

Kwasy nukleinowe zrewolucjonizowały kryminalistykę, genetyka molekularna jest jej niezbędnym narzędziem.

> JOANNA STOJAK

KAŻDY CZŁOWIEK w każdej chwili i w każdym miejscu zostawia dziesiątki mikrośladów, w tym DNA. W biologii kryminalistycznej mówią one więcej niż dowód osobisty i metryka urodzenia. Na dodatek czasami są trudne do usunięcia. Na przykład, gdy krew zostanie zmyta zimną wodą, nadal można wykryć hemoglobinę, a kiedy gorącą – dojdzie do utrwalenia występujących we krwi białek. I co ciekawe, nie wszyscy ludzie „gubią” swój materiał genetyczny w identycznym stopniu.

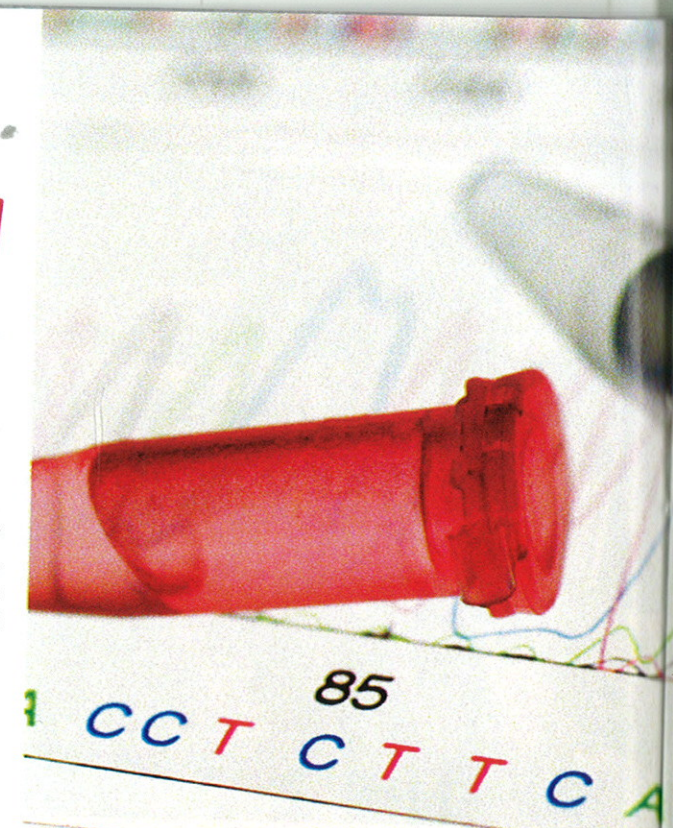
Jednym z pionierów biologii kryminalistycznej był Anglik, prof. Alec Jeffreys z Uniwersytetu w Leicester. Obliczył on, że prawdopodobieństwo wystąpienia u dwóch osób tego samego układu DNA wynosi około 1:30 mld, a tych samych linii papilarnych 1:64 mld. Przy 6,8 mld ludzi żyjących obecnie na świecie jest to zatem przypadek niemal niemożliwy. To właśnie przez analogię do wykazujących specyficzność indywidualną odcisków palców Jeffreys stworzył w 1984 roku termin *DNA fingerprinting*, tłumaczony jako „odcisk DNA” albo „genetyczny odcisk palca”.

Po raz pierwszy włączono DNA do badań kryminalistycznych w Anglii w 1986 roku, kiedy na podstawie próbek spermy zidentyfikowano zabójcę dwóch dziewczynek. Sąd uznał wyniki laboratoryjne za dowód w procesie i tak się zaczęło. Obecnie badania oparte na DNA wykonuje się rutynowo w ponad 40 krajach.

Próbka u kosmetyczki

Po znalezieniu śladu najpierw określa się jego rodzaj i sposób dalszego postępowania, aby nie zniszczyć próbki. Ustala się pochodzenie gatunkowe śladu – badacze muszą mieć pewność, że należy on do człowieka. Dopiero wtedy następuje izolacja DNA oraz sprawdzenie czystości i jakości otrzymanego materiału. Jest to najbardziej istotny etap w całej procedurze – od niego zależy poprawność wyników.

Izolacja DNA składa się z kilku etapów. Pierwszy z nich – homogenizacja – ma na celu rozbicie komórek. Cała ich zawartość, w tym DNA, „wypływa” do roztworu. Dodawane do niego detergenty nie tylko niszczą błony komórkowe, ale i chronią nieosłonięty kwas nukleinowy przed działaniem enzymów nukleolitycznych, które zaraz poicięłyby długie łańcuchy na krótsze fragmenty. Uwolniony kwas nukleinowy należy wyodrębnić z mieszaniny różnych składników komórkowych, m.in. białek i lipidów. Na samym końcu próbka jest oczyszczana z preparatów zastosowanych do usunięcia wymienionych wyżej składników. Ponieważ może być zanieczyszczona obcymi kwasami nukleinowymi, należącymi np. do laboranta, zaleca się stosowanie



NOWO DETE

wanie materiałów jednorazowego użytku oraz rękawiczek. Oznacza się również profile genetyczne wszystkich pracowników.

Celem każdej izolacji DNA jest uzyskanie preparatu o niskim stopniu degradacji. Niestety, kwas deoksyrybonukleinowy ze względu na swoje duże rozmiary łatwo ulega fragmentacji, nawet pod wpływem intensywnego pipetowania. Dlatego w praktyce najczęściej otrzymuje się fragmenty długości około kilkuset tysięcy par zasad. To jednak nie stanowi przeszkody, bo bada się tylko określone regiony genomu.

Coś z niczego

Absolutny zwrot w kryminalistyce dokonał się wraz z opracowaniem metody PCR (ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy) w 1988 roku. Polega ona na tym, że interesujący badacza fragment DNA zostaje wielokrotnie powielony, a uzyskane ilości





2

OCZESNI EKTYWNI

służą później do opracowania tzw. profilu genetycznego. Na dodatek amplifikacja (zwiększenie ilości) DNA metodą PCR trwa zaledwie pół godziny! Reakcja ta bazuje na naturalnym procesie replikacji DNA i umożliwia w warunkach laboratoryjnych szybkie powielanie wybranych odcinków kwasu nukleinowego. Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się dwuniciową cząsteczkę DNA, z której po denaturacji powstają dwie nici matrycowe (na ich podstawie powstaną nowe kopie DNA), deoksyrybonukleotydy dołączane kolejno przez polimerazę DNA do nowo syntetyzowanego łańcucha oraz startery tworzące „miejsca startu” polimerazy.

Dzięki PCR daje się określić profil genetyczny danej osoby nawet wtedy, gdy ilości materiału są śladowe albo kiedy próbka pochodzi ze szczątków (materiał genetyczny zaczął się rozpadać).

Ciekawy jest sposób otrzymania polimeraz. Otóż najczęściej stosuje się polimerazę Taq, która została wy-

izolowana z bakterii *Thermus aquaticus* żyjącej w temperaturze 50–80°C (po raz pierwszy odkryta w gorących źródłach Yellowstone). Z tego powodu enzym doskonale sprawdza się w wysokich temperaturach. Ponieważ „popelnia” on błędy, czasami zostają użyte inne polimerazy wiernie kopiujące matrycę: Pfu (z *Pyrococcus furiosus*) lub Pwo (z *Pyrococcus woesei*). Przedrostek pyro- (łac. ogień) wskazuje, że i te mikroorganizmy „lubią” wyższe temperatury. Polimerazy muszą być termostabilne, bo mieszaninę reakcyjną podgrzewa się do 90°C. W tej temperaturze nowe nici oddzielają się od matrycowego DNA.

Liczba cykli przeprowadzanej reakcji PCR zależy głównie od ilości matrycowego DNA (zazwyczaj jest ich 25–30). Łatwo policzyć, ile otrzyma się nowych kopii kwasu deoksyrybonukleinowego – mianowicie 2ⁿ, gdzie n stanowi liczbę przeprowadzonych cykli.

Cenne powtórzenia

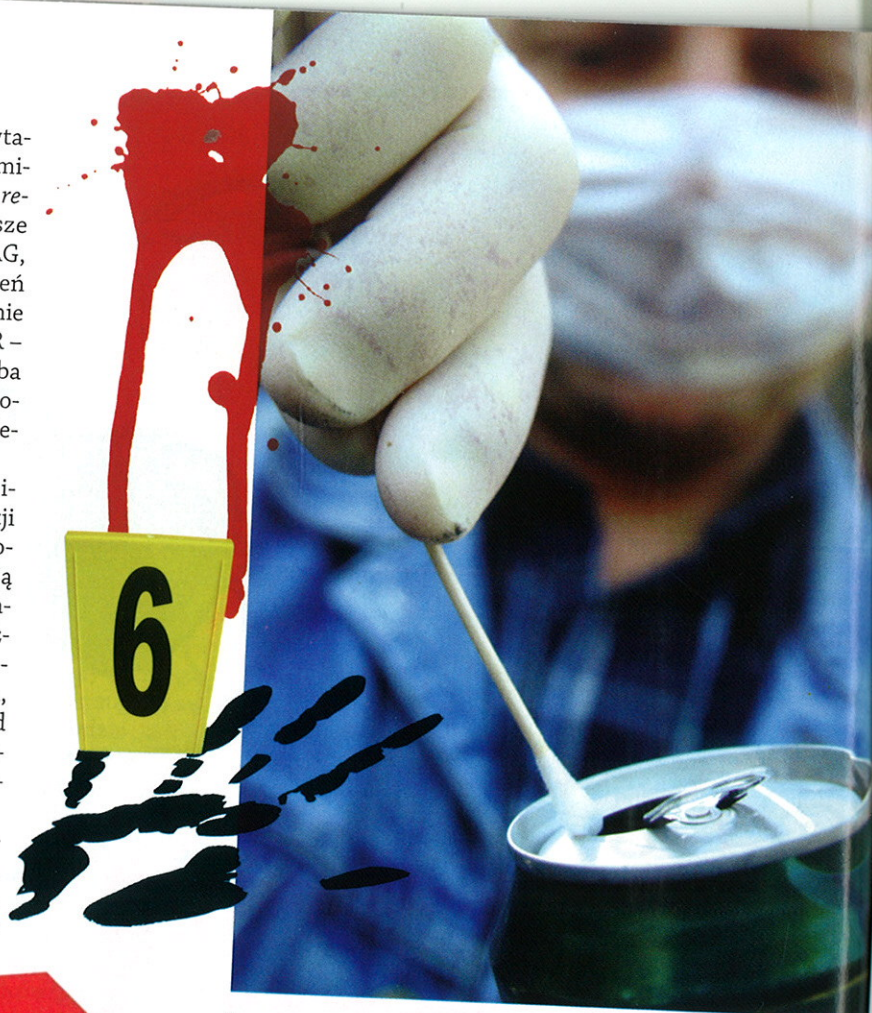
Pomiędzy genami naszego DNA znajdują się odcinki, którego niczego nie kodują. Bardzo często składają się one z wielokrotnych powtórzeń identycznych lub podobnych kopii określonej sekwencji. Jeśli sekwencje te leżą bezpośrednio jedna za drugą, określa się je mianem powtórzeń tandemowych. Takie powtórzenia występują w tzw. DNA satelitarnym, które jest zbudowane z odcinków mających 2–30 par zasad, powtórzonych

5

➤ po kilka tysięcy razy. W zależności od długości powtarzającej się sekwencji wyróżnia się mikrosatelity i minisatelity. Mikrosatelity (STR – ang. *short tandem repeats*; krótkie powtórzenia tandemowe) to krótsze powtórzenia sekwencji 2–6 nukleotydów (np. CAAG, TGA lub CA). Zazwyczaj mają one 10–30 powtórzeń i osiągają długość 100–400 par zasad. Są równomiernie rozproszone w genomie. Z kolei minisatelity (VNTR – ang. *variable number of tandem repeats*; zmienna liczba tandemowych powtórzeń) najczęściej występują w pobliżu końców chromosomów i złożone są z kilkudziesięciu nukleotydów (10–100 par zasad).

Kryminalistyka wykorzystuje powtórzenia minisatelitarne, które stały się podstawą do identyfikacji danego osobnika, albo pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi osobami. A to dzięki temu, że ludzie mają różną długość (na skutek różnej liczby powtórzeń danej sekwencji) mikrosatelitów. Poza jednojajowym bliźniakiem raczej nikt nie będzie miał takiej samej długości jednostek. A krewni wykażą pewne podobieństwa, bo powtarzające się sekwencje są dziedziczone. Skąd takie różnice? Otóż podczas replikacji DNA polimeraza „ślizga się”, dodając lub opuszczając najczęściej pojedyncze powtórzenia.

W naszym genomie wykryto ponad 10^4 mikrosatelitów. Jeśli analizuje się dostatecznie dużą ich liczbę, uzyskuje się unikatowy profil genetyczny człowieka. Ma on postać szeregu prążków, ponieważ fragmenty



KOLOR UJAWNI ZBRODNIARZA

W naszych genach kryją się informacje o tym, jak wyglądamy. Niestety, bardzo trudno je zinterpretować, ponieważ za większość cech odpowiada kilka, kilkanaście, a nawet kilkaset różnych genów. Naukowcy z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie, przy współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim oraz specjalistami z holenderskiego Erasmus Medical Center, znaleźli sposób, by na podstawie badania DNA z bardzo dużym prawdopodobieństwem określić kolor włosów. Metoda opiera się na analizie 13 markerów genetycznych z 11 genów.

Najłatwiejsze jest wykrycie, czy ktoś ma rude włosy – w przypadku populacji naszego kraju to ponad 90-procentowe prawdopodobieństwo powodzenia. Z czarnymi włosami jest już nieco trudniej, a szansa na precyzyjną diagnozę w przypadku włosów brązowych i blond wynosi około 80%. (DL)

kwasy nukleinowych, powielone metodą PCR, rozdzielane są na żelu poliakryloamidowym, przez który przepływa prąd. Krótsze fragmenty przesuwają się szybciej, a nałożony materiał rozsuwa się niczym szczelne drabiny. Rezultat przypomina kod kreskowy.

Powtórzenia minisatelitarne bada się rzadziej niż mikrosatelitarne – zarówno podczas ustalania ojcostwa, jak i indywidualizacji śladów biologicznych. Nie dość, że są mniej dogodnie rozmieszczone w genomie, to jeszcze okazują się zbyt długie dla metody PCR. Za pomocą PCR szybciej i dokładniej oznacza się sekwencje krótsze niż 300 par zasad, a większość alleli minisatelitarnych jest dłuższa.

Ratunek w mitochondriach

Gdy DNA jądrowego jest nadal zbyt mało albo kiedy ulegnie on zbyt dużej degradacji, bierze się pod uwagę kwasy nukleinowe z mitochondriów, czyli organelli będących centrami energetycznymi komórek. DNA mitochondrialne (mtDNA) występuje w większej liczbie kopii niż jądrowe. Dla przykładu, jeden włos z pochwą korzenia zawiera 7 tys. kopii jądrowego DNA i aż tysiąc razy więcej (7 mln) kopii mtDNA. Czasami z próbki można uzyskać tylko mtDNA. Tak jest w przypadku trzonu włosa – 1 cm daje 600 tys. cząsteczek.

Frakcję mitochondrialną oddziela się od jądrowej przez wirowanie preparatu w gradiencie sacharozowym. Preparat nakłada się na górę roztworu preparującego, w tym przypadku sacharozy, której stężenie zwiększa się w kierunku dna próbówki. Wykorzystuje się tutaj fakt, że każda frakcja ma inną gęstość. Cięższe opada-

ją niż niż lepsze. Każda zatrzymuje się na poziomie, gdzie roztwór ma identyczną gęstość pławną.

Analiza mtDNA okazuje się przydatna w badaniu materiałów z ekshumacji lub katastrof. Jeśli chodzi o sprawcę zbrodni, to za jej pomocą udaje się tylko wykluczyć czyjś udział. Niestety, nie można go potwierdzić. Ponieważ mtDNA przekazywane jest wyłącznie w linii żeńskiej, nie nadaje się do ustalania ojcostwa.

Mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy jest przydatny do badań, gdyż są w nim akumulowane liczne mutacje. Pojawiają się one częściej niż w DNA jądrowym ze względu na ograniczone systemy naprawy. Co ciekawe, mitochondria z tej samej komórki (a nawet cząsteczki mtDNA zawarte w pojedynczym organelum) mogą zawierać różną informację genetyczną (zjawisko to nazwano heteroplazmą). Biologia kryminalistyczna wykorzystuje tzw. regiony hiperzmienne HVR1 i HVR2. Są to niekodujące fragmenty genomu mitochondrialnego o wysokim stopniu zróżnicowania u poszczególnych ludzi. Więcej na temat zastosowań analizy mitochondrialnego DNA czytelnik znajdzie w „WiZ” 3/2010.

Dziedzina z przyszłością

Mimo że genetyka molekularna nadal jest uważana za młodą dziedzinę, nie można przejść obojętnie obok jej dokonań. Długoletnie badania nad strukturą kwasu deoksyrybonukleinowego doprowadziły do po-

wstania wielu precyzyjnych metod, umożliwiając tym samym „karierę” tej mikroskopijnej cząsteczki w kryminalistyce.

Dziś biologia kryminalistyczna i genetyka molekularna działają nierozłącznie, a metoda genetycznej identyfikacji człowieka stała się największym osiągnięciem nauk kryminalistycznych od momentu, gdy pod koniec XIX wieku opracowano podstawy identyfikacji daktyloskopowej.

Przestępstwo idealne nie istnieje. Ludzie w każdym miejscu zostawiają dziesiątki mikrośladów. Dzięki technikom PCR (wciąż udoskonalanym) możliwe jest ustalenie sprawcy zbrodni, wskazanie dokładnie jednego człowieka. Z kolei dzięki znajomości profilu genetycznego osobnika śledztwo bazujące na eliminacji osób nieobecnych na miejscu popełnienia przestępstwa zostało zastąpione śledztwem potwierdzającym czyjś udział. Co więcej, nawet jeśli materiał pobrany z miejsca zbrodni wydaje się całkowicie zniszczony, i tak w większości przypadków można dziś określić profil genetyczny, badając m.in. mitochondrialny DNA lub powtórzone sekwencje niekodujące.

Techniki badania DNA są obecnie darzone największym zaufaniem w badaniach kryminalno-sądowych i stosowane pomimo wysokich kosztów. Bo kodu DNA sfałszować nie sposób.

➤ JOANNA STOJAK, studentka biotechnologii UAM w Poznaniu.

SUPERKONKURS DLA SZKÓŁ ROZSTRZYGNIĘTY!

Jury (Dział Promocji wydawnictwa Prószyński Media) spośród nadesłanych do 31 grudnia 2010 roku krótkich ocen przydatności „Świata Nauki” oraz „Wiedzy i Życia” w programie nauczania wybrało trzy najciekawsze.

Laptopa otrzymuje:

1. Zespół Szkół Ponadgimnazjalnych im. Jana Pawła II w Kościelcu

Teleskopy zwierciadlane otrzymują:

2. Szkoła Podstawowa nr 3 w Sandomierzu
3. Zespół Szkół Elektrycznych w Gorzowie Wielkopolskim

Dziękujemy wszystkim szkołom za udział w konkursie i serdecznie gratulujemy zwycięzcom!

