
Ljubomir Berberović¹

Teorijske osnove molekularno – genetičkih metoda identifikacije – “DNA Fingerprinting”

Theoretical basis of «DNA Fingerprinting» identification method

Sažetak

Osnovni pojmovi i principi klasične i molekularne genetike predstavljeni su kao naučna i teorijska osnova modernog forenzičkog metoda individualne identifikacije «DNA Fingerprinting» («DNK otisci»). Razmotreni su neki problemi u vezi sa domaćom terminologijom u molekularnobiološkoj naučnoj oblasti. Uključen je izbor najvažnije osnovne literature. Dijelovi izlaganja prikazani su u obliku nekoliko instruktivnih shema i tablica, kao zasebne cjeline izvan teksta («Box» = pregradak).

Pregledni (obzorni) članak

Opšti cilj cjelokupne forenzike je utvrđivanje materijalnih činjenica na osnovu kojih se mogu rekonstruisati kritični (relevantni) događaji iz prošlosti, po pravilu - događaji koji predstavljaju predmet policijskih (sudskih) istraga. Identifikacija učesnika u događanjima jedan je od glavnih zadataka forenzičkog istraživanja.

I pored ogromne uloge koju već više od sto godina igra u forenzici², konvencionalna analiza otisaka prstiju, jedan od ključnih metoda u klasičnim istražnim postupcima, nikad se nije mogla smatrati konačnim rješenjem problema identifikacije, budući da ima jedan primarni i kapitalan

¹ prof. Dr. sci., profesor na Prirodno – matematičkom fakultetu i Fakultetu kriminalističkih nauka u Sarajevu

² Otisci volarne površine strane vrhova prstiju prvi put su poslužili kao osobina za personalnu identifikaciju 1892. godine.

principijelni nedostatak. Naime, vrhovi prstiju mogu biti izmijenjeni hirurškom intervencijom transplantiranja (tuđe) kože. Osim toga, otiske prstiju nije uvijek lako naći, a moguće ih je i jednostavno prikrivati (rukavice). Ovo je bilo razlog što je nauka neprestano tražila nove biološke markere («biljege»³) ljudskih jedinki.⁴ Kada se radi o forenzičkoj identifikaciji osoba, do sada su kao markeri praćene krvne grupe raznih sistema, grupe tkivne snošljivosti, razlike u proteinima itd. Obično su u pitanju podaci o identitetu koji proizlaze iz analize bioloških mikrotragova, kao što su tragovi krvi, znoja, urina, sperme i sl.

Definitivan odgovor nauke na probleme uvrđivanja subjekata neke posmatrane radnje je metoda poznata pod engleskim imenom «DNA Fingerprinting» («uzimanje DNK otisaka prstiju»). Dobri stručnjaci i dobri poznavaoči engleskog jezika i genetičke terminologije smatraju da bi pogodniji bio naziv «DNA typing»⁵, ili «DNA identification»⁶.

Molekularno-genetička metoda identifikacije je konačna stoga (1) što je «DNK otisak» neizmjenjiv, (2) što «otiske» ostavljaju svi dijelovi tijela, uključujući i izlučevine, a ne samo vršci prstiju, (2) što su tragovi potrebni za identifikaciju količinski minimalni - «biološki mikrotragovi»⁷, (3) što se nikako ne može prevenirati ili prikriti ostavljanje tragova dovoljnih za analizu (rukavice, brisanje), (3) što su apsolutno individualno specifični, (4) što je praktično isključeno brisanje ili zastarijevanje tragova, (5) što je materijal uzoraka neograničeno dugo pristupačan analizi.

Naravno, i metoda «DNA Fingerprinting» ima svoje osjetljive tačke: (1) uzimanje uzoraka za obradu može obaviti samo visokostručno osoblje, (2) pri manipuliranju relevantnim

³ Primorac D. i saradnici (2001). Primjena analize DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Nakladni zavod Matice hrvatske, Zagreb.

⁴ Riječ «marker» široko se upotrebljava u biologiji i genetici za označavanje karakterističnih osobina koje se mogu pratiti posebno projektovanim metodama; u literaturi na domaćim jezicima postoje manje-više neuspjeli, a svakako nepotrebni pokušaji pokušaji da se taj termin prevedu

⁵ King R. C. & Stansfield W. D. (1997). A Dictionary of Genetics (Fifth Edition). Oxford University Press, New York - Oxford.

⁶ Lander E. S. (1992). Use of DNA in identification. Symposium «Winding Your Way through DNA», University of California, San Francisco.

⁷ Tragovi koji su dovoljni za molekularnobiološke analize vjerovatno bi se mogli tačnije nazvati «nanotragovima», pošto se radi o relevantnim ostacima submikroskopskih dimenzija, odnosno o biološkom materijalu koji se ne može istraživati na nivou mikroskopskih posmatranja.

materijalima neophodna je primjena osjetljive i komplikovane opreme, (2) obavezno i bez izostavljanja moraju se slijediti precizna i vrlo zahtjevna pravila o rukovanju uzorcima, (3) postupci molekularno-biološke analize traže složene instrumente i aparature.

Kao i u brojnim drugim primjerima usvajanja novih tehnika i tehnologija, među značajna prethodna pitanja spada i pitanje adekvatne domaće terminologije u vezi sa preuzetom (novom) metodologijom. Molekularna biologija obiluje nazivljem na engleskom jeziku, nazivljem koje je nastajalo u laboratorijama, a često počiva na dosjetkama i labavim analogijama, tako da se ne može pohvaliti posebnom preciznošću niti sistematičnošću. Pri prevođenju molekularno-bioloških termina na naš jezik nailazi se stoga na mnogobrojne teškoće. Sve to se tiče i naziva metode o kojoj je riječ. Tačan i potpun prevod engleskog termina «DNA Fingerprinting» zapravo je posve nepraktičan: glasilo bi - «Ostavljanje DNK otisaka prstiju» ili (sa stanovišta kriminalistike) «Uzimanje DNK otisaka prstiju». Jezički posmatrano, pri tome riječ «prsti» može biti upotrebljena i u jednini i u množini. Ovakav prevod je, očevidno, nedoslovan i glomazan (četiri riječi umjesto dvije), uz to i slabo razumljiv. Da bi se iz njega moglo čitati neko jasno značenje morala bi se poznavati takoreći cjelokupna naučna teorija koja stoji iza ove forenzičke tehnike. Međutim, kao i mnoga druga imena iz novijih oblasti nauke, engleska sintagma «DNA Fingerprinting» upotrebljavaće se prevedena ili neprevedena kao konvencionalan tehnički termin. Možda je, u svrhu relativne kratkoće, ovu tehniku najuputnije nazivati «DNK otisci», dakle bez potpunog oslanjanja na klasični analogni forenzički pojam, koji podrazumijeva *otisake vrškova prstiju*. Bilo bi posve neispravno da se u domaćoj terminologiji zadržava engleska skraćenica "DNA" umjesto domaće ("DNK").

Naučna osnova tehnike identifikovanja pomoću DNK otisaka («prstiju») pripada istraživačkoj oblasti molekularne biologije, odnosno molekularne genetike. Najvažniji elementi ove osnove sadržani su u teorijskim sintezama, koje su izvedene iz bogatog fonda spoznaja klasične i moderne genetike, fundamentalne nauke o biološkom nasljeđivanju i biološkoj promjenljivosti.

Korpuskularna teorija biološkog nasljeđivanja

U drugoj polovini XIX vijeka svojim Gregor Mendel, otac moderne genetike, je svojim pokusima i interpretacijom njihovih rezultata

postulirao korpuskularnu teoriju nasljeđivanja: biološko ili organsko nasljeđivanje ostvaruje se putem odijeljenih, diskretnih materijalnih čestica, koje predstavljaju fizički most među generacijama živih bića. Ove čestice osiguravaju da potomci liče na roditelje po svim bitnim osobinama, dok su u isti mah i različiti. Putem tih čestica ostvaruje se ono što nazivamo nasljednošću, a to je, zapravo, pojava da se najvažnije osobine živih bića ponavljaju kroz njihova pokoljenja. Mendel je prvi opisao pravilnosti u transgeneracijskom ponavljanju vidljivih svojstava («Mendelovi zakoni»)⁸.

Nekoliko godina nakon što su Mendelova otkrića otrgnuta zaboravu (1900), danski genetičar Johannsen daje nasljednim česticama – nosiocima nasljednosti naziv *geni* (1905)⁹. On je za novi naziv jednostavno uzeo prva tri slova već postojećeg imena nauke o organskom nasljeđivanju – *genetike*. Mlada nauka je, dakle, imala ime prije nego njen najvažniji predmet istraživanja; termin genetika skovao je engleski biolog Bateson¹⁰, dok svijet još nije saznao za Mendelove radove.

Hibridološki eksperimenti omogućili su neizravnim putem saznanje da postoje i djeluju nasljedne osnove – geni, a Mendel je formulisao i prva pravila njihove raspodjele, njihovog hoda kroz generacije. Teorija o hromosomskoj lokalizaciji gena i radovi Morganove škole o zakonitostima smještaja gena u hromosomima¹¹ učvrstili su i obogatili korpuskularnu teoriju biološkog herediteta. Zaključni je postulat formalne ili klasične genetike («mendelizam-morganizam») da individualne nasljedne osobine zavise od parova *alelnih* gena, čije je mjesto u hromosomima; jedan parnjak potiče od jednog, a drugi od drugog roditelja. Aleli u paru mogu biti međusobno jednaki (*homozigot*) ili različiti (*heterozigot*). Ova shema i ova terminologija važe i u savremenoj (vidi Pregradak 1).

⁸ Mendel J. G. (1865). Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brunn, 4:3-47.

⁹ Johannsen W. (1909). Elemente der exakten Erblchkeitslehre. Fischer, Jena.

¹⁰ Bateson W. (1905). Letter to A. Sedgewick. In: Essays and Adresses (Edited by B. Bateson). Cambridge University Press, Cambridge, 1928.

¹¹ Morgan T. H. (1926). The Theory of the Gene. Yale University Press, New Haven.

Molekularna biologija gena

Hemijsku prirodu genetičkog materijala utvrdila je ekipa istraživača sa Harvardskog univerziteta, koju je predvodio Oswald T. Avery¹². Oni su pronašli da gene sačinjava jedan jedini spoj – dezoksiribo-nukleinska kiselina (DNK). Njihov nalaz je bio rezultat brižljivo planiranih, pedantnih pokusa, koji su izvođeni punih 15 godina.

Kada je otkriveno da predstavlja osnovni nasljedni materijal, DNK se odmah našla u centru pažnje brojnih istraživačkih laboratorija u svijetu. Građu veoma krupnih molekula, makromolekula DNK, razjasnili su svojim modelom «dvojnje spirale» Britanac Crick i Amerikanac Watson¹³. Molekula DNK sastoji se od dva polinukleotidna lanca. Nukleotide je najlakše zamisliti kao karike u tim lancima. Svi nukleotidi sadrže tri komponente, tri povezana jednostavnija spoja, a među sobom se razlikuju samo po jednoj od tih komponenti. U svakom nukleotidu nalazi se jedna od četiri različite heterociklične baze – adenin, guanin, citozin ili timin (A,G,C,T). Razlikuju se, dakle, četiri tipa nukleotida u sastavu DNK - adeninski, guaninski, citozinski i timinski. Dva nukleotidna polulanca DNK drže se zajedno putem hidrogenskih veza među komplementarnim bazama naspramnih nukleotida: adenin je komplementaran timinu, a guanin citozinu.

Crick i Watson su izvrsno objasnili kako njihov model građe DNK uspješno predstavlja glavne osobine supstancije biološkog nasljeđivanja¹⁴. Naročito jasno i jednostavno model tumači najvažniju sposobnost kojom mora raspolagati nasljedni materijal – sposobnost identične reprodukcije. Geni su segmenti molekule DNK i ujedno - organizacijske jedinice biološkog nasljeđivanja. Oni neposredno upravljaju vlastitom resintezom (autoreprodukcija, *duplikacija*) i sintezom ribo-nukleinskih kiselina (*transkripcija*)¹⁵, a posredno – sintezom proteina.

¹² Avery O. T., MacLeod C. M. & McCarthy M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Journal of Experimental Medicine* 79:137-158.

¹³ Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.

¹⁴ Watson J. D. & Crick F. H. C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964-967.

¹⁵ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (Third Edition). Garland Publishing Inc., New York.

U skladu sa klasičnom genetičkom teorijom o hromosomskoj lokalizaciji genetičkog materijala, DNK se u svim eukariotskim ćelijama dolazi intimno združena sa drugim supstancijama, prije svega sa molekulama proteina i ribo-nukleinske kiseline (RNK), tvoreći specifično organizovane nadmolekularne, tj. biološke strukture – hromosome¹⁶.

Teorija genetičke informacije

Korak po korak nauka je objasnila na koji način funkcioniše DNK. DNK je sjedište genetičke informacije, u tom smislu što nosi kodirano (šifrirano) uputstvo za sintezu bjelančevina u ćelijama živih bića. Redoslijed nukleotida, građevnih jedinica u sastavu DNK, odnosno heterocikličnih baza u njima, odgovara redoslijedu aminokiselina u molekulama odgovarajućih proteina. Određeni *triplet baza* (redoslijed od tri baze) u sastavu DNK jeste slovo nasljedne poruke, koje se realizuje ugradnjom određene aminokiseline u molekulu nekog proteina. Tri baze u DNK određuju mjesto ugradnje jedne aminokiseline u bjelančevinskoj molekuli. Datom tripletu baza DNK (*kodogen*) odgovara komplementarni triplet u informacionoj RNK (*kodon*), a ovome opet komplementarni triplet u sastavu transportne RNK (*antikodon*), koja «dovodi» odgovatajuću aminokiselinu na njeno mjesto u peptidnom lancu određenog proteina. Na taj način redoslijed baza DNK biva prvo *prepisan* sintezom iRNK (transkripcija), a zatim sistemom iRNK – tRNK *preveden* u redoslijed aminokiselina (translacija).

Genetička informacija se realizuje nizom sinteza, u kojima jedna molekula služi kao kalup (matrica, *matrični katalizator*) pri stvaranju neke druge molekule. Izgradnja nukleinskih kiselina i bjelančevina odvija se po obrascu *matričnih sinteza*, a to znači da su bitne odlike novonastale molekule određene osobinama neke prethodno postojeće, koja djeluje kao kalup (matrica). Polulanci DNK su matrica za sintezu RNK pri transkripciji, odnosno za sintezu same sebe - pri duplikaciji. U oba slučaja geni (DNK) igraju ulogu matričnih katalizatora. Duplikacija je autokatalitička matrična sinteza, a transkripcija - heterokatalitička matrična sinteza (vidi sheme i tablice «Teorija genetičke informacije – pregled osnovnih elemenata», pregradak 2). Sinteza proteina («translacija») je takođe heterokatalitički proces, u kojemu neposrednu ulogu matrice igra informacijska (informaciona) RNK.

¹⁶ Redžić A. (2001). Hromosomi i ćelijski ciklus. Univerzitetska knjiga, Sarajevo.

Proteini su, uz nukleinske kiseline, druga klasa najvažnijih bioloških makromolekula.

To su takođe polimerne makromolekule, građene od aminokiselina. Broj i linearni raspored aminokiselina određuje specifičnost proteinske molekule, kao i njeno mjesto u građi i funkcijama živog sistema. Taj raspored je određen «šifrom» redoslijeda baza u određenom dijelu neke od molekula DNK. Sinteza proteina sastoji se u uspostavljanu specifičnih (peptidnih) veza među aminokiselinama, po redoslijedu koji «diktira» odgovarajuća poruka zapisana redoslijedom baza u DNK, matričnom sintezom «prepisan» (*transkripcija*) u molekulu informacijske RNK (iRNK). U komplikovanom procesu sinteze proteina učestvuju osim iRNK, koja služi kao neposredni «kalup», i drugi tipovi RNK. Svi nastaju «prepisivanjem» odgovarajućih segmenata (odsječaka, sekvencija) DNK.

Osnovna biološka uloga bjelančevina je uloga biokatalizatora, bez proteina se ne bi mogli odvijati procesi metabolizma. Enzimi, supstancije proteinske prirode, omogućavaju biohemijske reakcije koje čine promet materije i energije u živim sistemima, promet koji i jeste sam život.

Molekularna biologija stvara pouzdanu predstavu o genima kao segmentima dugačkih makromolekula DNK, čija je karakteristika redoslijed nukleotida, odnosno redoslijed sastavnih baza. Redoslijed nukleotida, odnosno redoslijed baza u molekuli DNK predstavlja legitimaciju molekule DNK i ujedno - šifrirano uputstvo za sintezu bjelančevina (proteina) u ćelijama. Kao takav, gen je jedinica nasljedne informacije, dio zbirke nasljednih uputstava za funkcionisanje živih sistema. U svakoj ćeliji višećelijskog organizma, kao što je čovjek, nalazi se potpun sastav tih uputstava, čitava knjiga, ispisana redoslijedom baza u sastavu DNK. Cjelina te poruke jeste *genom* – potpuni sastav gena, cjelokupna nasljedna informacija.

Tipovi sekvencija DNK

Gen je, prema tome, dio molekule DNK sa specifičnim redoslijedom baza, određena *sekvencija*, koja se «prepisuje» u redoslijed baza različitih RNK. RNK je primarni proizvod gena. Geni – matrice za sintezu iRNK posredno određuju redoslijed aminokiselina u odgovarajućim proteinima, tako da se mogu označavati kao *proteinski geni*. Ostali geni su matrice za sintezu drugih tipova RNK. Ribonukleinske kiseline se međusobno razlikuju prije svega po svojim ulogama u procesima realizovanja genetičke informacije.

S obzirom na njihov aktivitet, sekvencije DNK se dijele na *strukturne* i *regulatorne*. Strukturnim sekvencijama pripadaju svi geni, kako *strukturni* (uključivši proteinske), koji djeluju kao matrice za sintezu raznih tipova RNK uključenih u sintezu proteina, tako i *regulatorni*, oni koji funkcionišu u kontroli transkripcije strukturnih gena putem regulatornih proteina. Relativno jednostavan sistem genetičke regulacije transkripcije predstavlja *operonski model*¹⁷. Regulatorne sekvencije DNK su one koje, se ne prepisuju, nego u interakciji sa različitim proteinskim supstancijama utiču na djelovanje DNK (vidi shemu «Tipovi sekvencija DNK s obzirom na aktivitet», Pregradak 3).

Strukturne sekvencije, matrice za sintezu RNK, odnosno potencijalno aktivni geni, djeluju ili ne djeluju zavisno od faze ontogenetskog razvića i tipa ćelija (tkiva) u kojima se nalaze. Praktično nijedan gen ne «radi» neprestano i u svim tkivima (vidi tablicu «Strukturne sekvencije – tipovi aktiviteta», Pregradak 3).

Sekvencije DNK dijele se s obzirom na broj njihovih kopija širom genoma, u nekoliko klasa (tipova, kategorija; vidi tabele i sheme «Tipovi sekvencija DNK po frekvenciji ponavljanja u genomu», Pregradak 4). *Unikatne* i *nisko repetitivne* sekvencije obuhvataju većinu strukturnih i regulatornih gena. *Srednje (umjereno) repetitivne* sekvencije obično su duge između 100 i 500 parova baza, a ponavljaju se u genomu 100 do 10.000 puta; ovom tipu pripadaju i neki strukturni geni. *Visoko repetitivne sekvencije (satelitska DNK)* obuhvataju dvije potklase – *tandemske* i *raspršene*. Tandemske repetitivne sekvencije sastoje se od niza međusobno jednakih ponavljanja, dugih nekoliko do nekoliko stotina parova baza, a nalaze se na mnogo mjesta u genomu. Raspršene (disperzne) satelitske sekvencije razbacane su pojedinačno po genomu u 10^4 - 10^6 kopija; razlikuju se *kratke* (obično ispod 500 pb, SINE – Short INterspersed Elements) i *dugačke* (obično iznad 500 pb dužine, LINE – Long INterspersed Elements¹⁸) disperzne satelitske sekvencije. Sekvencije nazvane SINE i LINE smatraju se mobilnim elementima (retrotranspozoni) i zajedno čine oko 10% dužine humanog genoma.

¹⁷ Jacob F. & Monod J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal Mol. Biology* 3:318-356.

¹⁸ King R. C. & Stansfield W. D. (1997). *A Dictionary of Genetics* (Fifth Edition). Oxford University Press, New York – Oxford.

Dosadašnji rezultati projekta sekvencioniranja potpunog sastava humane DNK potvrđuju da se čovjekov haploidni (jednostruki) genom sastoji od približno tri milijarde parova baza¹⁹.

Hipervarijabilni regioni čovjekove DNK

Kategoriji umjereno repetitivnih sekvencija pripadaju, pored ostalih, regioni DNK vrlo naročitih osobina, označeni nazivom *minisateliti*²⁰. Minisateliti sadrže upadljivo promjenljiv broj tandemskih (uzastopnih) ponavljanja (*variable number tandem repeats, VNTR*) jedne te iste osnovne («sržne») DNK sekvencije, čija dužina varira između 15 i 100 parova nukleotida (parova baza). Minisateliti mogu biti smješteni između aktivnih gena ili u njihovom sastavu, a po genomu su razasuti u znatnom broju. Dužina im se kreće između 1000 i 5000 baza (1-5 kilobaza) i veoma je promjenljiva, zavisno od broja ponavljanja osnovne sekvencije²¹. Prvootkriveni minisatelit²² nađen je u intronu²³ gena za mioglobin i sastojao se od tandemskih ponavljanja dužine 33 para baza.

Minisateliti ispoljavaju osobit dužinski alelni polimorfizam kvantitativne prirode i odlikuju se velikim brojem alelnih varijanti (po nekoliko desetina i više, 50-100²⁴), zbog čega se odgovarajući regioni DNK nazivaju «hipervarijabilnim». Veoma je mala vjerovatnoća da genetički nesrodne jedinke imaju jednake alele u tim mjestima. Multialelna varijacija hipervarijabilnih regiona obezbjeđuje visoku heterozigotnost u odgovarajućim parovima lokusa i uvjetuje sliku individualne specifičnosti genoma²⁵.

¹⁹ Venter J. C., Adams M. D., Myers F. W. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1349.

²⁰ Jeffreys A. J., Wilson V. & Thein S. L. (1985a). Hipervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314(6006):67-73.

²¹ Klug W. S. & Cummings M. R. (2000). *Concepts of Genetics (Sixth Edition)*. Prentice-Hall International Inc., Upper Saddle River (New Jersey, USA).

²² Wyman A. & White R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings Nat. Acad. of Science USA*, 77:6754-6758.

²³ Introni su sekvencije DNK u genomu eukariotskih organizama koje se prepisuju, ali ne prevode. Drugim riječima, introni služe kao matrica pri transkripciji, ali njihov redoslijed baza nije zastupljen u primarnoj strukturi odgovarajućeg proteina.

²⁴ Lander E. S. (1989). DNA fingerprinting on trial. *Nature* 339(6225):501-505.

²⁵ Jeffreys A. J., Wilson V. & Thein S. L. (1985a).

Tandemska poravljanja u minisatelitima sadrže zajedničku «sržnu» sekvenciju od 10-15 parova baza, koja može poslužiti kao osnova za pravljenje DNK probe za istovremenu detekciju alela u više hipervarijabilnih mjesta. Takva proba (sonda), koju čine tandemska ponavljanja sržne sekvencije, otkriva mnoge međusobno nejednake minisatelite i može dati individualno specifičan «DNK otisak» primjenjiv za genetičku analizu i identifikaciju osoba²⁶.

Metodologija proučavanja genetičkog materijala

Među tehnikama koje su tokom druge polovine XX vijeka revolucionarno unaprijedile istraživanje genetičkog materijala, odnosno bioloških makromolekula, najistaknutija mjesta zauzimaju (1) separacija molekula elektroforezom, (2) enzimska obrada materijala restrikcijskim endonukleazama, (3) tehnika DNK proba.

Elektroforeza je naziv za istraživačku tehniku koja se zasniva na diferencijalnoj migrativnosti makromolekula i koloidnih čestica u električnom polju. Kada se čestice ili makromolekule suspenduju ili rastvore u nekoj sredini koja ima osobinu provođenja elektriciteta, one dobiju električno punjenje proporcionalno svojoj masi i kreću se prema suprotno nabijenoj elektrodi. Brzina kretanja zavisi od veličine i oblika čestice, njenog naboja i gradijenta napona u električnom polju. Kada su ostali faktori ujednačeni, sitnije čestice se kreću manjom brzinom. Na taj način dolazi do razdvajanja molekula različite mase i naboja.

Postoje različite varijante elektroforeze, s obzirom na porozni medij koji nosi osnovni rastor i koji djeluje kao molekularno sito. Najbolje rezultate u separaciji makromolekula daje gel-elektroforeza (prvi put primijenjena sredinom pedesetih godina prošlog vijeka), ali i njeni transferi na čvrstim «nosačima» od inertnih materijala (filter-papir, celuloza acetat). Za separaciju nukleinskih kiselina osobito su pogodni agarozni i akril-amidni gel²⁷. Budući da nukleo-kiselinske molekule imaju konstantan naboj po jedinici mase, njihove frakcije se na akrilamidnom i agaroznom gelu gotovo idealno razdvajaju prema masi i konformaciji. Agarozni gel bolje razdvaja krupnije molekule DNK,

²⁶ Jeffreys A. J., Wilson V. & Thein S. L. (1985b). Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316(6023):76-79.

²⁷ Paulsen D. F. (2000). *Histology & Cell Biology - Examination and Board Review*. McGraw-Hill International Editions, New York etc.

one od nekoliko stotina i više nukleotida, dok je akrilamid gel efikasniji u separaciju kraćih sekvencija. Primjenom akrilamid gela moguće je razdvojiti molekule koje se po dužini razlikuju za jedan jedini nukleotid. Tehnike separiranja RNK i proteina u biti su jednake tehnici koja se primjenjuje u istraživanju DNK. Utvrđivanju i analizi razlika u dužini DNK molekula (odnosno njihovih fragmenata) služe isti tipovi elektroforeze koji služe u proučavanju proteina.

Tehnika «Southern blotting», nazvana po svome autoru, kojom se analiziraju fragmenti DNK imobilizirani na nitroceluloznom filmu, jako je unaprijedila molekularno-biološko upoznavanje čovječjeg genoma²⁸.

Metoda «lančane reakcije pomoću DNK polimeraze» (Polymerase Chain Reaction, PCR) omogućava da se relativno brzo i lako umnoži bilo koja odabrana sekvencija DNK. Zahvaljujući ovoj metodi za forenzičku analizu su dovoljne minimalne količine DNK, kakve, na primjer, sadrže biološki mikrotragovi.

Restriksijske (endo)nukleaze su specijalna klasa enzima čijim je otkrićem²⁹ i karakterizacijom³⁰ ostvarena bitna pretpostavka za različite pravce analize i manipulacije DNK. Rani ruski istraživači predložili su njih kraće, pa zato možda zgodnije ime – *restriktaze*, koje se takođe zadržalo u upotrebi.

Restriksijske endonukleaze su karakteristične za metabolizam bakterija i modrozelenih algi, u kojima se i nalaze. Njihova prirodna funkcija je razgradnja molekula strane DNK, koje u bakteriju mogu dospjeti izravnim ulaskom iz okoline (transformacija). Pod uticajem restriktaza dugačke molekule DNK se prekidaju u kraće fragmente. Svaka restriktaza obično djeluje uporedo sa paralelnim tipom enzima (modifikacijske endonukleaze, metilaze), čija je uloga da kataliziranjem određenih modifikacijskih reakcija (metilacija baza u kritičnim mjestima prepoznavanja ili rasijecanja) zaštite «domaću» DNK od razgradnje. Zato se govori o tzv. restriksijsko-modifikacijskim enzimskim sistemima.

²⁸ Tehnika je prvi put primijenjena 1975. godine.

²⁹ Meselson M. & Yuan R. (1968). DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217:1110-1114.

³⁰ Smith H. O. & Wilcox K. W. (1970). A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. II Base sequence of the recognition site. *Journal Mol. Biol.* 51:393-409.

Svakoj restriktazi odgovaraju dva karakteristična mjesta u DNK koju razgrađuje, a to su mjesto prepoznavanja («recognition site») i mjesto restrikcije (mjesto na kojem restriktaza izaziva reakciju prekidanja molekule DNK, «restriction site»). Tipologija restrikcijskih endonukleaza zasniva se na razlikama u specifičnosti mjesta («sites», sajti) njihove reakcije sa molekulama DNK. Za postupke u analizi i manipulaciji DNK posebno su važne restriktaze tipa II, kojima se mjesto raspoznavanja poklapa sa mjestom presijecanja³¹.

Stroga specifičnost restrikcijskih endonukleaza u pogledu mjesta prepoznavanja i presijecanja na molekulama DNK ima veliki značaj. Određena sekvencija DNK, u reakciji sa određenom restriktazom, raspada se na onoliko fragmenata koliko odgovara broju mjesta presijecanja usljed djelovanja tog određenog enzima. Određena restriktaza izaziva raspadanje iste molekule DNK uvijek na jednak broj fragmenata stalne dužine, osim ukoliko u njoj postoje promjene usljed kojih je spriječen pristup i aktivnost dotičnog restrikcijskog enzima. Dužina fragmenata je različita i njih je moguće bez teškoća razdvojiti postupkom elektroforeze. Ako se mutacijom izmijeni redosljed baza u kritičnom mjestu raspoznavanja/presijecanja, do prekidanja DNK neće doći. Primjenom različitih restriktaza moguće je utvrditi redosljed baza na raznim položajima u molekuli DNK³².

Djelovanjem određene restriktaze mogu se, dakle, identifikovati alelne varijante pojedinih gena, pošto razni aleli daju fragmente nejednake dužine, zavisno od toga da li se u njima nalaze mjesta restrikcije ili ne. Takve promjene u sekvencijama DNK obično proizlaze iz najprostije mnutacije - zamjene pojedinačnih baza (nukelotida) u mjestu prepoznavanja (presijecanja). Ova pojava je označena terminom polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata («restriction fragment length polymorphism», RFLP). Različite sekvencije DNK na koje djeluje ista restriktaza razlikuju se među sobom po dužini nastalih restrikcijskih fragmenata.

DNK probe (hibridizacijske probe) su radioaktivnim izotopima ili na neki drugi način obilježeni jednolančani fragmenti DNK sa poznatim redosljedom baza, koji se odgovarajućim metodama (prema obilježavanju) lako uočavaju i prate.

³¹ Schleif R. (1993). Genetics and Molecular Biology (Second Edition). The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.

³² Botstein D., White R., Skolnick M. & Davis R. (1985). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. Journal Hum. Genet. 32:314-331.

Djelovanjem temperature, električnih sila ili određenih hemikalija, dvostruki lanac DNK se razdvaja na dva jednolančana polinukleotida, pri čemu se potpuno sačuva originalni redoslijed nukleotida. Taj proces se naziva denaturacija. Razdvojeni polulanci DNK (ili njihovi dijelovi) ponovo se sastavljaju, putem obnavljanja hidrogenskih veza među komplementarnim nukleotidima (reanturacija).

Djelimična renaturacija na polulancima DNK veće dužine, iskorištava se u različitim molekularno-biološkim istraživanjima i pokusima. Osnovno oruđe pri tome su DNK probe (ponekad se nazivaju i DNK sonde, a u te svrhe može poslužiti i RNK), koje komplementarnim vezivanjem «prepoznaju» odgovarajuće sekvencije DNK.

DNK proba koja sadrži zajedničko tandemsko ponavljanje sržne sekvencije minisatelita u humanom genomu, otkriva veliki broj jako varijabilnih lokusa, parcijalno hibridizirajući sa fragmentima DNK prethodno obrađene određenom restriktazom. Ovim putem se dobijaju individualno specifični «DNK otisci» za opštu primjenu u genetičkoj analizi u forenzičke i medicinske svrhe ³³.

Specifične kombinacije navedenih tehnika omogućavaju utvrđivanje «DNK otisaka», kako je prikazano jednim pregledom procesnih faza u proceduri klasičnog tipa (Pregradak 5). Savremeni praktični postupci su inače u različitoj mjeri automatizovani i među sobom se mogu razlikovati po biohemijским i tehničkim detaljima.

Summary

Basic notions and principles of the classical and molecular genetics are presented as the general scientific ground of the modern forensic methods for individual identification («DNA Fingerprinting»). A selection of most important basic references is included. Some instructive original schemes and tables are made available as distinct enclosures («boxes») in the text.

³³ Gill P., Jeffreys A. J. & Werrett D. J. (1985). Forensic application of DNA "fingerprints". Nature 318(6046):577-579.