoditi delu s telogenskimi lasmi. Za lase v telogenski fazi je namreč značilno, da je prisotna DNA v zelo nizkih količinah, poleg tega pa tudi močno razgrajena.

V prvem delu naše raziskovalne naloge smo ugotavljali ali bo nova metoda izolacije omogočala večji izkoristek pri izolaciji DNA iz keratiniziranih celic v laseh iz telogenske

faze. Ugotovili smo, da so ključni koraki, pomembni za večji izkoristek pri izolaciji DNA, naslednji:

1. spiranje oz. umivanje las s sterilno destilirano vodo in alkoholom,
2. razgradnja las v raztopini BKA,
3. inkubacija pri 56 °C v proteinazi K,
4. ekstrakcija s fenol-kloroform-izoamil alkoholom,
5. koncentriranje in odstranjevanje soli z ultrafiltracijo (uporaba mikrocentrikonke YM-30).

Spiranje las je zelo pomembno, ker odstrani morebitno prisotne fragmente tuje, torej kontaminante DNA, odstranimo pa tudi druge nečistoče. Pri izolaciji DNA iz telogenskih las smo uporabili tri različne raztopine (BKA, razgradno, in razgradno raztopino z dodanim CaCl_2); najbolj primerna je bila raztopina BKA. Za učinkovito razgradnjo keratinskega skeleta so potrebni proteinaza K, DTT in kalcijevi ioni. DTT razbije disulfidne vezi med peptidnimi zaporedji, proteinaza K, ki za svojo aktivnost potrebuje kalcijeve ione, pa cepi peptidne vezi. Lasje so se z uporabo raztopine BKA v celoti razgradili, medtem ko so bili pri drugih dveh raztopinah po inkubaciji še vedno vidni delci las. Organsko ekstrakcijo smo uporabili zato, ker omogoča odstranjevanje inhibitorjev PCR (metoda Chelex sicer odstrani polivalentne kovinske ione, ki so inhibitorji PCR, vendar pa ne odstrani ostalih inhibitorjev PCR, npr. melanin). Ultrafiltracija in s tem uporaba mikrocentrikonk pa je potrebna zato, ker omogoča koncentriranje in odstranjevanje soli očiščene ekstrahirane DNA. Soli so namreč pogosto prisotne v razgradnih/lizirajočih raztopinah in pospešujejo obarjanje oz. "salting out" proteinov med organsko ekstrakcijo ("salting out" je metoda ločevanja proteinov, ki temelji na principu, da so proteini slabše topni pri visokih koncentracijah soli) (Miller in sod., 1988). Poleg tega so prisotne soli inhibitorji PCR. Natrijevi ioni namreč vplivajo na temperaturo taljenja dvoverižne DNA in posledično spremenijo optimalne pogoje za PCR (McNevin in sod., 2005a). Pri tem smo uporabili mikrocentrikonke YM-30, ki prepuščajo RNA/DNA dolžine 60 nukleotidov (enoverižna) oz. 50 nukleotidov (dvoverižna). Uporaba mikrocentrikonke tipa YM-30 je bila smiselna, ker je šlo za izolacijo degradirane DNA, katere dolžina je krajša od 100 nukleotidov.

Drugi del našega raziskovalnega dela pa je zajemal določitev "novih" začetnih oligonukleotidov za lokuse FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin. Ti začetni oligonukleotidi se razlikujejo od klasičnih začetnih oligonukleotidov v tem, da se vežejo bližje variabilnemu delu lokusov STR in tako tvorijo amplikone krajše od 110 bp. Začetne oligonukleotide smo najprej testirali na kontrolni DNA 007, nato pa tudi na vzorčnih DNA (G4, A3).

Preden smo se lotili pomnoževanja vzorčnih DNA z "novimi" začetnimi oligonukleotidi, smo vzorčne DNA skušali pomnožiti s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi. Navkljub pričakovanjem, da vzorčnih DNA iz telogenskih las s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi ne bomo uspeli pomnožiti, smo pri nekaterih vzorcih dobili celotni profil STR (A3, A4, A15, A19, A24, A25, B4, C2, D4, H5), pri nekaterih delnega (A10, A17, A21), pri vzorcih A7, A16, A23, E1, E3, E5, E7, E8, E10, F3, G4 pa profila STR nismo dobili. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je uspeh pomnoževanja s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi in s tem pridobitev ustreznega profila STR odvisen od vsakega posameznika, torej od donorja las. To lahko pojasnimo z okoljskim vplivom na lase donorja pred njihovo odstranitvijo, npr. umivanje las brez dvoma zmanjša prevlado eksogene DNA na površini lasu, prav tako tudi barvanje las. To je tudi v skladu s teorijo, da je DNA v lasu eksogena (ne endogena). Če bi DNA pridobili iz jedra celic, ki so ujete v keratiniziranih celicah, potem bi pričakovali enake količine DNA iz las različnih donorjev. Eksogena DNA pa je bolj občutljiva za okoljske vplive, kar vodi k večjim variacijam med donorji (McNevin in sod., 2005b). Poleg tega pa iz dobljenih rezultatov lahko tudi sklepamo, da je količina DNA, ki jo lahko izoliramo iz posameznikovega lasu, in posledično tudi tipizacija DNA iz telogenskega lasu, odvisna tudi od genetske predispozicije. Namreč pri osebah A, B, C in D, ki so med seboj sorodstveno povezane, je bila količina izolirane DNA precej višja kot pri ostalih nesorodnih osebah. Pri teh osebah nam je uspelo tudi določiti celotni profil STR. Od drugih oseb smo navkljub nižji koncentraciji DNA uspeli določiti profil STR pri osebi H, ki smo jo v preiskus vključili namerno, saj smo že s predhodnimi preiskavami ugotovili, da je oseba dober donor DNA, izolirane iz bioloških sledi v prstnih sledih (podatki niso prikazani). Medtem pa druge štiri osebe niso, kar dodatno kaže na morebitni vpliv genetske predispozicije pri posameznikih.

Nove pare začetnih oligonukleotidov (za lokuse FGA, vWA, TH01, D3S1358, amelogenin) smo najprej testirali na kontrolni DNA 007, pri čemer smo tudi ugotavljali kakšni so optimalni pogoji pomnoževanja. V ta namen smo preizkusili več različic pomnoževanja (mini BKA 1, mini BKA 2, mini STR1), ki so se razlikovale v času prileganja in podaljševanja ter v spremembi temperature prileganja. Najbolj ustrezna je bila različica mini BKA 2; s temi pogoji smo pomnožili kontrolno DNA in jo nato tudi tipizirali (dobili smo celotni profil za dva lokusa). Pri tem je pomembno poudariti, da smo pri vseh treh različicah pomnoževanja DNA pomnožili v 34 ciklih; v različnih člankih so namreč poročali o uspehu pomnoževanja v 34 ciklih (Hellman in sod., 2001; McNevin in sod., 2005a). Na sliki 4.12 vidimo primerjavo pomnoževanja kontrolne DNA 007 pri pogojih mini STR1 in mini BKA2, pri čemer lahko zaključimo, da so pogoji pomnoževanja mini BKA 2 ustrežnejši. Pomnoževanje kontrolne DNA 007 je bilo uspešno z začetnimi oligonukleotidi za lokusa TH01 in amelogenin (slika 4.9). Za lokus TH01 smo nato pomnožili DNA iz vzorca alelne lestvice, prilagojene krajšim amplikonom (s pomočjo alelne lestvice smo lahko določili ustrezne alele).

Nove začetne oligonukleotide smo nato testirali še na dveh vzorcih, in sicer G4 (začetne oligonukleotide za lokuse vWA, TH01 in amelogenin) in A3 (začetna oligonukleotida za lokus TH01). Hkrati smo pomnoževali tudi DNA iz vzorca alelne lestvice, prilagojene krajšim amplikonom (slika 4.11).

Pomnoževanje DNA iz telogenskih las osebe G ni bilo uspešno. Tu sta možni dve razlagi. Prva je ta, da je prišlo do inhibicije zaradi melanina in pomnoževanje ni poteklo. Inhibicija sicer ni vidna v kvantitativni PCR, vendar so lahko začetni oligonukleotidi za miniSTR bolj občutljivi nanj. Druga razlaga pa je, da je razgrajena DNA krajša od 80 bp, kolikor so dolgi naši fragmenti PCR, in daljša od 62 bp, kolikor morajo biti dolgi fragmenti pri kvantitativni PCR. Tako je določanje koncentracije pri kvantitativni PCR normalno teklo, pomnoževanje z našimi začetnimi oligonukleotidi pa ne. Pri vzorcu A3 pa je bilo pomnoževanje uspešno z začetnima oligonukleotidoma za lokus TH01 (slika 4.14) v obeh različicah reakcijskih mešanic, ki smo ju pripravili (v prvo smo dodali DNA s koncentracijo 1,96 ng/μl, v drugo pa 0,784 ng/μl).

Lahko torej trdimo, da smo pripravili ustrezne začetne oligonukleotide, ki tvorijo amplikone krajše od 100 bp. Najbolj uspešna sta bila začetna oligonukleotida za lokus TH01.

Z raziskovalno nalogo smo potrdili obe predpostavki. Nova metoda izolacije je omogočila večji izkoristek pri izolaciji DNA iz keratiniziranih celic las v telogenski fazi. Izmed izbranih novih začetnih oligonukleotidov, ki smo jih pripravili tako, da so tvorili produkte PCR, krajše od 100 bp, pa smo uspešno določili profil STR lasem v telogenski fazi v lokusu TH01 in v amelogeninskem lokusu.

V nadaljnjih raziskavah bo potrebno testirati še nove začetne oligonukleotide za iste lokuse, saj določitev profila STR le za en sam lokus ne omogoča identifikacije sledi.

5.2 SKLEPI

Na podlagi raziskovalnega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- Uspeh pomnoževanja s klasičnimi začetnimi oligonukleotidi in s tem pridobitev ustreznega profila STR je odvisen od vsakega posameznika, torej od donorja las.
- Količina DNA, ki jo lahko izoliramo iz posameznikovega lasu in posledično tudi tipizacija DNA iz telogenskega lasu, je odvisna tudi od genetske predispozicije posameznika.
- Za uspešno tipizacijo DNA iz telogenskih las je potrebna kombinacija novih začetnih oligonukleotidov in učinkovitih ekstrakcijskih postopkov (modifikacija klasičnih ekstrakcijskih postopkov).
- Glavni koraki v postopku ekstrakcije, ki so pomembni za uspešno ekstrakcijo DNA iz telogenskih las so: umivanje las s sterilno destilirano vodo in alkoholom, razgradnja las v raztopini BKA, inkubacija v proteinazi K, organska ekstrakcija in ultrafiltracija z mikrocentrikonko YM-30.
- Za pomnoževanje ekstrahirane DNA iz telogenskih las je optimalnih 34 ciklov.
- Med testiranimi pari začetnih oligonukleotidov sta bila najbolj uspešna začetna oligonukleotida za lokus TH01.
- Potrebno bi bilo testirati še druge začetne oligonukleotide za lokuse miniSTR.

6 POVZETEK

Lasje so lahko nosilci genetskega materiala, zato jih lahko uporabimo v forenzičnih preiskavah. Na kraju zločina ponavadi najdemo lase, ki so v telogenski fazi (torej naravno izpadle lase). Problem pri tipizaciji takih las je, da je prisotna DNA v zelo nizkih količinah, poleg tega pa tudi močno fragmentirana.

S pomočjo tipizacije DNA lokusov STR so se forenzični znanstveniki lotili tudi tipizacije DNA iz telogenskih las. Razvili so začetne oligonukleotide, ki tvorijo produkte PCR, krajše od 110 bp. Številne raziskave so pokazale, da naj bi ti začetni oligonukleotidi povečali učinkovitost tipiziranja.

Zato smo v naši raziskovalni nalogi pripravili take začetne oligonukleotide, ki so tvorili krajše produkte PCR, to pa smo naredili tako, da smo začetne oligonukleotide vezali bližje ponovitvam STR. Poleg tega smo tudi spremenili klasične ekstrakcijske postopke in jih prilagodili delu s telogenskimi lasmi.

Spremembe, ki smo jih vpeljali v ekstrakcijske postopke (spiranje las s sterilno destilirano vodo in alkoholom, razgradnja las v raztopini BKA, inkubacija v proteinazi K, organska ekstrakcija, ultrafiltracija z mikrocentrikonko YM-30) so omogočile popolno razgradnjo las in večji izkoristek DNA.

Naročili smo začetne oligonukleotide za lokuse FGA, vWA, TH01, D3S1358 in amelogenin. Najbolj primerna sta bila začetna oligonukleotida za lokus TH01. Poleg tega pa smo ugotovili tudi, da v nekaterih primerih lahko dobimo celotni profil STR z uporabo klasičnih začetnih oligonukleotidov (odvisnost od donorja las).

Z raziskovalno nalogo smo potrdili obe predpostavki. In sicer, nova metoda izolacije omogoči večjo količino uporabne izolirane DNA iz keratiniziranih celic las v telogenski fazi, novi začetni oligonukleotidi pa povečajo učinkovitost tipizacije DNA iz telogenskih las.

7 VIRI

AmpFISTR SGM Plus Kit Amplification. 2004. Perkin-Elmer Applied Biosystems. User's manual. Foster City, The Perkin Elmer Corporation: 20 str.

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. Farmacevtski Vestnik, 55: 215-220.

Butler J. M. 2005. Forensic DNA typing – biology, technology and genetics of STR markers. London, Elsevier Academic Press: 318- 320.

Butler J. M., Shen Y., McCord B. R. 2003. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of Forensic Sciences, 48: 1054-1064.

Capillary electrophoresis. 2006. Wikipedia.

http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis (14. dec. 2006): 7 str.

DNA fingerprinting. 2006. Wikipedia.

http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_fingerprinting (14. dec. 2006): 5 str.

Drobnič K. 2004. Biološke sledi. V: Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika. Maver D. (ur.). Ljubljana, Uradni list Republike Slovenije: 413-460.

Ellis J. A., Sinclair R., Harrap S. B. 2002. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. Expert Reviews in Molecular Medicine: 1-11.

Fourney R. M. 2002. Forensic reality and the practical experience of DNA typing update. Ottawa, National DNA Data Bank, Forensic Laboratory Services: 1-27.

<http://www.isrcl.org/Papers/Fourney.pdf>

- Fowler J. C. S., Burgoyne L. A., Scott A. C., Harding H. W. J. 1988. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation – A concise review relevant to forensic biology. *Journal of Forensic Sciences*, 33: 1111-1126.
- Gilbert M. T. P., Menez L., Janaway R.C., Tobin D. J., Cooper A., Wilson A. S. 2005. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Science International*, 156: 208-212.
- Gill P. 2001. Biological evidence (including hair). V: *Proceedings of the 13th INTERPOL Forensic Science Symposium*, Lyon, France, Oktober 16-19, 2001. Lyon, INTERPOL: 1-18.
- Ginzinger D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- Goldstein D. B., Schlotterer C. (eds.). 2003. *Microsatellites: evolution and application*. New York, Oxford University Press: 352 str.
- Harding H., Rogers G. 1999. Physiology and growth of human hair. V: *Forensic examination of hair*. Robertson J. (ed.). London, Taylor and Francis Forensic Science Series: 1-77.
- Hellman A., Rohleder U., Schmitter H., Wittig M. 2001. STR typing of human hairs – a new approach. *International Journal of Legal Medicine*, 114: 269-273.
- Higuchi R., Blake E. T. 1989. Applications of the polymerase chain reaction in forensic science. V: *Banbury Report 32: Technology and Forensic Science*. Ballantyne J. Sensabaugh G., Witkowski J. (eds.). New York, Coldspring Harbor Laboratory Press : 265-281.

- Jeffreys A. J., Pena S. D. J. 1993. Brief introduction to human DNA fingerprinting. V: DNA fingerprinting: State of science. Pena S. D. J., Chakraborty R., Eppelen J. T., Jeffreys A. J. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag : 1-20.
- Majdič J. 2004. Preiskave las. V: Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika. Maver D. (ur.). Ljubljana, Uradni list Republike Slovenije: 477-486.
- McNevin D., Wilson-Wilde L., Robertson J., Kyd J., Lennard C. 2005. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinized hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Science International*, 153: 237–246.
- McNevin D., Wilson-Wilde L., Robertson J., Kyd J., Lennard C. 2005. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinized hair. Part 2. An optimized genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles. *Forensic Science International*, 153: 247–259.
- Microcon YM-30 centrifugal filter unit. 2002. Millipore Amicon. User's manual. Billerica, Millipore Corporation: 20 str.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky F. H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215-1215.
- Millipore Catalogue - 42410 Microcon YM-30 30kDa 100/Pk. 2006. Billerica, Millipore Corporation.
<http://www.millipore.com/catalogue.nsf/docs/42410> (3. okt. 2006): 1 str.
- Olaisen B., Bär W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W. R., Rand S. 1998. DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics. *Vox Sanguinis*, 74: 61-63.

Orfanos C. E. 1979. Haar und Haarkrankheiten. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag: 78-81.

Quantifiler kits. 2005. Perkin-Elmer Applied Biosystems. User's manual. Foster City, The Perkin-Elmer Corporation: 10 str.

Sudbery P. 1998. Human molecular genetics. Harlow, Longman: 311 str.

Tautz D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. V: DNA fingerprinting: State of science. Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T., Jeffreys A. J. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag, 21-28.

Zgradba lasu. 2006. Novo mesto, Krka, d. d.

<http://www.ezdravje.com/si/lasje/zgradba/> (13. avg. 2006): 4 str.

Zviak C., Dawber R. P. R. 1986. Hair structure, function and physicochemical properties. V: The science of hair care. Zviak C. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc.: 1-44.

ZAHVALA

Največja zahvala gre mentorici prof. dr. Katji Drobnič za vso pomoč in potrpežljivost pri laboratorijskem delu, strokovne nasvete in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge ter za izredno natančen in temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala tudi recenzentki doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja za natančno recenzijo diplomske naloge.

Hvala Roku, ki mi je vedno stal ob strani, me podpiral in bodril v najšibkejših trenutkih.

Hvala tudi staršem, bratu in vsem prijateljem za vse vzpodbudne besede in podporo tekom celotnega študija.

Priloga A: Preglednica 4.4: Uspeh profiliranja STR glede na postopek izolacije DNA iz telogenskih las

[illegible]