

UGOTAVLJANJE IDENTITETE POSAMEZNIKA Z UPORABO GENETSKIH INFORMACIJ, METODE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN RAČUNALNIŠKO PODPRTE TEHNOLOGIJE

Katja Drobnič

Ministrstvo za notranje zadeve, Policija, Center za forenzične preiskave,
katja.drobnic@policija.si

Prof. dr. Katja Drobnič je doktorirala na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani s področja molekularne genetike - gensko kloniranje in ekspresije gena. V Centru za forenzične raziskave Ministrstva za notranje zadeve se ukvarja genetske preiskave različnih bioloških sledi (sline, krvi, sperme, kosti, zob, epitelnih celic kože) z namenom ugotavljanja identitete osebe. Poleg tega je predavateljica na Fakulteti za varnostne vede in na podiplomskem študiju na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani ter sodelavka na številnih raziskovalnih in aplikativnih projektih.

DETERMINATION OF PERSONAL IDENTITY ON THE BASIS OF GENETIC DATA, PCR METHODOLOGY AND COMPUTER TECHNOLOGY

Katja Drobnič

Ministry of the Interior, Police, Forensic Science Centre, katja.drobnic@policija.si

Professor Katja Drobnič obtained her PhD at the Medicine Faculty, University of Ljubljana, in the field of molecular genetics - gene cloning and gene expression. She is working at the Centre of Forensic Research at the Ministry of internal affairs, primarily in genetic investigation of various biological evidence material (saliva, blood, sperm, bones, teeth, skin epithelia) with the purpose of personal identification. In addition, she is a lecturer at the Faculty of Criminal Justice and Security and at the postgraduate studies at the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, and she is a collaborator at numerous research and applicative projects.

Povzetek

Molekula DNK, tako drobcena, da je prostim očem nevidna, je postala eno najmočnejših orodij v boju proti zločinu. Komaj dvajset let po prvi analizi DNK, imenovani »prstni odtis« DNK, je forenzična tipizacija DNK postala odločilen ključ pri obsodbi ali oprostitvi osumljenca, pri identificiranju žrtev kaznivih dejanj, naravnih ali prometnih nesreč ter pri ugotavljanju sorodstvenih razmerij med ljudmi.

Abstract

DNA molecule invisible by naked eye becomes the most powerful tool in the fight against the crime. Just twenty years after first DNA fingerprinting analysis, forensic DNA typing become a crucial key

to the conviction or exoneration of the suspects, identificaton of victims of crimes, accidents or disasters and determination of relationship.

Uvod

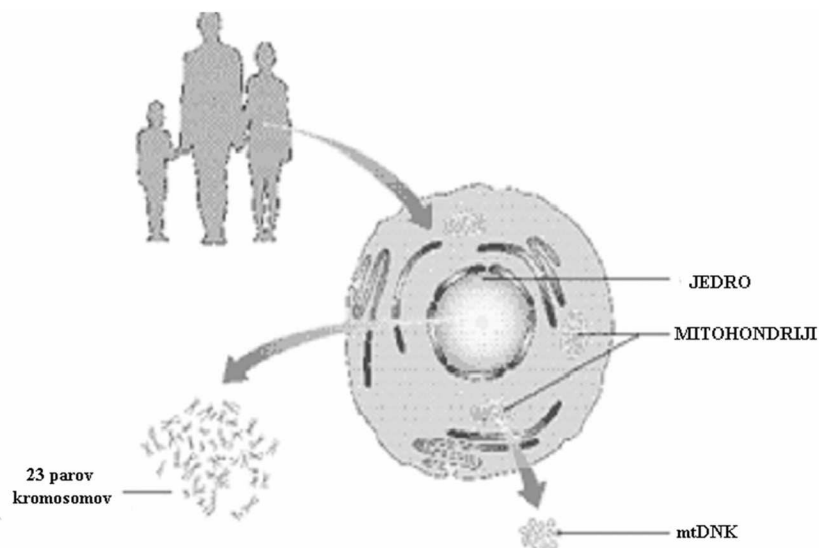
Genetske preiskave ali preiskave DNK (DNK kratica za molekulo deoksiribonukleinske kisline), ki jih uporabljamo pri reševanju pravnih vprašanj, tako kazenskih kot civilnih, imenujemo forenzične genetske preiskave. Pridevnik forenzičen izvira iz latinske besede forum, ki je v rimskem času predstavljal prostor za razpravljanje. To vlogo so danes prevzela sodišča. V preteklosti smo uporabljali izraz sodne preiskave (npr. sodna medicina), ki pa se opušča. Današnji molekularni genetski testi za identifikacijo bioloških sledi in preverjanje sorodstvenih povezav, ki temeljijo na pomnoževanju DNK z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction), se uporabljajo od začetka devetdesetih let prejšnjega stoletja. Forenzični genetski identifikacijski testi temeljijo na preiskovanju nekodogenih področij DNK. Preiskovana področja imenujemo tudi markerji ali označevalci, njihova značilnost je, da so naključno raztreseni po vsem človeškem genomu in se ne izražajo. Kar z drugimi besedami pomeni, da se informacije, shranjene v zaporedju nukleotidov njihove DNK, ne prevedejo v zaporedje aminokislin in s tem tudi ne v beljakovino. To so torej področja, ki niso povezana s fizičnimi značilnostmi posameznika (npr. z barvo oči, nagnjenostjo k boleznim ipd.). Podatki, ki jih pridobimo iz forenzičnih genetskih preiskav, tako nič ne povedo o zunanosti ali boleznih posameznika, temveč so uporabni izključno za ugotavljanje njegove identitete ali sorodstvene povezanosti z drugimi posamezniki. Isti markerji se uporabljajo tudi pri raziskovanju selitve narodov, pri ugotavljanju identitet neznanih posmrtnih ostankov ali razreševanju zgodovinskih vprašanj (npr. potrditev identitete družine Romanov). V zadnjih letih pa se v forenzičnih preiskavah uveljavljajo tudi genetski testi, ki podajajo fenotipsko informacijo o posamezniku (npr. barvo las ali oči).

Za analizo DNK so primerne vse biološke sledi ne glede na vrsto tkiva ali telesne tekočine. Pri forenzičnem genetskem testiranju večinoma uporabljamo komercialne komplete, ki so zelo zanesljivi in omogočajo, da z visoko gotovostjo določimo izvor biološke sledi, ki vsebujejo le nekaj celic. Na uspešnost preiskave seveda vpliva kakovost izolirane DNK, torej ohranjenost biološke sledi v preiskavi. Zaradi zmožnosti ugotovitve identitete osebe, ki je sled pustila na kraju dejanja, sta tako pomen pravilnega zavarovanja bioloških sledov kot tudi standardizacija preiskav DNK, deležna vedno večje pozornosti. Ključnega pomena pa je interpretacija rezultatov genetskih preiskav, saj sledi postajajo vse manjše in manjše, kar ima za posledico različne pojave, ki jih je treba razumeti in ovrednotiti. V pomoč interpretaciji kompleksnim rezultatom se vse uveljavljajo raznovrstni računalniški programi, ki omogočajo večjo objektivnost in hitrejši izračun moči dokaza, brez katerega nekatera sodišča po svetu ne sprejemajo več rezultatov genetskih preiskav.

Biologija

Človeški genom

Človeške celice z jedrom (z izjemo spolnih celic) normalno v jedru vsebujejo 22 parov avtosomalnih kromosomov ter še dva spolna kromosoma (X in Y), v citoplazmi pa do tisoč dihalih organelov, mitohondrijev, vsak od njih pa lahko vsebuje več 10 kopij mitohondrijskega kromosoma (slika 1).



Slika 1: Človeško telo je sestavljeno iz številnih celic.

V jedru telesnih celic je 23 parov kromosomov in v citoplazmi številni mitohondriji, vsebujejo nekaj deset kopij krožne mitohondrijske DNK.

Značilnost jedrnih kromosomov je, da so v paru, pri čemer se en kromosom v paru deduje od matere in drugi od očeta. Bratje in sestre tako podedujejo od istih staršev drugačno kombinacijo kromosomov, zato se tudi razlikujejo drug od drugega. Izjema so enojajčni dvojčki, ki so v bistvu naravne kopije (kloni). Za kromosoma v paru je značilno, da sta nosilca enakih lastnosti (izjema spolna kromosoma) in področij. Značilnost mitohondrijskih kromosomov je, da se dedujejo le po materi. Dedovanje le po enem od staršev je tudi značilnost Y-kromosoma, ki določa moškega in se deduje le po očetu.

Kromosom ne glede na tip v osnovi vsebuje molekulo DNK, ki je sestavljena iz dveh odgovarjajočih si verig nukleotidov, ki se med seboj ovijata v strukturo, imenovano »dvojna vijačnica«.

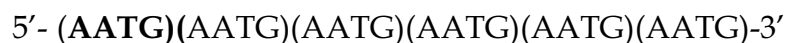
Polimorfizem jedrne DNK

Značilnost človeške jedrne DNK je, da njen velik del (30 %) zavzemajo različna ponavljajoča se zaporedja DNK, ki v večini primerov predstavljajo zelo polimorfna področja (gr. poly – mnogo, morfoma – oblika). V to skupino hipervariabilnih polimorfnih področij sodijo tudi mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve, ki jih označujemo s kratico STR (angl. short tandem repeats). Nahajajo se v nekodogenih regijah DNK, torej se ne prepisujejo v proteine ali ribosome ter so po človeškem genomu raztreseni povsem naključno. Nahajajo se tako na avtosomalnih kot na spolnih kromosomih. Lokusi STR so tista področja, v katerih se posamezniki med seboj najbolj razlikujemo in jih danes običajno preiskujemo pri

forenzičnih genetskih preiskavah jedrne DNK. Lokusi STR so torej označevalci, ki jih danes uporabljamo pri genetskih identifikacijskih testih. Njihova variabilnost znotraj populacije je tako visoka, da s preiskavo 13 lokusov STR lahko z visoko znanstveno gotovostjo med seboj razlikujemo, katero koli osebo, razen enojajčnih dvojčkov.

Značilnost lokusov STR je, da so sestavljeni iz kratkih, tandemsko ponovljenih nukleotidnih zaporedij t. i. osnovnega motiva dolžine od 2 do 7 nukleotidov, ki se ponavljajo v identičnih ali sorodnih kopijah kot vagoni v vlakovni kompoziciji. V forenzičnih preiskavah danes preiskujemo predvsem mikrosatelite s 4 ali 5 nukleotidov dolgim osnovnim motivom, katerih celokupna dolžina večinoma ne presega 450 nukleotidov. Posamezno obliko na določenem lokusu STR imenujemo alel. Za vsak mikrosatelit obstaja v populaciji več različnih alelov. Število in njihova frekvenca se nekoliko razlikujeta od populacije do populacije. Alele označujemo glede na število ponovitev osnovnega motiva.

Primer hipotetičnega lokusa STR z osnovnim motivom dolgim 4 nukleotide (AATG), ki se ponovi 6-krat:



Zgoraj prikazani alel bi označili kot »alel 6«. Polimorfizem lokusov STR torej temelji na variacijah v številu ponovitev osnovnega motiva, posledica pa je visoka variabilnost in veliko število alelov za posamezni lokus STR v populaciji. Posamezniki se med razlikujemo v številu ponovitev osnovnega motiva, torej v dolžini alela. V primeru da preiskujemo lokuse STR na avtosomalnih kromosomih (telesne celice človeka so diploidne), bo imel posameznik za določen lokus STR dve kopiji (eno na kromosomu od matere in drugo na kromosomu, podedovanem od očeta), npr. alel 5 in 6, kar pomeni, da je podedoval od staršev dva različna alela, enega s petimi ponovitvami osnovnega motiva in drugega s šestimi. Oseba je heterozigotna (gr.hetero - drugačen) na tem lokusu STR. Če pa podeduje alela enake dolžine, je oseba za ta lokus STR homozigotna (gr.homo - enako). Rodovniške preiskave so pokazale, da se lokusi STR razporejajo neodvisno iz staršev na potomce, kodominantno naravo alelov in da se ti dedujejo po Mendlovih zakonih dedovanja.

Polimorfizem mitohondrijske DNK (mtDNK)

Mitohondrijski kromosom se od jedrnih razlikuje v več značilnostih. Za razliko od jedrnih kromosomov, ki so linearne oblike, je mtDNK krožna molekula. Njena velikost je le 16.569 nukleotidnih parov, medtem ko je dolžina jedrne DNK v diploidni celici 6 milijard nukleotidnih parov. Druga značilnost mtDNK je, da se pojavlja v vsaki celici od sto do več kot tisoč kopijah, medtem ko je jedrna DNK prisotna le v dveh kopijah. Zaradi tega je veliko večja verjetnost, da se bo v sledi ohranila mtDNK, kot pa da se bo ohranila jedrna DNK. Preiskava mtDNK se v prvi vrsti uporablja v tistih primerih, ko je treba analizirati biološke sledi z nizko količino jedrne DNK, kot so zelo stari vzorci, uničeni človeški posmrtni ostanki, lasje (dlake) brez epitelnih celic. V celici se nahaja v haploidnem stanju in se prenaša iz matere na hčer in tako iz roda v rod. Preiskave analiz mtDNK so tako tudi

primerne za preverjanje sorodstvene povezave med daljnimi sorodniki po materini strani, ki so ločeni drug od drugega nekaj rodov.

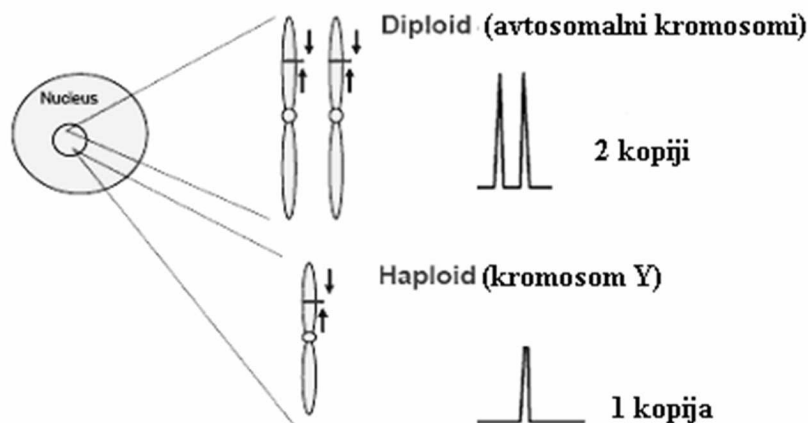
Ker se mtDNK deduje le po materini strani, bi se moral njen zapis ohranjati skozi rodove nespremenjen, vendar pa temu ni čisto tako, saj se mtDNK zaradi visoke stopnje mutacij zelo hitro spreminja. Mutacije privedejo do sprememb nukleotidnega zaporedja in so edini izvor variabilnosti mtDNK, rekombinacije ni kot pri homolognih kromosomih, ki dodatno pripomorejo k raznovrstnosti. Polimorfizem mtDNK tako, za razliko od polimorfizma lokusov STR, temelji na nukleotidnem polimorfizmu (posameznike se razlikujejo v zapisu nukleotidnih parov na določenem mestu). V forenzičnih genetskih preiskavah se po navadi preiskuje polimorfizem nekodogene kontrolne regije, ki jo predstavljata dve hipervariabilni področiji, imenovani HVI in HVII, za kateri je značilna visoka variabilnost nukleotidnega zaporedja. Posamezniki kavkaških populacij se razlikujejo drug od drugega v poprečju na 8 nukleotidnih mestih, medtem ko se Afričani kar na 14 mestih. Kot referenčno oz. primerjalno mtDNK predstavlja prvo objavljeno nukleotidno zaporedje mtDNK iz leta 1981. Z novejšo tehnologijo so v objavljenem zaporedju sicer našli napako, vendar se kot referenčno še vedno šteje originalno objavljeno zaporedje.

Polimorfizem spolnih kromosomov

Spolna kromosoma, X in Y, izvirata iz nekaj 100 milijonov let starega skupnega avtosomalnega kromosoma. Sledil je ločen razvoj in danes imata spolna kromosoma enaki le kratki zaporedji, ki se nahajata na skrajnih koncih. Kromosom X je prisoten pri obeh spolih, pri ženskah v dveh kopijah (XX), pri moškem v eni, medtem ko je kromosom Y normalno prisoten le pri moških v eni kopiji, kar pomeni, da ima moški en X- in en Y-kromosom.

Za dokazovanje spola osebe, od katere izvira biološka sled, po navadi preiskujemo amelogeninski gen, ki leži na obeh spolnih kromosomih. Produkt amelogeninskega gena je beljakovina amelogenin, ki sodeluje pri razvoju skleninskega matriksa zobne pulpe pri sesalcih. Področje, ki ga danes preiskujemo, leži v intronu 1, nekodogeni del gena. V času evolucije je amelogeninski gen na kromosomu X v tem predelu izgubil 6 nukleotidnih parov, zaradi česar je postal krajši kot njegov homolog na kromosomu Y.

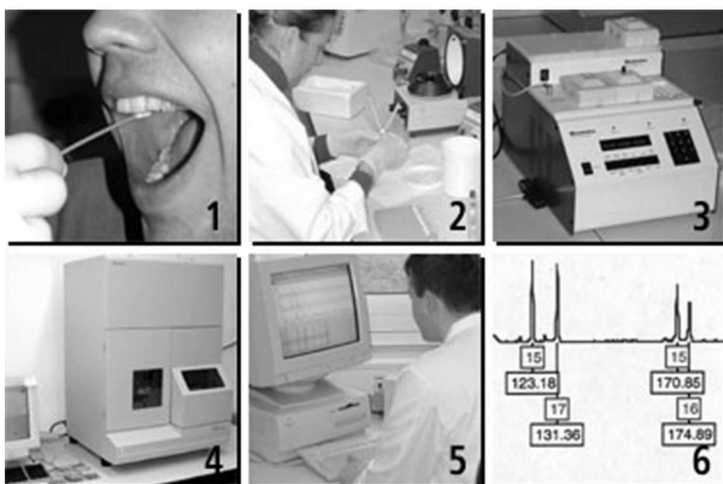
Druga skupina polimorfizmov na spolnih kromosomih, ki igra pomembno vlogo pri forenzičnih genetskih preiskavah, pa so zopet lokusi STR. Zaradi izrednega pomena in obsežnosti problematike bom tu le na kratko predstavila pomen lokusov STR na kromosomu Y (lokusi Y-STR). Ker se kromosom Y prenaša po moški veji z očeta na sina, je primerno orodje pri preverjanju spornih očetovstev, ko je oče pokojni ali pri raziskovanju zgodovinsko pomembnih dejstev. Rezultat preiskave lokusov Y-STR je, za razliko od rezultatov avtosomalnih lokusov STR (diploidno število v telesnih celicah), vedno le en alel, saj se kromosom Y nahaja v celici v haploidnem stanju (slika 2). Analize lokusov Y-STR so zelo pomembno orodje, ko imamo v preiskavi mešane biološke sledi, ki izvirajo od več oseb, še zlasti v primerih posilstev, ko je bilo posiljevalcev več, ali ko je ženske DNK v sledi veliko več kot moške, saj zaradi prevlade ženske DNK, moškega profila STR ni možno zaznati.



Slika 2: Prikaz haploidnega in diploidnega stanja različnih kromosomov in s tem tudi lokusov STR v telesni celici. Črta na kromosomih (dodatno jo še označujejo puščice) označuje lokus STR. Avtosomalna kromosoma sta v telesnih celicah v paru, zato je isti lokus STR v dveh kopijah. Če sta lokusa STR različno dolga, pri analizi vidimo dva vrhova/pika (pik predstavlja en alel), medtem ko je kromosom Y v celici normalno v haploidnem stanju, zato pri analizi vidimo le en pik (en alel).

Tehnologija

Postopek genetske tipizacije, ki temelji na metodi PCR in analizi lokusov STR, imenujemo profiliranje DNK ali kar profiliranje STR. Skupni rezultat preiskave več lokusov STR, ki praviloma ležijo na različnih kromosomih, je profil STR, rezultat preiskave enega lokusa pa fenotip. Velikokrat se uporablja tudi izraz genotip, ki ni povsem pravilen, saj pri profiliranju STR gledamo fenotip (dolžino) in ne nukleotidnega zaporedja, kar pomeni genotip. Rezultat profiliranja več lokusov Y-STR, pa zaradi haploidnega stanja kromosoma Y v celici in medsebojne povezanosti posameznih lokusov STR, saj vsi ležijo na enem samem kromosomu, imenujemo haplotip Y-STR. Z istim imenom, haplotip mtDNK, poimenujemo rezultate preiskav polimorfizma mtDNK, vendar pa sta izvora polimorfizmov obeh haplotipov povsem različna, kot je že bilo opisano v prejšnjem poglavju. Preiskave polimorfizma mtDNK temeljijo na določevanju nukleotidnega zaporedja hipervariabilnih regij na mtDNK, tako da je rezultat podan v bazah (A,G,T,C), medtem ko se lokusi STR razlikujejo v dolžini. Postopek od izolacije DNK do določevanja profila DNK je shematsko prikazan na sliki 3.



Slika 3: Shematski prikaz postopka profiliranja STR.

1) odvzem biološkega vzorca; 2) izolacija DNK iz biološkega vzorca; 3) pomnoževanje specifičnih odsekov DNK v napravi PCR; 4) ločevanje pomnoženih produktov PCR s kapilarno elektroforezo v avtomatskem genetskem analizatorju; 5) pregled elektroferogramov posameznega vzorca; 6) določitev profila STR na dveh lokusih STR.

Izolacija in določanje koncentracije DNK

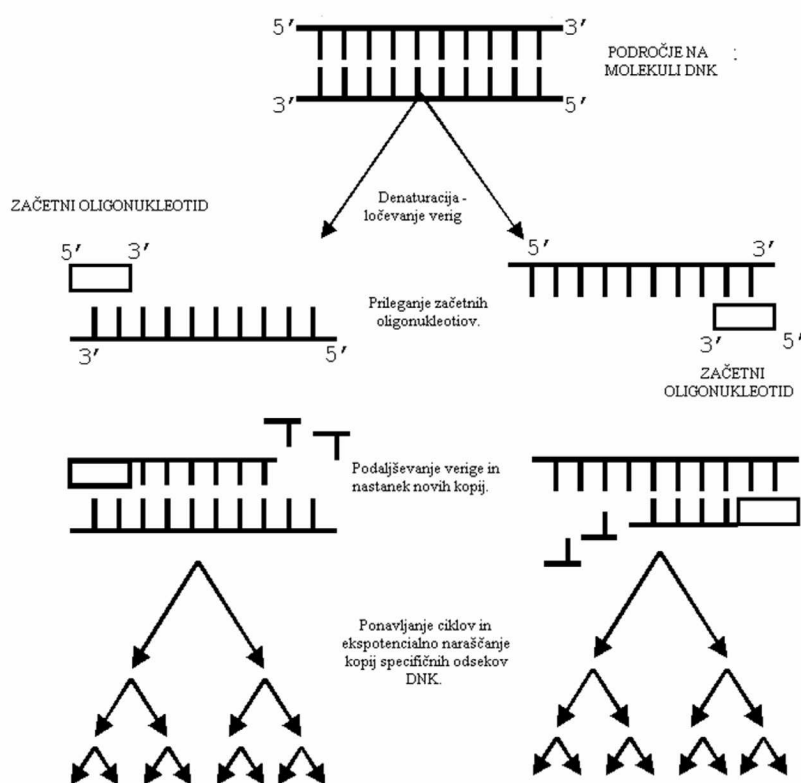
DNK lahko uspešno izoliramo iz različnih bioloških sledi – krvi, sperme, lasu dlake, sline, urina ali bruhanja, tkiva, kosti, zob. Metode izolacije DNK se ločijo glede na vrsto biološke sledi, podlage, na kateri se nahaja, in njene ohranjenosti. DNK se v celici ne nahaja v čisti obliki, ampak je združena s številnimi drugimi molekulami, kot so npr. proteini. Prvi korak pri izolaciji DNK je razbijanje celične membrane, pri tem se iz celice izloči DNK ter hkrati z njo še ogljikovi hidrati, proteini in maščobe. V raztopini se lahko nahajajo tudi substance s podlage, na kateri je bila biološka sled. Nekatere substance motijo nadaljnje postopke pri preiskavi DNK, zato je velikokrat treba DNK očistiti primesi. Izolacijo DNK po navadi zaključimo s koncentriranjem DNK, saj je volumen DNK, ki ga lahko dodamo v PCR-reakcijo, omejen, koncentracija DNK pa velikokrat prenizka. Izolirani DNK pred nadaljnjimi koraki določimo koncentracijo. Kajti nepravilen vnos količine DNK v PCR-reakcijo lahko privede do nastanka artefaktov pri profiliranju DNK ali neuspeha pri profiliranju DNK zaradi prenizke količine DNK v reakcijski PCR-raztopini.

Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Metoda verižne reakcije s polimerazo ali metoda PCR je oblika *in vitro* pomnoževanja specifičnih odsekov DNK. Leta 1983 jo je odkril Karl Mullis, za kar je deset let pozneje prejel tudi Nobelovo nagrado. Metoda je temeljito spremenila in poenostavila izvajanje forenzičnih genetskih preiskav, saj omogoča, da pridobimo v zelo kratkem času (treh urah) ogromno število kopij točno določenega področja DNK, zaradi česar se je količina DNK, ki jo potrebujemo za preiskavo, zmanjšala na nekaj deset celic.

Metoda PCR je hitra, natančna in preprosta metoda, ki temelji na prileganju in podaljševanju dveh začetnih oligonukleotidov, ki omejujeta področje DNK, ki ga želimo pomnožiti (slika 4). Po denaturaciji DNK, ki jo dosežemo s segrevanjem na 95°C, sledi ohlajanje na specifično T, pri kateri pride do hibridizacije – prileganja vsakega začetnega oligonukleotida z eno od ločenih verig DNK in temperaturno obstojna DNK polimeraza (Taq polimeraza) v smeri 5' proti 3' podaljša posamezno verigo. Denaturacija, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige predstavljajo en sam cikel v reakciji verižne polimerizacije. Ponavljanje teh ciklov ima za posledico eksponentno povečanje količine zelenega odseka DNK. Če reakcijo izvedemo z n cikli, bomo po koncu zabeležili 2^n pomnoženih kopij odseka DNK med dvema začetnima oligonukleotidnima. Za detekcijo pomnoženih fragmentov danes uporabljamo fluorescentna barvila, tako da na en začetni oligonukleotid vežemo molekulo barvila.

Za pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo potrebujemo tarčno DNK (DNK izolirana iz biološke sledi ali osebe), oligonukleotidne začetnike, mešanico vseh štirih deoksiribonucleotid trifofatov (dNTP – dATP, dGTP, dCTP in dTTP) in termostabilno Taq polimerazo v ustrezni reakcijski raztopini. Reakcija poteka v posebnih cikličnih termostatih (naprava za PCR), ki jih lahko programiramo, da izvedejo ustrezno število ciklov pri ustreznih temperaturah.



Slika 4: Pomnoževanja specifičnih odsekov DNK z metodo PCR.

V vsakem ciklu je se število kopij poveča za 2^n . Torej v drugem ciklu dobimo 2 kopiji, v tretjem 4, četrtem 8, petem 64 itd

Preglednica 1: Reakcija PCR je sestavljena iz treh stopenj.

Stopnja	Proces	Temperatura	Trajanje
I.	začetna denaturacija	95 °C	11 min
II.	denaturacija	94 C	1 min
	prileganje	59 °C	1 min
	podaljševanje	72 °C	1 min
III.	zaključno podaljševanje	60 °C	45 min

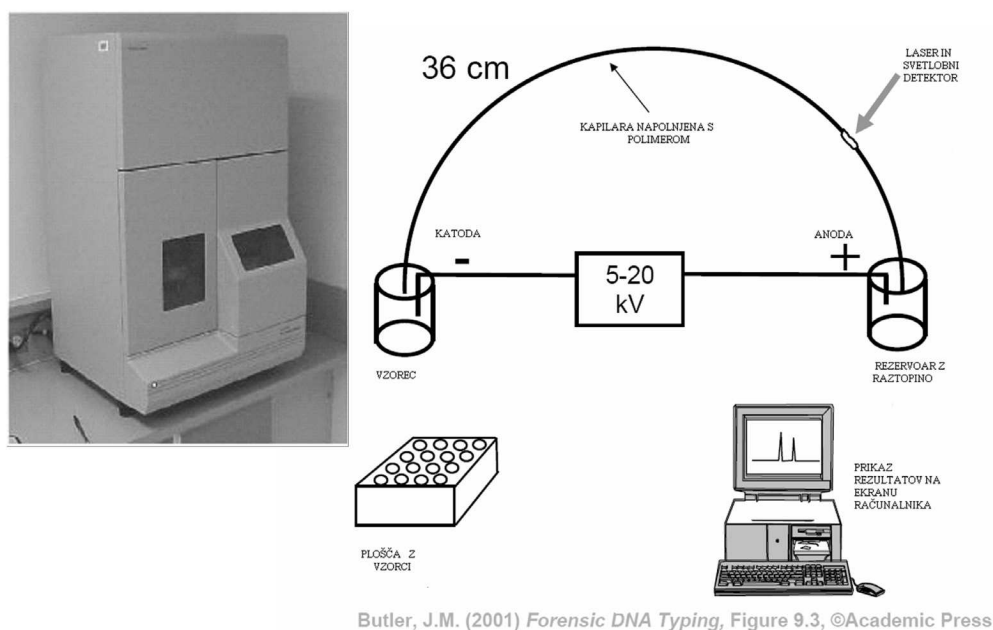
} 28 ciklov

Za ugotavljanje identitete osebe, ki je pustila biološko sled, danes uporabljamo komercialne multipleksne komplete, s katerimi lahko sočasno pomnožimo deset ali več lokusov STR v eni sami reakciji, kar omogoča identifikacijo biološke sledi z visoko znanstveno gotovostjo. Posamezna področja, ki jih preiskujemo, so po pomnožitvi obeležena z enakimi ali različnimi fluorescentnimi barvili na tak način, da področja, katerih fragmenti so različno dolgi, označimo z eno, področja z enako dolgimi fragmenti pa z drugo barvo.

Z metodo verižne reakcije s polimerazo tako iz nekaj molekul DNK namnožimo na trilijone kopij DNK, zaradi česar obstaja velika nevarnost, da skupaj z tarčno DNK pomnožimo tudi tujo DNK, kontaminacijo. V vzorec lahko pride iz sosednjega vzorca, ali z neprimernim ravnanjem (govorjenje) ali s predhodnimi PCR-produkti, ki so lahko v ozračju. Pri delu tako vedno uporabljamo rokavice, maske in posebne nastavke za pipete s filtri. Prostor, kjer se pripravljajo reakcijske zmesi, je ločen od prostora, kjer se fragmenti pomnožujejo in analizirajo.

Kapilarna elektroforeza

K uspešnosti forenzičnih genetskih testov je pripomogel tudi izredni razvoj analitske in programske opreme na tem področju. Danes ločevanje produktov PCR poteka na osnovi kapilarne elektroforeze. Za metodo je značilna visoko ločljivost in občutljivost. Z njo lahko ločimo fragmente DNK, ki se razlikujejo v dolžini enega nukleotida, hkrati pa je občutljivost tako visoka, da lahko iz ene same molekule DNK po 34 ciklih zaznamo produkt PCR. Postopek je v celoti avtomatiziran ne samo na nivoju postopka, ampak tudi na nivoju določevanja profilov STR. Vloga forenzičnega strokovnjaka je pri enostavnih profilih STR predvsem nadzorovanje poteka postopka in preverjanje rezultatov, ki jih je določil računalniški program zaradi morebitne prisotnosti artefaktov.

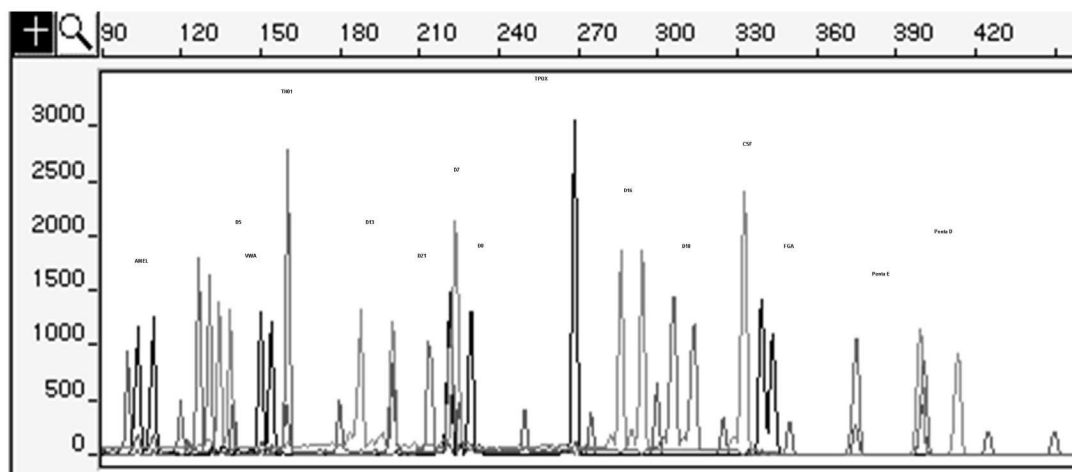


Slika 5: Ločevanje produktov PCR s kapilarno elektroforezo.

Naprava je skonstruirana tako, da samodejno poišče izbrani vzorec v plošči med 96 drugimi vzorci. Molekule DNK nato pod vplivom električnega polja iz vzorca potujejo proti anodi, ob prehodu mimo posebnega okenca jih osvetli laser, hkrati pa je na tem mestu tudi detektor, ki zazna oddano svetlobo. Podatki se po obdelavi prenesejo na osebni računalnik, kjer so vidni na zaslonu.

Kapilarna elektroforeza temelji tako kot gelska elektroforeza na principu elektrokinetike (gibanje zaradi električnega polja) s to razliko, da poteka v kapilari in kot medij uporablja

tekoč polimer, medtem ko je pri gelski elektroforezi medij strjen agar ali poliakrilamid. Z vzpostavitev električnega polja se produkti PCR, ki so negativno nabiti, zaradi elektrokinetike iz vzorca injicirajo v kapilaro (ne gre za injiciranje tekočine, temveč le molekul), ki je napolnjena s polimerom. Ločitev PCR-produktov v kapilari poteka med njihovo migracijo zaradi njihove elektroforetske mobilnosti, ki je odvisna od velikosti, detekcija pa ob prehodu mimo prozornega okenca v kapilari na mestu, kjer sta nameščena laser in svetlobni detektor (slika 5). Večje molekule DNK potujejo počasneje v primerjavi z manjšimi DNK-fragmenti. Pri prehodu mimo detektorja pride zaradi obsevanja produktov PCR z laserskimi žarki, ki so označeni s fluorescentnimi barvili, do oddaje svetlobe, ki jo sprejme detektor. Z uporabo posebnih algoritmov pretvori računalniški program podatke iz analognega (zvezni) signala v digitalno (diskretno) obliko. Rezultati analiz so podani v obliki elektroferograma, ki pove velikost analiziranih alelov in njihovo relativno koncentracijo. Posamezen alel (produkt PCR) predstavlja vrh ali pik različne dolžine (vodoravna os), medtem ko je njegova koncentracija sorazmerna z višino vrha (navpična os) (slika 6).



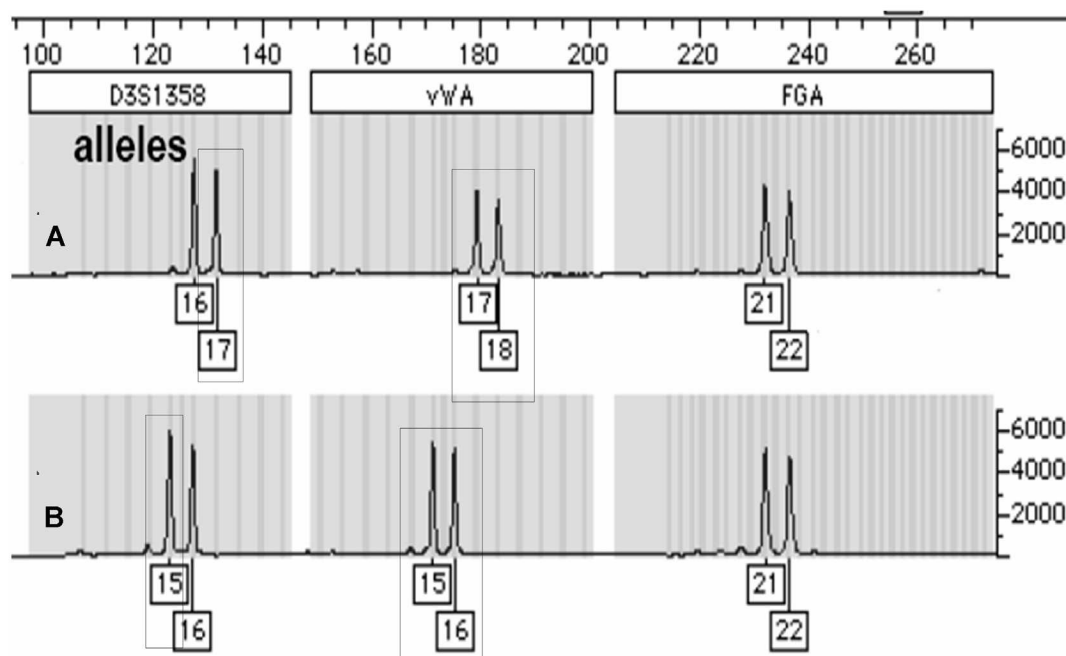
Slika 6: Elektroferogram avtosomalnega profila STR moške osebe z uporabo komercialnega kita PowerPlex 16, ki omogoča sočasno preiskovanje 15 avtosomskih lokusov STR (npr. D3 pomeni lokus STR na kromosomu 3) ter produktov homologov amelogeninskega gena (amel) na kromosomih X in Y. Dolžine alelov so v razponu od 103 do 420 nukleotidnih parov (prikazuje vodoravna os, od 90 do 420). Višina pika je odvisna od intenzitete sevanja svetlobe.

Identifikacija bioloških sledi in dokazna vrednost

Zadnji korak v forenzični genetski preiskavi je primerjanje profilov STR oz. haplotipov pri Y-STR in mtDNK dveh vzorcev – neznanega oz. biološke sledi, kot je kri s kraja dejanja, in znanega oz. primerjalnega vzorca, kot je slina osumljenca. Brez poznavanja profila DNK nekega posameznika sledi ni mogoče identificirati oz. določiti izvora in s tem identitete posameznika, od katerega izvira. Če se profil STR osebe razlikuje v enem ali celo več alelih od profila STR biološke sledi, pomeni, da imata sled in oseba različen profil STR. Torej biološka sled ne more izvirati od preiskovane osebe (slika 7). V primeru pa, da se profila STR sledi in osebe ne razlikujeta, pravimo, da je prišlo do ujemanja med obema profiloma. Vendar sta možni dve razlagi, zakaj je do ujemanja prišlo. Prvič, da sled izvira od osebe v

preiskavi, in drugič, da sled izvira od neznane osebe v populaciji ter je do ujemanja med obema profiloma prišlo povsem po naključju. Za ocenitev dokazne vrednosti ujemanja med obema profiloma STR je zato najprej treba izračunati pogostnost pojavljanja določenega profila STR v populaciji. Pogostnost profila STR pa je obratno sorazmerna z močjo dokaza. Torej: čim bolj pogost je profil STR v populaciji, tem manjšo dokazno moč ima. Prvi multipleksni komercialni kit je temeljil na preiskavi treh lokusov STR –verjetnost naključnega ujemanja je bila poprečno 1 oseba na 5000. Rezultat preiskave DNK je služil kot indic na sodišču. S povečevanjem števila lokusov STR smo sočasno povečali redkost profila STR v populaciji, s čimer se zmanjšala verjetnost naključnega ujemanja med dvema osebama. Pogostnost profila STR pri uporabi STR SGM Plus kitu je manj kot 1 oseba na 10^{13} , kar pomeni da se enak profil STR lahko pojavi pri eni osebi na 3300 milijard ljudi. Ujemanje pri tako nizki pogostnosti profila DNK močno podpira hipotezo, da sled izvira od osebe v preiskavi. Strokovnjaki FBI so sprejeli usmeritev, da je mogoče trditi, da biološki dokaz izvira od določene osebe ali njegovega enojajčnega dvojčka, ko je verjetnost ujemanja nižja od recipročne vrednosti populacije v ZDA, ki danes predstavlja 260 milijonov ljudi. Vendar pa mednarodnega soglasja o tem, kdaj je dosežena stopnja za potrditev individualne identifikacije, še ni, tako da se le-ta določa na lokalnem nivoju. Za slovensko populacijo je ujemanje pri analizi 10 lokusov STR dovolj redek dogodek, da lahko z visoko stopnjo znanstvene gotovosti trdimo, da DNK sledi in primerjalnega vzorca izvirata od iste osebe.

Ujemanje haplotipov pri analizi Y-STR in mtDNK pa nima take dokazne moči (ni možna



Slika 7: Prikazuje elektroferograma profilov STR dveh vzorcev – sledi (A) in primerjalnega vzorca sline osumljenca (B) - na lokusih STR (D3S1358, vWA in FGA). Iz slike je razvidno, da se profila STR razlikujeta v enem alelu na kolusu D3S1358 in dveh alelih na lokusu vWA (različni aleli uokvirjeni), kar pomeni, da biološka sled, označena z A, ne more izvirati od osumljenca, označenega z B.

individualna identifikacija), saj imajo vsi sorodniki po očetovi oz. materini liniji enak haplotip Y-STR oz. mtDNK. Razen v primerih, ko imamo na voljo omejeno populacijo v preiskavi (npr. letalsko nesrečo).

Sklep

Forenzične genetske preiskave so omogočile identifikacijo žrtev naravnih nesreč (cunami, letalske nesreče), žrtev terorističnih dejanj (Dvojčka v New Yorku) ali posledic vojnega nasilja (poboji v Sloveniji v času med drugo svetovno vojno in po njej, v Bosni po razpadu Jugoslavije, genocid v Ruandi, Irak, Sudan in druga vojna žarišča). Omogočile so razrešitev na tisoče kaznivih dejanj, oprostitev nedolžno obsojenih (v ZDA poteka projekt Nedolžnih, ki temelji na obnovi sodnega procesa z vključitvijo DNK-dokazov), dale odgovor na različna zgodovinska vprašanja (identifikacija družine Romanov, posmrtnih ostankov Ludvika XVII., potrdile povezave med družino predsednika Jeffersona in enim otrokom njihove sužnje Sally Hemmings). Forenzične genetske preiskave so vstopile na številna področja in brez njih si ni več mogoče zamisliti razrešitev številnih preiskav, povezanih z identifikacijo bioloških sledi ali s sorodstveno povezanostjo med posamezniki.