Uloga aktivnog ugljena u otklanjanju inhibitora lančane reakcije polimerazom u forenzičnim biološkim uzorcima

Barbarić, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:948986

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Lucija Barbarić

ULOGA AKTIVNOG UGLJENA U OTKLANJANJU INHIBITORA LANČANE REAKCIJE POLIMERAZOM U FORENZIČNIM BIOLOŠKIM UZORCIMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Lucija Barbarić

THE ROLE OF ACTIVATED CARBON IN ELIMINATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION INHIBITORS IN FORENSIC BIOLOGICAL SAMPLES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova Republike Hrvatske, pod vodstvom prof. dr. sc. Zorane Grubić, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Teško je riječima opisati zahvalnost brojnim meni dragim ljudima koji su me podržavali sve ove godine, ali pokušat ću to sažeti u nekoliko redaka.

Najprije se zahvaljujem Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" Ministarstva unutarnjih poslova i njegovom načelniku doc. dr. sc. Gordanu Mršiću, bez čije financijske podrške ovaj rad ne bi nastao.

Neizmjerno hvala mojoj mentorici koja je vjerovala u mene kada nitko drugi nije.

Također zahvaljujem prof. dr. sc. Davorki Sutlović i doc. dr. sc. Martini Šerugi Musić na susretljivosti i razumijevanju.

Načelniku Odjela Siniši Merkašu i voditeljici Odsjeka Veri Rakić Slijepčević, koji su me bezuvjetno podržavali.

Hvala mojim kolegama i prijateljima Ivani Bačić, Marini Plivelić, Mariji Valić, Ivani Boričević, Jeleni Kozar, Igoru Obleščuku, Sunčici Papić i Andreji Robić, koji su mi pomagali i bili uz mene i u najtežim trenucima.

Veliko hvala mojoj najdražoj statističarki prof. dr. sc. Ani Vukelić, s kojom mi je i statistika postala zanimljiva.

Također zahvaljujem svojim prijateljima i bivšim kolegama dr. sc. Berislavu Lisniću i prof. dr. sc. Kseniji Durgo na pomoći i savjetima.

Na bezgraničnoj pomoći želim zahvaliti mr. sc. Ines Gmajnički i dr. sc. Veroniki Marinović, kao i mojim najboljim profesoricama Jasni Vorkapić-Furač te Zorani Grabarić.

Hvala svim dobrim kolegama i prijateljima iz Centra za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić" i iz Ekipe za očevide Policijske uprave zagrebačke, koji mukotrpan posao rade nasmijanih lica.

Hvala i svima ostalima koje ovdje nisam spomenula, a koji su mi na bilo koji način pomogli na putu do ovog životnog ostvarenja.

Zahvalnost dugujem svim svojim dugogodišnjim prijateljima kao i svojoj obitelji.

Na kraju želim zahvaliti svom suprugu, koji je bio moja najveća podrška i bez kojeg ništa ne bi imalo smisla.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

ULOGA AKTIVNOG UGLJENA U OTKLANJANJU INHIBITORA LANČANE REAKCIJA POLIMERAZOM U FORENZIČNIM BIOLOŠKIM UZORCIMA

LUCIJA BARBARIĆ
Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"

Forenzični biološki uzorci često sadržavaju male količine DNA uz prisustvo smjese inhibitora umnažanja DNA. Tijekom izolacije DNA s podloge dijelovi podloge kao potencijalni inhibitori mogu se izolirati zajedno s genomskom DNA, čime se smanjuje ili u potpuno onemogućuje umnažanje mikrosatelitnih lokusa. Cilj ovog istraživanja jest ukloniti inhibitore umnažanja DNA pomoću aktivnog ugljena uz što manji gubitak humane DNA. Kvaliteta izolirane DNA testirana je umnažanjem deset mikrosatelitnih lokusa. Uspoređena je efikasnost neafinitetnih metoda izolacije genomske DNA (Chelex i organska izolacija), kao i metoda pročišćavanja ultrafiltracijom (Amicon komercijalna kolona) i adsorpcijom (aktivni ugljen). Općenito, Chelex se pokazao kao učinkovitija metoda izolacije DNA, a usporedbom metoda pročišćavanja nije bilo statistički značajne razlike u kvaliteti umnožene DNA. Primjena aktivnog ugljena pokazala se jednostavnom, brzom, ekonomičnom i reproducibilnom metodom pročišćavanja. Aktivni ugljen uspješno je adsorbirao hematin, prirodni inhibitor iz krvi, bez značajnih gubitaka DNA. Nadalje, smanjena je koncentracija inhibitora iz podloge kao što su humusne tvari iz zemlje i tanini iz drva. Amicon se pokazao kao efikasnija metoda za uklanjanje indiga iz trapera kao podloge. Pročišćavanje bioloških uzoraka temeljeno na fizikalnim i kemijskim svojstvima aktivnog ugljena dosad nije provedeno, stoga spoznaje utvrđene u ovom istraživanju daju prvi uvid u novu primjenu tog dobro poznatog adsorbensa.

(100 stranica, 49 slika, 3 tablice te 137 literaturnih navoda, izvornik na hrvatskom)

Ključne riječi: *forenzični biološki uzorci, inhibicija, aktivni ugljen, hematin, humusne tvari, tanini, indigo boja*

Mentor: *dr. sc. Zorana Grubić, izvanredni profesor*

Ocjenjivači: *dr. sc. Davorka Sutlović, izvanredni profesor*
dr. sc. Zorana Grubić, izvanredni profesor
dr .sc. Martina Šeruga Musić, docent

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

THE ROLE OF ACTIVATED CARBON IN ELIMINATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION INHIBITORS IN FORENSIC BIOLOGICAL SAMPLES

LUCIJA BARBARIĆ
Forensic Science Centre "Ivan Vučetić"

Forensic biological samples often contain small quantities of DNA in presence of mixture of DNA amplification inhibitors. During the genomic DNA extraction, parts of the substrate, as potential inhibitors, could be co-extracted with genomic DNA and reduce or completely disable amplification of microsatellite loci. Aim of this study is to eliminate inhibitors of DNA amplification using activated carbon, without significant loss of human DNA. Quality of extracted DNA was tested by amplification of ten microsatellite loci. In this doctoral thesis, efficiency of non-affinity DNA extraction methods (Chelex and organic extraction) as well as purification methods based on ultrafiltration (Amicon commercial column) and adsorption (activated carbon) were compared. Generally, Chelex extraction method was more efficient, while no statistically significant difference was obtained if purification methods were compared. Application of activated carbon was shown as simple, fast, economic and reproducible purification method. Activated carbon effectively adsorbed hematin, as inhibitor naturally originated from blood, without significant loss of DNA. In addition, concentration of inhibitors present in the substrate, such as humic substances in soil substrate, as well as tannins in wood, was reduced. Amicon was more efficient method for elimination of indigo dye as inhibitor present in denim substrate. Since purification of biological samples based solely on chemical and physical characteristics of activated carbon has not yet been performed, results of this research provide the first insight into a new application of this well known adsobent.

(100 pages, 49 figures, 3 tables and 137 references, original in Croatian)

Keywords: *forensic biological samples, inhibition, activated carbon, hematin, humic substances, tannins, indigo dye*

Supervisor: *Zorana Grubić, PhD, Associate Professor*

Reviewers: *Davorka Sutlović, PhD, Associate Professor*
Zorana Grubić, PhD, Associate Professor
Martina Šeruga Musić, PhD, Assistant Professor

1 UVOD 1

2 LITERATURNI PREGLED 4

2.1 Povijesni pregled razvoja forenzične genetike 5

2.2 Primjena mikrosatelitnih lokusa u forenzičnoj analizi DNA 7

2.3 Genotipizacija forenzičnih bioloških uzoraka 7

2.3.1 Izuzimanje bioloških uzoraka 8

2.3.2 Izolacija i pročišćavanje genomske DNA 8

2.3.3 Kvantifikacija humane DNA 12

2.3.4 Umnažanje i analiza mikrosatelitnih lokusa 13

2.4 Inhibitori umnažanja humanih mikrosatelitnih lokusa 15

2.4.1 Hematin 16

2.4.2 Humusne tvari 18

2.4.3 Tanini 20

2.4.4 Indigo 21

2.4.5 Metode uklanjanja inhibitora umnažanja mikrosatelitnih lokusa 22

2.4.6 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije inhibitora 23

2.5 Aktivni ugljen 24

3 EKSPERIMENTALNI DIO 26

3.1 Materijali 27

3.2 Metode 27

3.2.1 Priroda i adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena 27

3.2.2 Test adsorpcije u ovisnosti o temperaturi i vremenu 30

3.2.3 Priprema bioloških uzoraka 31

3.2.4 Izolacija genomske DNA 31

3.2.4.1 Izolacija Chelexom 31

3.2.4.2 Organska izolacija 32

3.2.5 Pročišćavanje genomske DNA 33

3.2.5.1 Ultrafiltracija Amiconom 33

3.2.5.2 Adsorpcija na aktivnom ugljenu 33

3.2.6 Određivanje koncentracije humane DNA 33
3.2.7 Umnažanje mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom 34
3.2.8 Detekcija mikrosatelitnih alela 35
3.2.9 Spektofotometrijsko određivanje koncentracije inhibitora 35
3.2.10 Pročišćavanje forenzičnih bioloških uzoraka 36
3.3 Obrada podataka i statistička analiza rezultata 38
4 REZULTATI 40
4.1 Optimizacija uvjeta pročišćavanja bioloških uzoraka pomoću aktivnog ugljena 41
4.1.1 Priroda i adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena 41
4.1.2 Adsorpcija u ovisnosti o temperaturi i vremenu 43
4.2 Usporedba izolacije i pročišćavanje inhibiranih bioloških uzoraka 49
4.2.1 Krv na zemlji kao podlozi 49
4.2.2 Epitel izložen zemlji 52
4.2.3 Krv na drvu kao podlozi 54
4.2.4 Epitel na drvu kao podlozi 57
4.2.5 Krv na traperu kao podlozi 60
4.2.6 Epitel na traperu kao podlozi 63
4.2.7 Uzorci krvi 64
4.2.8 Uzorci epitela 67
4.3 Usporedba izolacije i pročišćavanja inhibiranih forenzičnih bioloških uzoraka 70
5 RASPRAVA 76
6 ZAKLJUČAK 83
7 LITERATURA 85
8 ŽIVOTOPIS 98

Otkrićem uzastopno ponovljenih hipervarijabilnih regija, minisatelita, postavljeni su temelji za razvoj moderne forenzične genetike, kao i njihove primjene u analizi biološkog materijala. S početkom uporabe lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) kratka uzastopna ponavljanja – mikrosateliti, pokazali su se kao najbolji do tada otkriveni genetički biljezi. Odlikuje ih brzo umnažanje i mogućnost lakog određivanja, što ih čini osobito korisnim u analizama forenzičnih bioloških tragova. Većina tragova uzetih s mjesta događaja često sadrže mali i ograničen broj stanica, a izlaganje uvjetima okoliša može dovesti do degradacije DNA i inhibicije umnažanja DNA metodom PCR (1). Pri izolaciji DNA dijelovi podloge kao potencijalni inhibitori mogu se izolirati zajedno s genomskom DNA, čime se smanjuje ili u potpunosti onemogućuje umnažanje DNA. Velik broj inhibitora dobro je poznat, međutim mehanizmi djelovanja kao i mogućnosti njihova uklanjanja još uvijek su predmet brojnih istraživanja (2). Stoga su uspješnost i osjetljivost izolacije DNA, kao i pročišćavanja izolirane DNA, kritični čimbenici u dobivanju DNA profila kao konačnog rezultata forenzične analize DNA. Pronalazak nove, učinkovite metode uklanjanja inhibitora umnažanja DNA od iznimne je važnosti za forenzičnu analizu DNA, ali i sva istraživanja koja obuhvaćaju analizu DNA. Metoda pročišćavanja trebala bi biti jednostavna, brza, reproducibilna, jeftina, primjenjiva na velikom broju različitih vrsta uzoraka, a da pritom ne utječe na značajan gubitak DNA i rezultira visokokvalitetnom DNA.

Cilj ovog istraživanja jest pročistiti biološke uzorke od potencijalnih inhibitora umnažanja DNA pomoću aktivnog ugljena. Uklanjanje inhibitora metode PCR dosada nije bilo istraženo primjenom aktivnog ugljena, kao inertnog materijala koji ne bi trebao utjecati na daljnju forenzičnu analizu. Pretpostavka je da aktivni ugljen adsorbira inhibitore tako da uzorci u konačnici sadrže dovoljnu količinu čiste humane genomske DNA za analizu mikrosatelitnih lokusa.

U radu su uspoređene neafinitetne metode izolacije DNA, ali i metode pročišćavanja DNA temeljene na ultrafiltraciji (Amicon kolona) i adsorpciji (aktivni ugljen). Detektirana je prisutna inhibicija i određena je koncentracija humane DNA

kvantitativnim PCR-om u svakom pojedinom uzorku, a potom su mikrosatelitnih lokusi umnoženi te je utvrđena kvaliteta DNA.

Svrha ovog istraživanja jest u konačnici uvesti pročišćavanje aktivnim ugljenom u svakodnevni rad s inhibiranim forenzičnim biološkim uzorcima.

LITERATURNI PREGLED

2.1 Povijesni pregled razvoja forenzične genetike

Karl Landsteiner već je 1900. godine opisao sustav krvnih grupa ABO i to je bio prvi način genetskog razlikovanja ljudi. Godine 1915. Leone Lattes uveo je određivanje krvnih grupa u osušenim tragovima krvi kao osnovu za razvoj forenzične serologije (3). O postojanju genetskih razlika priopćeno je već 1919. godine u istraživanju gena koji kodira krvne grupe, a koji je ujedno i prvi opisani humani gen, čime je tipizacija ABO postala jedna od glavnih metoda za određivanje tjelesnih tekućina. Iako su serološke metode bile dobre, u forenzičnim slučajevima bile su ograničene količinom dostupnog biološkog materijala te je bio nužan pronalazak novih metoda. Pauling i suradnici proveli su elektroforezu normalnog hemoglobina i hemoglobina nađenog kod anemije srpastih stanica te time uveli elektroforezu kao novu metodu u istraživanju genetske raznolikosti (4). Do osamdesetih godina serološke i elektroforetske metode koristile su se za određivanje raznolikosti krvnih grupa i polimorfnih proteina. Glavni nedostaci ovih biljega jesu brza degradacija bakterijskim enzimima, ali i mala raznolikost te informativnost (5). Otkrićem građe molekule DNA započeo je razvoj molekularne genetike, a početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća počeli su se koristiti restrikcijski enzimi za cijepanje DNA na točno određenim mjestima (6).

Uzastopni ponavljajući nekodirajući sljedovi DNA, nazvani satelitna DNA, otkriveni su eksperimentom centrifugiranja DNA u gradijentu cezijevog klorida. Engleski genetičar Alec Jeffreys sa suradnicima objavio je da određene regije DNA sadrže uzastopno ponovljene sljedove čiji je broj ponavljanja u slijedu različit za jedinku. Takve hipervarijabilne regije nazvao je minisatelitima ili VNTR (eng. *Variant Number of Tandem Repeats)* i time postavio temelje za razvoj svih istraživanja koja obuhvaćaju analizu DNA (7, 8). Ponavljanja su važan dio genoma većine eukariota i raspršeni su po čitavom genomu, a njihovo pojavljivanje i položaj u genomu specifični su za određenu vrstu (9). Razlikuju se tri vrste ponavljajućih sljedova: sateliti, minisateliti i mikrosateliti.

Satelitnu DNA čine ponavljajući sljedovi duljine do 100 megabaza (Mb). Nalaze se u heterokromatinskim regijama kromosoma uglavnom u blizini centromera.

Minisatelitna DNA sastoji se od 10 do 1000 uzastopnih ponovljenih sljedova prosječne duljine od 10 do 100 parova baza (pb). Hipervarijabilni minisateliti nađeni su u kromosomskim regijama s visokom stopom rekombinacije, a kod čovjeka većina takvih lokusa nađena je u subtelomernim regijama kromosoma sklonim rekombinaciji (10).

Razvoj metode lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) omogućio je ubrzano istraživanje svijeta molekularne biologije, što je u konačnici dovelo do sekvenciranja humanog genoma (11, 12). Otkriveno je da je približno 99,7% genoma identično te je unutar 0,3% genoma bilo potrebno naći regije koje omogućuju razlikovanje jedinki na genetičkoj razini (1). Istovremeno sa sekvenciranjem humanog genoma otkriveni su i mikrosateliti ili kratka uzastopna ponavljanja (eng. *Short Tandem Repeats,* STR).

Mikrosateliti su sljedovi DNA u kojima se uzastopno ponavlja od 1 do 6 pb, a broj ponavljanja rijetko prelazi 70 puta (13). Nađeni su u svim eukariotskim genomima, ali i u genomima prokariota (14). Kratki ponavljajući sljedovi raspršeni su duž genoma sisavaca, koji sadržava na stotine tisuća takvih lokusa. Istraživanjem ljudskog genoma utvrđeno je da mikrosateliti čine oko 3% genoma (15). Iako njihova funkcija još nije u potpunosti poznata, istraživanja upućuju na njihovu ulogu u translaciji, transkripciji, organizaciji kromatina, rekombinaciji i staničnom ciklusu (16). Mehanizam nastanka uzastopno ponavljajućih polimorfizama najčešće je proklizavanje polimeraze tijekom replikacije, čime nastaju mikrosatelitni sljedovi, dulji ili kraći za jedno ponavljanje (17, 18), a više ponavljajućih jedinica odjednom se može umetnuti ili izgubiti tijekom nejednake rekombinacije DNA (7, 19, 20). Zbog velike brzine mutacije (10^{-3} - 10^{-5} mutacijskih događaja po mikrosatelitnom lokusu i po generaciji) postoji velika raznolikost u broju ponavljajućih sljedova između jedinki, a stopa mutacije razlikuje se s obzirom na dužinu i broj ponavljajućih jedinica, kao i na raspored baza (21–23). S obzirom na to da su mikrosateliti kodominantni biljezi koji se nasljeđuju jednostavnim Mendelovim načinom nasljeđivanja, visoko su polimorfni te se mogu jednostavno i brzo analizirati metodom PCR, vrlo su popularni u širokome spektru molekularno-genetičkih istraživanja (13, 15).

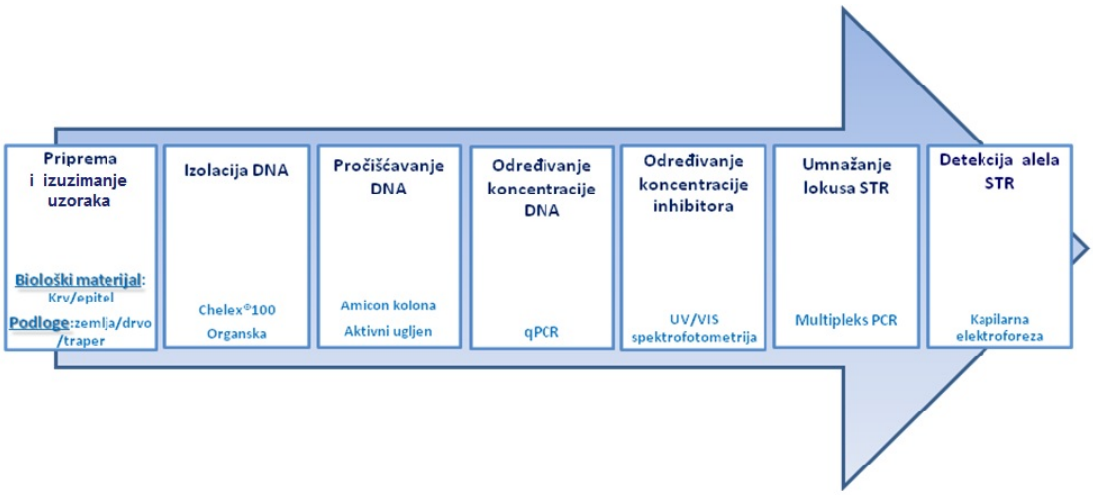
2.2 Primjena mikrosatelitnih lokusa u forenzičnoj analizi DNA

Iako je poznato da humani genom sadrži na tisuće lokusa STR, mali broj našao je primjenu u forenzičnoj praksi. Da bi se mogli koristiti za identifikaciju pojedinaca, lokusi STR morali su zadovoljiti sljedeće kriterije: izražena učestalost heterozigotnosti, mala stopa mutacije, jasno određen ponavljajući slijed, dobro određene alele te jednostavno i pouzdano umnažanje (28).

Lokusi STR prvi su put opisani kao učinkovito oruđe za identifikaciju ljudi devedesetih godina prošlog stoljeća (24–27). U proteklih dvadesetak godina analiza i genotipizacija polimorfizama lokusa STR iznimno su unaprijeđene, tako da njihova analiza omogućuje dobivanje profila DNA iz uzoraka koji sadrže vrlo malu količinu DNA (<200 pg DNA), čak i degradirane DNA (29). Pojavila su se i nova područja kao što je genotipizacija mitohondrijske DNA, kromosoma Y (30), kromosoma X (31), a u novije vrijeme i tipizacija mRNA, kao i miRNA za određivanje vrste tjelesne tekućine na temelju ekpresijskih profila u različitim tkivima (32–34), a osim humane DNA uspješno se genotipiziraju animalna DNA i biljna DNA.

2.3 Genotipizacija forenzičnih bioloških uzoraka

Faze forenzične analize DNA, kao i metode koje će se koristiti u ovom radu, prikazane su na Shemi 1. i bit će pobliže opisane u poglavljima koja slijede.



Shema 1. Shematski prikaz provedbe analize DNA u ovom radu

2.3.1 Izuzimanje bioloških uzoraka

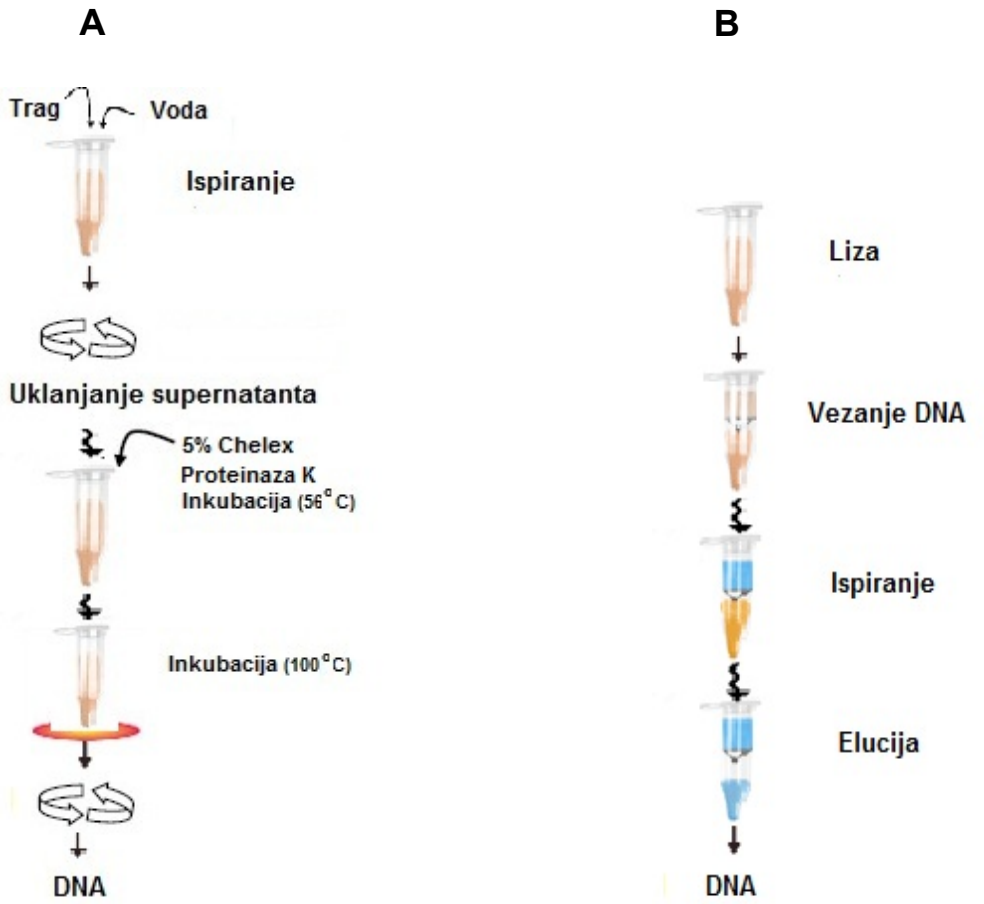
Analiza forenzičnih bioloških uzoraka (krv, slina, sperma, epitelne stanice, tkivo, kosti itd.) započinje izuzimanjem tragova s mjesta događaja ili od poznate osobe (referentni uzorci). Biološki tragovi izuzimaju se tako da se uzima što više biološkog materijala sa što manje podloge na kojoj se biološki materijal nalazi, a čiji bi sastavni dijelovi mogli utjecati na uspješnost umnažanja DNA metodom PCR.

Uzorkovanje može biti direktno i indirektno. Kod direktnog uzorkovanja, podloga na kojoj se nalazi biološki materijal izuzima se za analizu zajedno s biološkim materijalom. Iako ova vrsta uzorkovanja osigurava da nema gubitaka DNA, učestala je inhibicija umnažanja DNA (35-37). Indirektno uzorkovanje uključuje izuzimanje bioloških uzoraka najčešće pomoću vatenog štapića navlaženog vodom. Indirektna metoda često se primjenjuje u forenzičnoj analizi, a mana ove vrste uzorkovanja leži u činjenici da apsorpcijski kapacitet vate može spriječiti oslobađanje stanica i dovesti do lažno negativnog rezultata za vrlo oskudne uzorke (37), stoga izbor načina uzorkovanja ovisi isključivo o procjeni i iskustvu istraživača.

2.3.2 Izolacija i pročišćavanje genomske DNA

Izolacija DNA bila je i ostala najduža kao i najzahtjevnija faza u analizi DNA, a time i vrlo interesantna za daljnja istraživanja. Važnost ove faze leži u činjenici da se prije daljnje analize lokusa STR treba osigurati dobra kvantiteta i kvaliteta DNA u istraživanim uzorcima. U praksi vrlo često nije poznato u kojim se uvjetima i koliko dugo trag nalazio, stoga metoda izolacije mora osigurati dovoljnu količinu DNA za analizu velikog broja različitih uzoraka koji zbog starosti mogu sadržavati degradiranu DNA, a zbog uvjeta okoliša i brojne inhibitore. Osim toga, metoda treba osigurati najveće moguće iskorištenje izolirane DNA iz uzorka bez uvođenja reagensa koji mogu utjecati na daljnju analizu. Sve metode izolacije uključuju lizu stanica, otpuštanje DNA u otopinu, kao i uklanjanje, odnosno neutralizaciju inhibitora PCR-a (metode uklanjanja inhibitora opisane su u poglavlju 2.4.5.).

Općenito, metode izolacije DNA mogu se podijeliti na afinitetne i neafinitne (Slika 1A i 1B). Kod afinitetnih metoda DNA se selektivno veže na čvrsti medij kao što su primjerice paramagnetska zrnca (DNA IQ-Promega Corporation, Madison, SAD; PrepFiler - Applied Biosystems, Foster City, SAD) ili silika membrana (QiAmp - Qiagen, Hilden, Njemačka). Ispiranjem membrane iz otopine se uklanjaju proteini i dvovalentni kationi, a DNA se potom eluira, kao što je prikazano na Slici 1B. Iako je dobivena čista DNA, riječ je o skupim metodama, a u praksi se pokazalo da tijekom ispiranja može doći do značajnih gubitaka DNA. Zbog uštede vremena, ali i smanjenja moguće kontaminacije tijekom izolacije, u posljednje se vrijeme teži automatizaciji izolacije DNA korištenjem afinitetetnih metoda, uključujući robote (Qiacube – Qiagen, Hilden, Njemačka; Maxwell®16 – Promega Corporation, Madison, SAD).



Slika 1. Usporedba neafinitetne (A) i afinitetne (B) metode izolacije DNA. (prilagođeno prema literaturnom navodu 38)

Najčešće neafinitetne metode koje se koriste u forenzičnim laboratorijima jesu organska i izolacija Chelex-om®100. Organska metoda poznata je i pod nazivom fenol/kloroform izolacija. Riječ je o jednoj je od najdugovječnijih metoda za izolaciju DNA. To je osjetljiva metoda izolacije DNA, koja omogućuje izolaciju dvolančane DNA dobre kvalitete iz različitih vrsta uzoraka, a osobito se koristi za stare i/ili degradirane uzorke (39). Metoda uključuje lizu stanica, digestiju sastavnih dijelova stanica i njihovo uklanjanje organskim otapalima. Liza stanica provodi se u puferu koji sadrži natrij dodecil sulfat (eng. *Sodium DodecylSulfate*, SDS), etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA) i natrij klorid (NaCl) (40), uz dodatak enzima proteinaze K i diotiotreitola (DTT). Detergent SDS olakšava razaranje stanične membrane taloženjem proteina i lipida, u čemu mu pomaže NaCl, dok DTT omogućuje cijepanje disulfidnih mostova u proteinima. Najpoznatiji kelator dvovalentnih kationa, EDTA, onemogućuje djelovanje staničnih nukleaza i time osigurava zaštitu DNA. Proteinaza K jest serinska proteinaza koja omogućuje cijepanje staničnih proteina. Njezina aktivnost povećava se s povećanjem temperature u prisustvu detergenta, što je čini iznimno korisnim enzimom za digestiju proteina tijekom pročišćavanja nukleinskih kiselina (41). Fenol i kloroform organska su otapala koja denaturiraju proteine i omogućuju njihovo taloženje, dok se nukleinske kiseline zadržavaju u vodenoj fazi. Poznato je da kloroform stabilizira fenol, a osim što denaturira proteine, omogućuje i uklanjanje lipida te ekstrakciju zaostalog fenola. Mnogi protokoli uključuju i dodatak izoamilnog alkohola koji sprečava pjenjenje.

Za uklanjanje soli, kao i koncentriranje nukleinskih kiselina u otopinama nakon organske izolacije, najčešće se koristi ultrafiltracija preko kolone kao alternativna metoda taloženja etanolom (42). Nedostatak organske metode ponajprije leži u toksičnosti organskih otapala, dugotrajnosti postupka, gubicima koji su posljedica prebacivanja faza u nove epruvete, kao i čestom zaostajanju fenola koji inhibira umnažanje DNA metodom PCR (43).

Izolacija pomoću ionskog izmjenjivača Chelex®-a 100 uvedena je u forenzičnu praksu prije dvadesetak godina (44). Kelirajuća zrnca svojim iminodiacetatnim grupama vežu polivalentne metalne ione koji bi kao sastavni dijelovi nukleaza omogućili degradaciju DNA pri visokim temperaturama. Vezanje magnezija kao dvovalentnih kationa omogućuje zaštitu DNA inaktivacijom staničnih nukleaza. Liza stanica provodi

se pri 56°C, kao što je prikazano na Slici 1A. Alkalnost Chelex®-a i visoka temperatura uzrokuju razaranje membrane i denaturaciju staničnih proteina, dok se DNA održava u jednolančanom obliku. Izolacija Chelex®-om često uključuje i dodatak proteinaze K, čija je uloga opisana ranije.

Prednosti su Chelex® metode:

- brzina
- jednostavnost
- ekonomičnost
- nema gubitaka biološkog materijala
- smanjena je mogućnosti kontaminacije
- nema upotrebe toksičnih kemikalija
- zrnca omogućuju vezanje metalnih iona i uklanjanje nekih inhibitora.

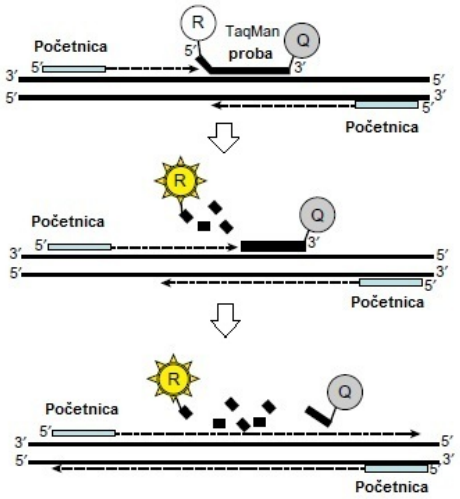
Nedostaci su Chelex® metode:

- ograničeni kapacitet vezanja inhibitora
- često je potrebno uvesti dodatno pročišćavanje uzoraka
- zrnca gube kelirajući kapacitet i nakon nekog vremena otpuštaju vezane inhibitore PCR-a (45).

Navedene tradicionalne metode izolacije osim DNA omogućuju istodobnu izolaciju i inhibitora koji se teško uklanjaju. Organskom izolacijom pomoću fenol-kloroforma ne mogu se ukloniti inhibitori topljivi u vodi kao što su urea i humusne kiseline (46), dvovalentni ioni željeza (47), hematin (44) i komponente fecesa (48). S druge strane, Chelex nije učinkovit pri uklanjanju inhibitora iz krvi (49, 50) i tekstilnih boja (49). To dovodi do nemogućnosti provedbe uspješne analize DNA, stoga je nužno pronaći optimalnu metode izolacije i pročišćavanja problematičnih uzorka koji su vrlo česti u rutinskom radu forenzičnog laboratorija, ali i u drugim područjima istraživanja.

2.3.3 Kvantifikacija humane DNA

Rane metode određivanje koncentracije DNA uključivale su mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm ili fluorescenciju nakon bojenja gela etidijevim bromidom. Mjerenjem apsorbancije određuju se ukupne nukleinske kiseline, a kontaminacija proteinima i fenolom često dovodi do lažno pozitivnog rezultata. Budući da navedene metode nisu dovoljno osjetljive, dugotrajne su i zahtijevaju velike količine često vrlo oskudnih forenzičnih uzoraka (28), bilo je nužno razviti nove metode, od kojih se u forenzičnoj analizi DNA najviše primjenjuje Real-Time PCR ili kvantitativni PCR (qPCR) zbog mogućnosti praćenja ne samo kvantitete već i kvalitete izolirane DNA.



Legenda: "R" - reporter fluorescentna boja**; "Q" –** utišavajuća fluorescentna boja (eng. *quencher*)

Slika 2. Mehanizam nastanka fluorescencije umnožavanjem DNA u stvarnom vremenu (prilagođeno prema literaturnom navodu 28)

Na Slici 2. prikazan je opći mehanizam nastanka fluorescencije tijekom umnažanja nukleinskih kiselina u stvarnom vremenu. Probe TaqMan obilježene su dvjema fluorescentnim bojama različite energije koje specifično hibridiziraju između početnica za PCR u ciljnoj regiji DNA (označene kao "R" i "Q" na Slici 2.) (51). Prijenos energije (*FRET*, eng. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) između fluorescentnih boja moguć je samo ako su boje u blizini, pri čemu dolazi do utišavanja emisije reporter boje. Polimeraza svojom 5' nukleaznom aktivnošću odcjepljuje probu s lanca, povećava

se udaljenost između fluorescentnih boja, čime dolazi do fluorescentne emisije reporter boje (R), koja je direktno proporcionalna broju umnoženih kopija (52). Broj ciklusa umnožavanja u odnosu na logaritam koncentracije u linearnom je odnosu tijekom eksponencijalne faze, stoga se u ovoj fazi i mjeri fluorescencija (53). Pouzdanost metode poboljšana je uvođenjem interne pozitivne kontrole (eng. *Internal Positive Control*, IPC) koja se umnaža istovremeno s lokusom za reverznu transkriptazu humane telomeraze kao ciljnom humanom sekvencom (54). Time se omogućuje razlikovanje negativnih od lažno negativnih odnosno inhibiranih uzoraka, stoga se ova metoda smatra pouzdanom metodom za određivanje koncentracije DNA, kao i za istraživanje inhibicije.

2.3.4 Umnažanje i analiza mikrosatelitnih lokusa

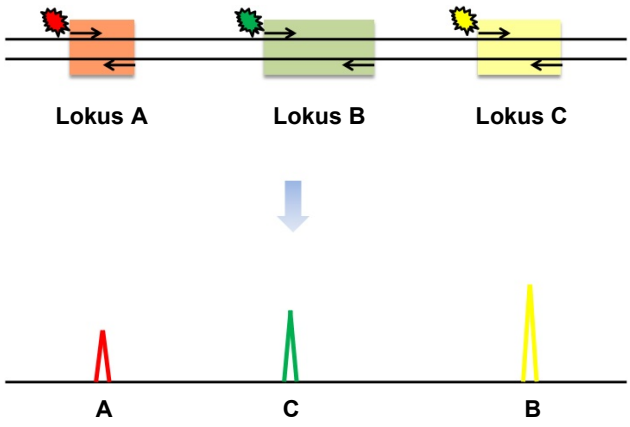
Analiza forenzičnih uzoraka koji često sadrže ograničenu količinu DNA ne bi bila moguća bez umnažanja DNA metodom PCR, čije su prednosti i mane navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Prednosti i nedostaci metode PCR

Prednosti	Nedostaci
• za umnažanje potrebne male količine DNA	• inhibitori djelomično ili u potpunosti onemogućuju umnažanje DNA
• može se koristiti i degradirana DNA	• promjena u sekvenci za vezanje početnica može onemogućiti umnažanje DNA
• može se istovremeno umnažati više specifičnih sljedova u DNA u velikom broju kopija ("multipleks PCR")	• postoji mogućnost kontaminacije drugim tragovima
• koriste se početnice specifične za humanu DNA, pa nema umnažanja DNA iz stranog izvora	

(prilagođeno prema literaturnom navodu 28)

Kao što je ranije spomenuto, prisustvo inhibitora i degradacija DNA otežava analizu jer dovodi do nemogućnosti umnažanja ili smanjenja osjetljivosti umnažanja većih alela određenih lokusa (28). Razvoj komercijalno dostupnih setova za istovremeno umnožavanje više specifičnih regija DNA (eng. *Multiplex PCR*) znatno je ubrzao i pojednostavnio forenzičnu analizu DNA (Slika 3). Po jedna početnica u paru početnica obilježena je odgovarajućom fluorescentnom bojom (5-FAM, JOE, NED, PET ili VIC), dok je interni standard obilježen fluorescentnom bojom – ROX odnosno LIZ. Umnoženi obilježeni mikrosatelitni lokusi razdvajaju se kapilarnom elektroforezom prema veličini i fluorescentnim bojama kojima su obilježeni, što se detektira kao plava, zelena, crvena odnosno žuta boja. Podaci se analiziraju računalnim programom koji uspoređuje umnožene alele sa standardom svih poznatih alela prisutnih u populaciji za određeni lokus STR. U konačnici se dobiva elektroferogram, odnosno DNA profil kao kombinacija pojedinačnih genotipova lokusa STR, pri čemu se svakom od alela automatski pridodaje internacionalna brojčana oznaka. Brojevi dodijeljeni svakom alelu označuju broj ponavljanja kratkih ponavljajućih sljedova u određenom lokusu za pojedini alel. Na primjer, alel 6 u lokusu TH01 predstavlja šest tetranukleotidnih ponavljanja slijeda AATG (55).



Legenda: Tri seta fluorescentno obilježenih početnica označena strelicama istovremeno umnožavaju lokuse STR (A, B i C), koji se potom razdvajaju na temelju veličine; prilagođeno prema literaturnom navodu 28.

Slika 3. Shematski prikaz multipleks PCR-a

Za uspješnu genotipizaciju važna je i kvaliteta umnožene DNA, koja se može pratiti analizom visine pikova (eng. *Peak Height*, PH) kao i omjera visine pikova (eng. *Peak Height Ratio*, PHR) u svakom pojedinom lokusu STR. Ravnoteža pikova heterozigotnog lokusa (PHR) omjer je visine pikova najmanjeg i najvećeg alela. Izražen je kao postotak, pri čemu 100% predstavlja savršenu ravnotežu pikova. Definirane su i preporuke koje određuju kvalitetu DNA od strane organizacije ENFSI (engl. *European Network of Forensic Science Institutes*). Stoga, da bi se određeni uzorak smatrao uzorkom dobre kvalitete, vrijednosti PH trebaju biti od 1000 do 2000 RFU (eng. R*elative Fluorescence Units*), a PHR heterozigotnih lokusa >60% (56, 57).

2.4 Inhibitori umnažanja humanih mikrosatelitnih lokusa

Iako je sadržaj inhibitornih spojeva u uzorcima izuzetim s mjesta događaja uglavnom nepoznat, poznavanje podloge s koje je uzorak izuzet, kao izvora potencijalnih inhibitora, može olakšati analizu DNA. Inhibitori mogu utjecati na lizu stanice, koja je nužna za uspješnu izolaciju DNA, degradaciju nukleinskih kiselina, ali i na inihibiciju polimerazne aktivnosti, čime onemogućuju umnažanje ciljne DNA (58).

Do danas su poznata tri moguća mehanizma kojima inhibitori utječu na umnažanje, a to su vezanje na DNA polimerazu, interakcija s kalupom DNA ili s DNA polimerazom u fazi produživanja početnica (2). Osim vezanja na DNA inhibitori mogu degradacijom odnosno kompeticijom utjecati na DNA, početnice, nukleotide, magnezijeve ione ili DNA polimerazu kao sastavne dijelove reakcijske smjese (59). Prisustvo inhibitora kao interferirajućih spojeva direktno utječe na uspješnost PCR-a, a pojedini inhibitori utječu na umnažanje PCR-om već u jako malim količinama (60). Pojedini sastojci krvi kao što su hematin (61), laktoferin (62) i imunoglobulin G (63), kao i dodani antikoagulansi (heparin) (64) poznati su inhibitori. Prirodni inhibitori postoje i u drugim biološkim materijalima kao pigment melanin iz kose i kože (65), kolagen iz tkiva i kosti (66) odnosno keratin iz kose (67).

Osim inhibitora prisutnih u biološkom materijalu, koji su predmet analize u forenzičnim laboratorijima, dobro su poznati inhibitori koji zbog izloženosti biološkog materijala okolišnim uvjetima onemogućuju analizu DNA. Najpoznatiji među njima su

humusna i fulvinska kiselina iz zemlje te taninske kiseline iz drva (58). Forenzični biološki uzorci mogu sadržavati i različite tekstilne boje, od kojih je najčešća indigo boja, ali i toksične spojeve kao što je fenol (68). U tablici 2. navedeni su dosad istraživani inhibitori.

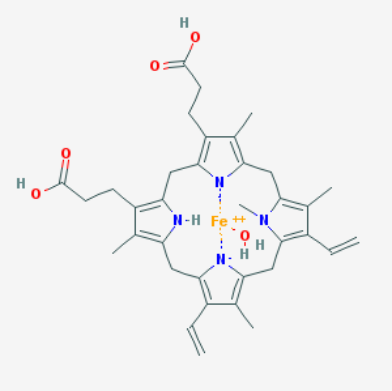
Tablica 2. Istraživani inhibitori PCR-a

Inhibitori	Potencijalni izvor inhibitora	Literaturni navod
Hematin	krv	2, 69–72
Imunoglobulin G	krv	63
Laktoferin	krv	72
Melanin	kosa i tkivo	2, 65
Kolagen	tkivo i kosti	73, 74
Mioglobin	mišićno tkivo	75
Keratin	kosa	67
Ioni kalcija	kosti	2, 72, 76
Humusne tvari (humusne i fulvinske kiseline)	zemlja	2, 36, 46, 47, 77–83
Polisaharidi	izmet, biljni materijal, zemlja	46, 84, 85
Indigo boja	tekstil	2, 86
Urea	urin	87
Žučne soli	urin	47, 72
Taninske kiseline	biljni materijal	2, 47, 88
Fenol	organska ekstrakcija DNA	43

2.4.1 Hematin

Tragovi krvi najčešći su biološki tragovi koji se analiziraju u forenzičnim laboratorijima, a ujedno predstavljaju i problematične tragove s obzirom na to da sadrže brojne inhibitore, među kojima je najistaknutiji hematin.

Hematin je porfirinski spoj koji nastaje kao jedan od produkata razgradnje hemoglobina. Ima sposobnost keliranja metalnih iona (2), a struktura mu je prikazana na Slici 4. Poznato je da nije topljiv u vodi pri neutralnoj vrijednosti pH, ali je dobro topljiv u alkalnim otopinama kao što je NaOH (89).



(preuzeto iz literaturnog navoda 90)

Slika 4. Kemijska struktura hematina

S obzirom na to da Chelex®100 ima ograničen kapacitet vezanja, tijekom izolacija preobilnih tragova krvi (> 3µl pune krvi) može doći do inhibicije PCR-a (91). Ranije je objavljeno da organska izolacija DNA iz tragova krvi rezultira dovoljnom koncentracijom DNA za forenzičnu analizu, ali DNA nije uvijek i umnožena upravo zbog prisustva hematina (92). Do sada objavljeni podaci o inhibicijskom učinku hematina pokazuju da koncentracija od 14 µM ne utječe na rezultate qPCR-a iako se s povećanjem koncentracije hematina efikasnost smanjuje tako da je potpuna inhibicija vidljiva kod koncentracije od 40 µM (93).

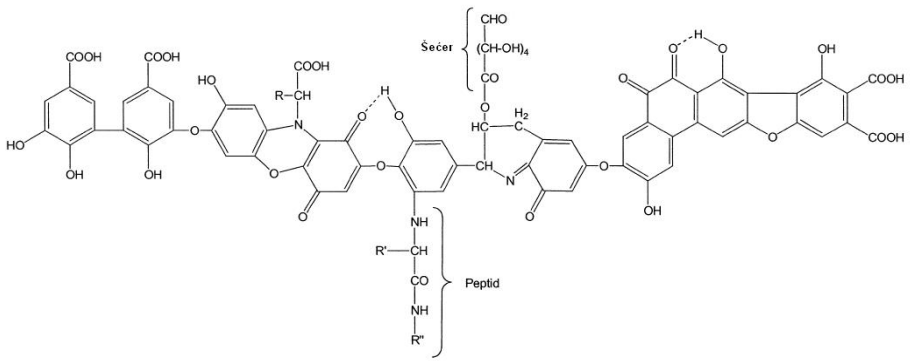
Koncentracija hematina od 24 µM pokazuje inhibiciju umnožavanja mikrosatelitnih lokusa setom SGM Plus (91). Unatoč brojnim objavljenim radovima, inhibitorni učinak krvi na umnažanje DNA još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Novija istraživanja povezuju ga s inaktivacijom DNA polimeraze i/ili degradacijom DNA i početnica (94). Smatra se da se hematin izolira zajedno s nukleinskim kiselinama, veže na Taq DNA polimerazu i time utječe na njezinu aktivnost, ali i na produljenje početnica (2, 61). U konačnici, analiza uzoraka DNA koji sadrže povećanu koncentraciju

hematina, rezultira djelomičnim DNA profilom, odnosno nemogućnošću umnažanja većih alela određenih lokusa (D2S1338, D18S51, FGA) (1).

2.4.2 Humusne tvari

Humusne tvari spadaju u najistraživanije inhibitore PCR-a u posljednjih dvadesetak godina. Zbog svoje složene kemijske strukture onemogućavaju analizu mikrobne DNA iz tla, analizu DNA iz humanih skeletnih ostataka zakopanih u tlu, kao i tjelesnih tekućina koje zaostaju na tlu na mjestu događaja. Forenzični biološki materijal često zaostaje na/u tlu kao posljedica počinjenja kaznenog djela, što humusne tvari svrstava u jedan od glavnih inhibitora koji potječu iz okoliša.

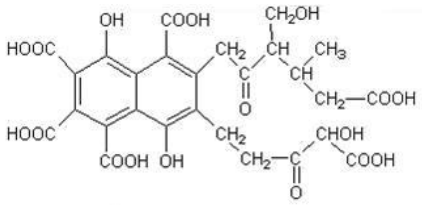
Humusne tvari u literaturi su opisane kao visokomolekularne amorfne organske tvari, žute do crne boje. Smjesa su polifenola koji nastaje razgradnjom organskih tvari, a sastoje se od polimeriziranih produkata kao što su humusne kiseline, fulvinske kiseline i humin kao tri frakcije različite topljivosti (47, 95). Značajke su humusnih tvari strukturna heterogenost, mogućnost vezanja metalnih iona, kao i vezanja brojnih organskih spojeva (79). Zbog njihove heterogenosti nije moguće odrediti njihovu jedinstvenu molekularnu strukturu, ali s obzirom na poznate strukturne komponente, predloženi su strukturni modeli humusnih kiselina (Slika 5) i fulvinskih kiselina (Slika 6). Humusne kiseline predstavljaju glavnu komponentu humusnih tvari i tvore smjesu različitih kiselina koje sadrže brojne karboksilne i fenolatne grupe.



(preuzeto iz literaturnog navoda 96)

Slika 5. Kemijska struktura humusnih kiselina iz tla

Humusne i fulvinske kiseline iz tla izoliraju se koristeći jaku bazu, a za razliku od njih, humin se ne može izolirati niti jakom kiselinom niti jakom bazom (95). Humusne kiseline topljive su pri vrijednosti pH=9, dok su fulvinske kiseline topljive pri vrijednostima pH=2 i pH=9 (97).



(preuzeto iz literaturnog navoda 98)

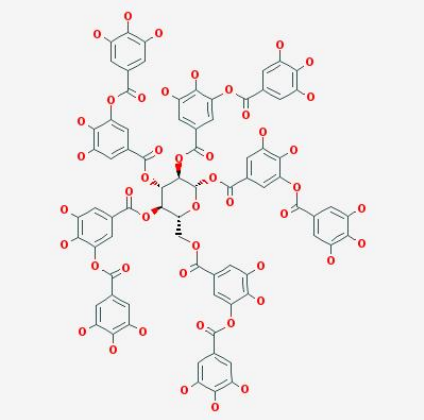
Slika 6. Kemijska struktura fulvinskih kiselina

Omjer humusnih i fulvinskih kiselina razlikuje se s obzirom na vrstu tla, a iz literature je poznato da tresetna tla karakterizira izrazito visoki udio humusnih tvari (95, 99). S obzirom na to da su humusne tvari iz zemlje složena smjesa polifenola, nemaju specifični apsorpcijski maksimum u ultravioletnom (UV) niti u vidljivom dijelu spektra. Humusne tvari u tlu mogu se odrediti pomoću Folin-Ciocalteauovog fenolnog reagensa i galne kiseline kao standarda (100-102). Kolorimetrijska reakcija temeljena je na kemijskoj redukciji reagensa u alkalnoj otopini i oksidaciji fenolnih grupa, pri čemu nastaje plavo obojenje (102).

Dosadašnje spoznaje govore da tragovi humusnih tvari (humusne kiseline>0,1ng/µl; fulvinske kiseline>1ng/µl) dovode do potpune inhibicije i lažno negativnog rezultata PCR-a (36). Dodatak od 10 do 75 ng sintetske humusne kiseline inhibira, dok 100 ng u potpunosti inhibira qPCR (80). Koncentracija od 40 ng/µl inhibitorna je za umnožavanje mikrosatelitnih lokusa koristeći set SGM Plus (103). Pretpostavlja se da fenolne grupe humusnih tvari denaturiraju biološke molekule vezanjem na amide ili oksidiraju do forme kinona i potom se kovalentno vežu na DNA ili proteine (58). Istraživanja provedena 2010. godine pokazala su da se humusne kiseline vežu na DNA i time inhibiraju umnažanje DNA metodom PCR (2).

2.4.3 Tanini

Tanini su skupina prirodnih spojeva rasprostranjena u biljnom svijetu. Nalaze se u svim vrstama drva, a posebno u drvu kritosjemenjača, u koje spada i bukva (*Fagus syvaltica)* kao najrasprostranjenije šumska vrsta drveća u Hrvatskoj (105). Složeni su spojevi tamne boje, koji pokazuju dobru topljivost u vodi, a u kombinaciji s proteinima kože kolagenom formiraju tamnosmeđe obojenje i koriste se u procesu poznatom pod nazivom štavljenje kože (104). Koncentracija tanina, kao složenih biljnih polifenola, također se može odrediti Folin-Ciocalteauovim reagensom. Kao standard za određivanje koncentracije tanina najčešće se koristi komercijalno dostupna taninska kiselina (Slika 7). Taninska kiselina jest smjesa tanina otpornih na kemijsku i biološku degradaciju, za razliku od humusnih i fulvinskih kiselina koje nastaju razgradnjom biljnog materijala (47).



(preuzeto iz literaturnog navoda 106)

Slika 7. Kemijska struktura taninske kiseline

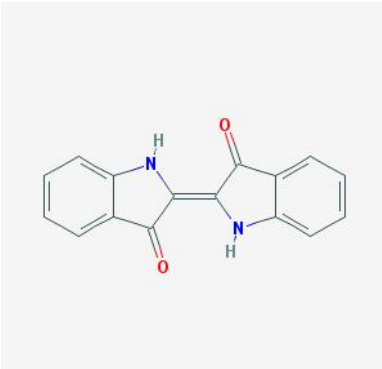
S obzirom na to da se forenzični biološki uzorci često mogu naći na biljnom materijalu kao i na predmetima izrađenim od kože, od posebne je važnosti ukloniti taninsku kiselinu kao poznati inhibitor Taq polimeraze (88). Njezin inhibicijski učinak direktno je ovisan o koncentraciji prisutnih tanina, s tim da je potpuna inhibicija vidljiva pri koncentracijama većim od 1,4ng TA u 25µl reakcijske smjese za PCR (88).

Mehanizam djelovanja taninske kiseline povezan je s brojnim elektronegativnim grupama koje mogu vezati magnezijeve ione i time onemogućiti aktivnost Taq polimeraze, ali i uz mogućnost oksidacije u kinonsku formu i kovalentnog vezanja na Taq polimerazu (2, 88).

2.4.4 Indigo

Indigo je organski spoj koji predstavlja najčešći izvor plavog pigmenta (Slika 8). Kao jedna od najstarijih tekstilnih boja, indigo se koristio za bojenje odjeće još u starom Egiptu (107). Prvotno se izolirao iz različitih biljnih vrsta, a u današnje vrijeme proizvodi se sintetski. Najpoznatija je tekstilna boja za bojenje trapera, pri čemu je nijansa plavog trapera određena količinom indigo boje (108).

Indigo je tamnoplavi prah, netopljiv u vodi, a dobru topljivost pokazuje u jako polarnim otapalima u kojima čini plavu otopinu (86).



(preuzeto iz literaturnog navoda 109)

Slika 8. Kemijska struktura indiga

Kod brojnih kaznenih djela, kao što su primjerice silovanja, tragovi tjelesnih tekućina (sjemena tekućina, krv i slina) mogu se naći na odjeći od plavog trapera te se indigo boja može izolirati zajedno s genomskom DNA i time onemogućiti umnožavanje lokusa STR (110, 111). Mehanizam inhibitornog djelovanja indiga, kao i ostalih tekstilnih boja, još nije objašnjen u literaturi. Opel i suradnici pokazali su da plava boja koja zaostaje nakon izolacije DNA dovodi do neprecizne kvantifikacije DNA metodom qPCR

(2). Problem leži u činjenici da je mehanizam djelovanja zasad nemoguće odrediti metodom qPCR, što je vjerojatno posljedica međudjelovanja plave boje sa sastojcima reakcijske smjese (2).

2.4.5 Metode uklanjanja inhibitora umnažanja mikrosatelitnih lokusa

Dosada opisani inhibitori nastoje se ukloniti pomoću dvaju pristupa. Prvi pristup odnosi se na pročišćavanje uzoraka nakon provedene izolacije DNA, a prije umnožavanja DNA metodom PCR. Filtracija i razrjeđivanje inhibiranih uzoraka brze su i jednostavne metode, koje se često primjenjuju. Razrjeđivanjem uzorka smanjuje se koncentracija inhibitora, ali i koncentracija DNA u uzorku, čime se često onemogućuje uspješna analiza DNA. Postupkom filtracije ekstrakt se zajedno s vodom ili puferom propušta kroz filtar koji omogućuje zadržavanje većih molekula kao što je DNA, a prolazak manjih molekula (inhibitora). Za pročišćavanje forenzičnih uzoraka ultrafiltracijom često se koristi Centricon 100® (preimenovan u Amicon 100K od strane proizvođača - Millipore, Billerica, SAD). Ovim načinom pročišćavanja može doći do gubitka degradirane DNA, ali i zbog vezanja DNA na membranu. Metoda se koristi za uklanjanje hematina, ali i za koncentriranje nukleinskih kiselina (70).

Drugi pristup temelji se na inaktivaciji ili blokiranju aktivnosti inhibitora tijekom umnažanja metodom PCR, i to najčešće dodatkom goveđeg serumskog albumina (*eng.* Bovine Serum Albumin, BSA) i gp32 proteina koji se veže na jednolančanu DNA (47). Poznato je da BSA sprečava inhibiciju hemoglobinom (61, 63), fenolom (43), proteazama (111), sastojcima ljudskih kostiju (112) i tekstilnim bojama (91). Pretpostavlja se da BSA može smanjiti ili spriječiti inhibiciju tijekom PCR-a, najvjerojatnije vezanjem na inhibitore. Zbog navedenih je razloga BSA uključen u sastav komercijalno dostupnih setova za PCR, a u istu svrhu koriste se i neionski detergenti kao što su Tween 20 i Triton X-100 (91, 113, 114).

U literaturi se navodi da se odvajanje DNA od humusnih tvari iz tla provodi pročišćavanjem pomoću polivinilpolipirolidona (PVPP) ili polivinilpirolidona (PVP) preko Sephadex kolone (115, 116) ili dodatkom aluminij sulfata, koji sprečava izolaciju inhibitora iz tla zajedno s DNA (117). U 2011. godini objavljen je i rad u kojem se PVPP

zajedno s aktivnim ugljenom u prahu primjenjuje za uklanjanje humusnih tvari, što omogućuje uspješnu izolaciju metogenomske DNA iz tla (118).

Osim navedenog, inhibicija se nastoji izbjeći uvođenjem novih termostabilnih polimeraza (59, 71, 83, 94, 119), ali i optimizacijom pufera za DNA polimeraze (120). Razvijaju se i novi komercijalno dostupni setovi za umnažanje DNA, poboljšanog sastava pufera, povećane osjetljivosti, koji omogućuju umnažanje većeg broja lokusa (npr. NGM set) (120).

2.4.6 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije inhibitora

Spektroskopija u ultravioletnom i vidljivom dijelu spektra (UV/VIS spektroskopija) jest metoda koja prati "ponašanje" uzroka koji je izložen svjetlosti. Identifikacija materijala na temelju njegova obojenja vjerojatno je bila jedna od najranijih primjena apsorpcijske spektrofotometrije, a kvantitativno određivanje intenziteta obojenja najranija primjena apsorpcijske spektroskopije (121). Prolaskom svjetlosti kroz uzorak dio se svjetlosti apsorbira, a preostali dio prolazi kroz uzorak. Prema Lambert-Beerovom zakonu, apsorbirana energija pri određenoj valnoj duljini funkcija je koncentracije tvari koja apsorbira energiju (42). Kvantitativno određivanje molekula koje sadrže kromofore provodi se mjerenjem apsorbancije. Koncentracija nepoznatog uzorka najčešće se određuje metodom linearne regresije iz standardne krivulje (121). Iako je u forenzičnoj analizi DNA ova metoda kvantifikacije DNA napuštena upravo zbog prisustva brojnih obojenih tvari koje onemogućuju točnu kvantifikaciju, koncentracija i čistoća nukleinskih kiselina i danas se u brojnim biološkim laboratorijima određuje mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini λ=260 nm, odnosno mjerenjem omjera apsorbancija (A_{260}/A_{280}). Porfirinski spojevi imaju karakteristični apsorpcijski maksimum pri λ=400nm. Humusne tvari nemaju karakteristični apsorpcijski maksimum, ali zbog kromofora fenolnog tipa apsorbiraju pri λ=260-270nm (122), dok tanini, koliko je poznato, ne pokazuju specifični apsorpcijski spektar (123). Obojenje uzorka može ukazivati na prisustvo inhibitora u forenzičnim biološkim uzorcima, stoga se

spektrofotometrija čini kao prikladna metoda za određivanje koncentracije inhibitora u forenzičnim biološkim uzorcima (61).

2.5 Aktivni ugljen (AU)

Adsorpcija je kemijski proces u kojem se tvar (adsorbat) prisutna u tekućoj ili plinovitoj fazi uklanja nakupljanjem na graničnoj površini između te faze i druge najčešće krute faze (adsorbens). Aktivni ugljen (AU) najpoznatiji je adsorbens, koji se koristi od davnina. U medicinske svrhe upotrebljavao se još u starom Egiptu. Danas ima brojne primjene – od pročišćavanja zagađenog tla, otpadnih voda i voda za piće, ispušnih plinova, za uklanjanje toksina i otrova, ali i za pročišćavanje krvi (123, 124). Najčešće se primjenjuje u obliku praha (eng. *Powdered Activated Carbon*, PAC) i granula (eng. G*ranular Activated Carbon*, GAC). Aktivni ugljen u prahu (PAC) čine čestice veličine oko 44μm, koje osiguravaju bržu adsorpciju za razliku od GAC-a koji karakteriziraju čestice veličine od 0,6 do 4,0 mm. Priprema se pirolizom karboniziranog materijala i aktivacijom, kojom se osigurava najveći mogući broj nasumičnih pora različite veličine i oblika, a time i iznimno velika površina za adsorpciju (800–1500 m^2/g). Jedna od najstarijih i najraširenijih primjena AU-a jest obezbojenje otopina, pri čemu se odgovarajuća količina PAC-a dodaje u otopinu koja se obezbojava, a zatim se PAC izdvaja iz otopine filtracijom ili centrifugiranjem. Pročišćavanje se obično provodi pri sobnoj temperaturi jer se s povećanjem temperature smanjuje efikasnost obezbojenja aktivnim ugljenom. Adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena određen je poroznom strukturom odnosno fizikalnim svojstvima, ali i kemijskom strukturom njegove površine. Tako efikasnost obezbojenja osim prirode aktivnog ugljena određuju i vrijednost pH kao i priroda uzorka (123). Poroznost aktivnog ugljena određena je udjelom mikropora (dijametar, d<2nm), mezopora (2<d<50nm) i makropora (d>50nm), pri čemu velik udio mikropora odgovara velikom adsorpcijskom kapacitetu malih molekula, dok prisustvo mezopora i makropora korelira s kapacitetom vezanja većih molekula kao što su humusne tvari (125).

Ranije je objavljeno da pore na površini aktivnog ugljena adsorbiraju komponente krvi, humusne i fulvinske kiseline, taninske kiseline, metalne ione, tekstilne boje, pa čak i plazmidna DNA veličine do 400 pb (124–130). Kao što je navedeno, aktivni ugljen kao inertni materijal ima moć adsorpcije aromatskih, polifenolnih spojeva, tekstilnih boja i drugih složenih spojeva koje nalazimo i u forenzičnim biološkim uzorcima, stoga je u ovom istraživanju aktivni ugljen u prahu primijenjen u pročišćavanju uzoraka koji sadrže spomenute spojeve kao poznate inhibitore.

EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

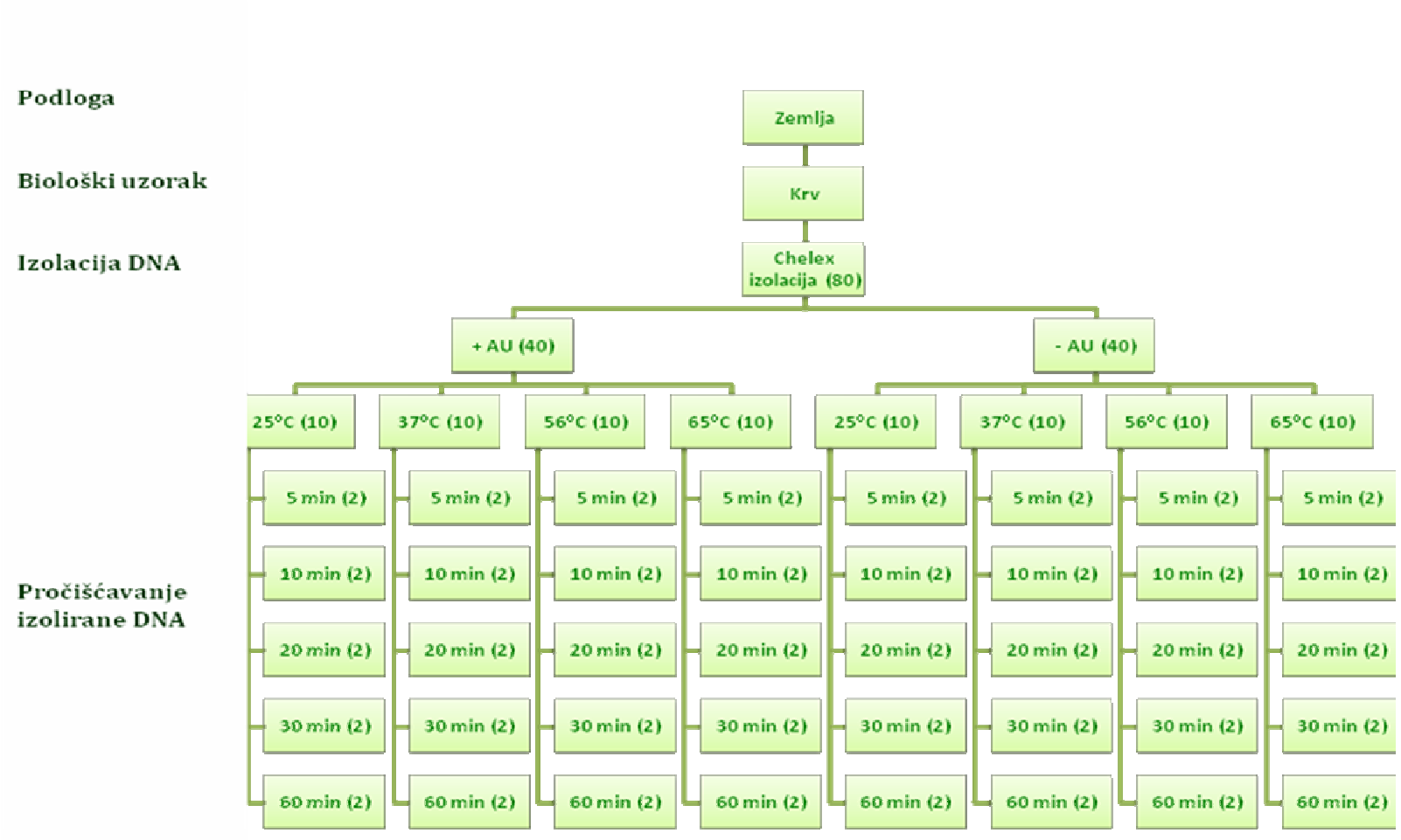
U prvom dijelu istraživanja istraženi su uvjeti temperature i vremena adsorpcije aktivnim ugljenom (Slika 9). Cilj je postići potpunu inhibiciju, odrediti optimalne uvjete pročišćavanja aktivnim ugljenom, koji će se potom primijeniti za pročišćavanje bioloških uzoraka krvi i epitela pet ispitanika nanesenih na različite podloge (zemlja, drvo i traper). Uspoređeno je pročišćavanje aktivnim ugljenom i komercijalno dostupnom kolonom za ultrafiltraciju (Amicon) s pripadajućim kontrolama bez pročišćavanja, što je prikazano na Slici 10A. Utjecaj komponenti podloga kao potencijalnih inhibitora istražen je uključivanjem uzoraka krvi i epitela bez podloga (Slika 10B).

3.2 Metode

3.2.1 Priroda i adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena

Proizvođač (Pliva, Zagreb, Hrvatska) nije naveo karakteristike aktivnog ugljena kao što su veličina čestica i poroznost o kojima ovisi njegov adsorpcijski kapacitet, stoga je površina aktivnog ugljena snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (Mira 3 HV FEG, Tescan, SAD).

Potom je proveden test adsorpcijskog kapaciteta aktivnog ugljena kao što je prethodno objavljeno, uz određene promjene (129). U epruvete s prethodno izvaganih 5mg AU dodano je 10µl tinte (TOZ, Zagreb, Hrvatska) i 990µl vode. Također je 10µl tinte otopljeno u 445µl vode i 445µl 5%-tnog Chelexa 100 (Biorad, Hercules, SAD), kao reagensa za izolaciju DNA visoke vrijednosti pH, te dodano na 5mg aktivnog ugljena. Svaki uzorak bio je uspoređen s pripadajućom kontrolom bez aktivnog ugljena. Inkubacija je provedena pri sljedećim temperaturama: 25°C, 37°C, 56°C i 65°C, u trajanju od 30 minuta. Uzorci su potom centrifugirani 5 minuta na 14000 okr/min i fotografirani.



Legenda: **"+ AU"** – s dodatkom aktivnog ugljena,**"- AU"** – bez dodatka aktivnog ugljena (u zagradama je naveden broj kopija uzoraka)

Slika 9. Shematski prikaz optimizacija pročišćavanja aktivnim ugljenom



Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon, **"BP"** – bez pročišćavanja.
(u zagradama je naveden broj kopija uzoraka po jednom ispitaniku)

Slika 10. Shematski prikaz pročišćavanja bioloških uzoraka

3.2.2 Test adsorpcije u ovisnosti o temperaturi i vremenu

Aktivni ugljen primijenjen je za određivanje optimalnih uvjeta pročišćavanja genomske DNA u uzorcima pripremljenim na sljedeći način.

Treset kao zemljana podloga (Finvest, Bosansko Grahovo, Bosna i Hercegovina) prosijan je kroz sito, usitnjen pomoću tekućeg dušika i homogenziran mikserom. Aktivni ugljen i zemlja dekontaminirani su izlaganjem UV svjetlu energije <1 J/cm^2/30 min. U svaku označenu epruvetu izvagano je po 1mg zemlje. Krv (20µl) je nanesena na prethodno izvaganu zemlju te je metodom Chelex izolirana genomska DNA kako slijedi. Uzorci su otopljeni u 1ml autoklavirane destilirane vode, a potom centrifugirani 3 min/10000 okretaja. Supernatant je uklonjen, a na talog dodano 150µl 5%-tnog Chelexa (Biorad, Hercules, SAD) vorteksirano i dodano 5µl 10%-tne proteinaze K (Merck, Darmstadt, Njemačka). Nakon vorteksiranja uzorci su inkubirani na 56°C/90 min. Denaturacija je provedena pri temperaturi od 100°C/8min. U svaku označenu epruvetu s prethodno izvaganim AU (2mg) prebačeni su supernatanti te su, nakon vorteksiranja, uzorci u duplikatu inkubirani pri sljedećim temperaturama: 25°C, 37°C, 56°C i 65°C, i vremenima inkubacije: 5, 10, 20, 30 i 60 minuta, kao što je prikazano na Slici 9. U eksperimente su u duplikatu uključene pripadajuće kontrole bez pročišćavanja, zatim pozitivna kontrola (uzorci krvi bez zemlje), kao i negativna kontrola (uzorci zemlje bez humane krvi). Uzorci su centrifugirani 5 min/14000 okretaja, a supernatanti su potom prebačeni u novu epruvetu. Koncentracija humane DNA određena je qPCR metodom (opisano u poglavlju 3.2.6.) te je provedeno umnažanje mikrosatelitnih lokusa i detekcija alela mikrosatelitnih lokusa kao što je opisano u poglavlju 3.2.7. i 3.2.8.

Koncentracija hematina mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini λ=400nm, a humusne i taninske tvari određene su pomoću FCR i mjerene pri valnoj duljini λ=765nm, kao što je opisano u poglavlju 3.2.9. Indigo iz tamnoplavog trapera sniman je u cijelom području mjerenja (λ=190-1100nm).

3.2.3 Priprema bioloških uzoraka

Površine za rad dekontaminirane su 10%-tnim NaOCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 20%-tnim etanolom, dok je pribor očišćen 70%-tnim etanolom (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i izložen UV-C svjetlu energije <1 J/cm^2 u trajanju od 30 minuta (UVC 500 Ultraviolet Cross-linker, Hoefer, San Francisco, SAD). Svi uzorci pripremljeni su u tri kopije i izuzimani direktnim uzorkovanjem s ciljem postizanja inhibicije umnažanja metodom PCR bez gubitaka DNA (Slika 10A).

Za sve eksperimente koristile su se sljedeće mase odnosno površine podloga: 1mg zemlje, 1cm^2 drveta i 4cm^2 tamnoplavog trapera. Zemljana podloga (Finvest, Bosansko Grahovo, Bosna i Hercegovina) pripremljena je kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Sve podloge bile su izložene UV-C svjetlu energije <1 J/cm^2 u trajanju od 30 minuta (UVC 500 Ultraviolet Cross-linker - Hoefer, San Francisco, SAD). Periferna krv pet osoba prethodno je vorteksirana te je po 20µl krvi svake osobe naneseno na pripremljene podloge i potom osušeno preko noći na zraku pri sobnoj temperaturi.

Sterilni papirnati štapići (Whatman International Ltd., Maidstone, Velika Britanija) bili su izloženi bukalnom epitelu u trajanju od 1 minute. Osušeni papirnati štapići zatim su bili prebačeni u epruvete sa zemljom. Drvo (J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Njemačka) i traper (Amadeus jeans, Zagreb, Hrvatska) bili su izloženi epitelu pet osoba u trajanju od 5 minuta, osušeni i prebačeni u označene epruvete. U eksperiment su uključeni i uzorci bez navedenih podloga (Slika 10B).

3.2.4 Izolacija genomske DNA

3.2.4.1 Izolacija Chelexom

Pripremljeni uzorci krvi na podlogama (zemlja, drvo i tamnoplavi traper), uzorci epitela na zemlji kao i uzorci krvi odnosno epitela bez navedenih podloga otopljeni su kroz 30 minuta u 1ml autoklavirane destilirane vode. Potom su centrifugirani

3min/10000 okretaja, supernatant je uklonjen, a na talog (30µl) dodano je 150µl 5%-tnog Chelexa (Biorad, Hercules, SAD) i 5µl 10%-tne proteinaze K (Merck, Darmstadt, Njemačka) ili više ovisno o veličini podloge (proporcionalno volumenu Chelexu povećava se i volumen dodane proteinaze K u omjeru 30:1). Na uzorke epitela na drvu i traperu zbog oskudnosti biološkog materijala bez otapanja dodano je 150µl 5%-tnog Chelexa i 5µl 10%-tne proteinaze K ili više ovisno o veličini podloge. Nakon vorteksiranja uzorci su inkubirani na 56°C/90 min. Denaturacija je provedena na temperaturi od 100°C/8 min. Uzorci na krutim podlogama (drvo, traper i papirnati štapić) prebačeni su u mrežicu za odvajanje podloge od supernatanta (DNA IQ Spin Baskets; Promega, Madison, SAD) 3min/10000 okretaja. Supernatant je potom prenesen u novu označenu epruvetu.

3.2.4.2 Organska izolacija

Uzorci krvi na podlogama (zemlja, drvo i traper), uzorci epitela na zemlji, kao i uzorci krvi i epitela bez navedenih podloga otopljeni su u 1 ml autoklavirane destilirane vode 30 minuta. Potom su centrifugirani 3 min/10000 okretaja te je uklonjen supernatant. Na talog je dodano 500µl ekstrakcijskog pufera, 20µl proteinaze K (Merck, Darmstadt, Njemačka) i 10µl DTT-a (Merck, Darmstadt, Njemačka). Uzorci su inkubirani preko noći na temperaturi od 56°C. Na uzorke epitela na drvu i traperu zbog oskudnosti biološkog materijala bez otapanja je dodano 500µl ekstrakcijskog pufera, 20µl proteinaze K i 10µl DTT-a. U sve uzorke dodano je još 20µl proteinaze K (Merck, Darmstadt, Njemačka) i 10µl DTT-a (Merck, Darmstadt, Njemačka) te je inkubirano 8 sati na 56°C. Uzorci na krutim podlogama (drvo, traper i papirnati štapić) prebačeni su u mrežicu za odvajanje podloge od supernatanta (DNA IQ Spin Baskets, Promega, Madison, SAD) i centrifugirani 3min/10000 okretaja dok su uzorci naneseni na zemlju bili centrifugirani bez mrežice. Supernatant je potom prenesen u novu označenu epruvetu, dodano je 500µl smjese fenol/kloroform/izoamilnog alkohola (25:24:1) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) i inkubirano 10 minuta uz stalno miješanje. Uzorci su

centrifugirani 3min/10000 okretaja. Nakon što je izdvojena gornja vodena faza, postupak se ponavlja. Zatim je dodano 500µl kloroforma (Merck, Darmstadt, Njemačka) i inkubirano 5 minuta uz miješanje. Slijedi centrifugiranje od 3min/10000 okretaja i izdvajanje vodene faze u novu označenu epruvetu.

3.2.5 Pročišćavanje genomske DNA

3.2.5.1 Ultrafiltracija Amiconom

Izolirani uzorci genomske DNA prebačeni su na Amicon kolonu (Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Ultracel-100K; Millipore, Billerica, SAD). Dodano je 1ml vode i centrifugirano 5min/3000 okretaja. Koncentrat (retentat) izdvojen je u novu označenu epruvetu.

3.2.5.2 Adsorpcija na aktivnom ugljenu

Aktivni ugljen (Pliva, Zagreb, Hrvatska) dekontaminiran je izlaganjem UV-C svjetlu energije <1 J/cm^2 u trajanju od 30 minuta. U svaku je epruvetu izvagano 2mg aktivnog ugljena, u koju se prebacuju izolirani uzorci te se nakon vorteksiranja inkubiraju pri 37°C/60 minuta. Potom slijedi centrifugiranje 5 min/14000 okretaja te se supernatant prebacuje u novu epruvetu. Koncentracija DNA određena je qPCR metodom (poglavlje 3.2.6.), a umnožavanje metodom PCR i detekcija kapilarnom elektroforezom, kao što je opisano u poglavljima 3.2.7. i 3.2.8.

3.2.6 Određivanje koncentracije humane DNA

Određivanje apsolutne kvantifikacije provodi se na aparatu 7500 Real-Time PCR Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA) pomoću Quantifiler®Human DNA Quantification seta (Applied Biosystems, Foster City, SAD) u

ukupnom volumenu od 25μL prema uputama proizvođača (93). U duplikatu se pripremaju standardi radnih koncentracija od 0,023ng/μL do 50ng/μL za izradu standardne krivulje. Negativna kontrola (uzorak bez DNA) i pozitivna kontrola (AmpfISTR Control DNA 007, Applied Biosystems, Foster City, USA) u duplikatu su uključeni u analizu. Uvjeti umnažanja su: 95°C-10'; 95°C-15''; 60°C-1' (40x).

3.2.7 Umnažanje mikrosatelitnih lokusa lančanom reakcijom polimerazom

Umnažanje genomske DNA provedeno je na aparatu GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, SAD) uporabom AmpF/STR® SGM Plus®seta (Applied Biosystems, Foster City, SAD) prema uputama proizvođača u ukupnom volumenu od 25μL (91). Istovremeno se umnaža deset mikrosatelitnih lokusa te amelogenina za određivanje spola obilježenih fluorescentnim bojama (Tablica 3).

Tablica 3. Lokusi STR i njihove osobine

Lokus	Pozicija na kromosomu (gen)	Ponovljena sekvenca	Fluorescentna boja
FGA	4q31.3 (α-fibrinogen, 3. intron)	CTTT	NED
TH01	11p15.5 (tirozin hidroksilaza, 1.intron)	TCAT	NED
vWA	12p13.31 (von Willebrand faktor, 40. intron)	[TCTG][TCTA]	5-FAM
D3S1358	3p21.31	[TCTG][TCTA]	5-FAM
D8S1179	8q24.13	[TCTA][TCTG]	JOE
D2S1338	2q35	[TGCC][TTCC]	5-FAM
D16S539	16q24.1	GATA	5-FAM
D18S51	18q21.33	AGAA	JOE
D21S11	21q21.1	[TCTA][TCTG]	JOE
D19S433	19q12	AAGG	NED
Amelogenin	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	-	JOE

(prilagođeno prema literaturnom navodu 28)

Genomska DNA kao kalup (1ng) umnožena je pri sljedećim uvjetima: 95°C-11'; 94°C-1'; 59°C-1', 72°C-1'; 60°C-45' (28x). U eksperiment je uključena negativna kontrola (uzorak bez DNA) i pozitivna kontrola (Ampf*l*STR Control DNA 007, Applied Biosystems, Foster City, USA).

3.2.8 Detekcija mikrosatelitnih alela

Razdvajanje i analiza umnoženih PCR produkata provodi se pomoću aparata za kapilarnu elektroforezu ABI PRISM 3130*xl* Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Uzorci se za elektroforezu pripremaju na sljedeći način: 1μL uzorka/alelnog standarda, 0,3μL Gene-Scan^{TM}ROX^{TM} internog standarda (Applied Biosystems, Foster City, SAD) dodaje se u 8,7μL deioniziranog formamida (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Smjesa se denaturira 5 minuta na 95°C i zatim 3 minute hladi na ledu. Elektroforeza se provodi pri uvjetima injekcije od 3kV/20 sek.

3.2.9 Spektofotometrijsko određivanje koncentracije inhibitora

Spektrofotometrijski je određena koncentracija:

- hematina u izoliranim uzorcima krvi, uzorcima krvi nanesenim na zemlju, drvo i traper
- humusnih tvari u izoliranim uzorcima krvi i epitela na zemlji
- tanina u izoliranim uzorcima krvi i epitela na drvu te
- apsorpcijski spektri izoliranih uzoraka krvi i epitela na tamnoplavom traperu.

Uzorci i standardi (hematin, galna kiselina i taninska kiselina) mjereni su u triplikatu na instrumentu UV-VIS Spectrometer Lambda 25 (Perkin Elmer & Co, Überlingen, Njemačka). Uzorci koji su pokazivali veću apsorbanciju, tj. koncentraciju od najveće koncentracije standarda, razrijeđeni su i ponovno mjereni u istim uvjetima.

Hematin (Promega, Madison, SAD) razrijeđen je deioniziranom vodom do sljedećih koncentracija: 0,2μM do 10μM. Nakon provjere apsorpcijskog maksimuma, iz

standardne krivulje odredila se koncentracija hematina u svakom pojedinom uzorku. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini λ=400 nm u odnosu na slijepu probu (deionizirana voda).

Humusne tvari (HT), kao smjese polifenola u zemlji, određene su pomoću Folin-Ciocalteauovog fenolnog reagensa (FCR) (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Galna kiselina otopljena je deioniziranom vodom do sljedećih koncentracija: 5ng/µl do 250ng/µl. Svakom uzorku/standardu dodano je 0,5ml FCR, deionizirana voda i dobro promiješano. Zatim smo dodali 1,5ml Na_2CO_3 i inkubirali 2 sata na sobnoj temperaturi. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeren je pri valnoj duljini λ=765nm u odnosu na slijepu probu (deionizirana voda) i proporcionalan je koncentraciji ukupnih fenola (101). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (GAE; ng GA/µl).

Koncentraciju tanina, kao polifenola u drvu, mjerili smo pomoću Folin-Ciocalteauovog fenolnog reagensa (FCR) kao što je opisano za humusne tvari. Taninska kiselina (Promega, Madison, SAD) otopljena je u deioniziranoj vodi do sljedećih koncentracija: 0,2ng/µl do 10ng/µl. Rezultati se izražavaju kao ekvivalenti taninske kiseline (TAE; ng TA/µl).

Indigo (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) nije bilo moguće otopiti u vodi niti organskim otapalima kao što su kloroform (Merck, Darmstadt, Njemačka) i diklormetan (Merck, Darmstadt, Njemačka) niti pomoću jakog reduktivnog sredstva kao što je natrijev diotionit (Pliva, Zagreb, Hrvatska). Nije se mogao koristiti kao standard za kvantitativno određivanje indiga u biološkim uzorcima na tamnoplavom traperu kao podlozi. Stoga smo pratili promjenu u apsorpcijskim spektrima pročišćenih i nepročišćenih uzoraka pri valnoj duljini λ=602nm, što je navedeno kao apsorpcijski maksimum indiga prema uputama proizvođača.

3.2.10 Pročišćavanje forenzičnih bioloških uzoraka

Tragovi krvi/epitela pronađeni na materijalu vještačenja pristiglom na biološko vještačenje koji ranijom analizom DNA nisu dali rezultat uzeti su u ponovnu analizu.

Indirektnim uzorkovanjem, tj. vatenim štapićem navlaženim destiliranom vodom brisani su tragovi krvi s drvene palice prethodno obrađene daktiloskopskim reagensom Amido Black, koji se koristi za detekciju krvavih otisaka. Direktnim uzorkovanjem izuzeti su tragovi krvi s plavog i crvenog ručnika, kao i tragovi krvi te eventualni tragovi epitela s drvene palice. Svaki od navedenih uzoraka izuzetih direktnim uzorkovanjem podijeljen je na dva podjednaka dijela. Genomska DNA jednog dijela uzorka izolirana je Chelex metodom, a drugi dio uzorka izoliran je komercijalnim setom Tissue and Hair Extraction (Promega, Madison, SAD) DNA IQ™ Casework Pro Kit za Maxwell® (Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača (131). Izolacija Chelexom provedena je kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.1, osim što se zbog oskudnosti tragova dodavalo 80µl Chelexa (Biorad, Hercules, SAD) i 5µl 10% proteinaze K (Merck, Darmstadt, Njemačka) bez prethodnog otapanja. Uzorci izolirani Chelex metodom pročišćeni su aktivnim ugljenom pri 37°C/60 min, dok su uzorci izolirani komercijalnim setom, pročišćeni pomoću automatiziranog Maxwell®16 sustava. Uzorci su kvantificirani kao što je opisano u poglavlju 3.2.6, a mikrosatelitni lokusi umnoženi su pomoću AmpFlSTR® NGM™ seta (Applied Biosystems, Foster City, SAD) prema uputama proizvođača pri sljedećim uvjetima: 95°C-11'; 94°C-20“; 59°C-3', 72°C-1'; 60°C-10'(29x) (120). Razdvajanje i detekcija umnoženih alela provedeno je prema ranije opisanom protokolu (poglavlje 3.2.8).

3.3 Obrada podataka i statistička analiza rezultata

Program UV WINLAB v2.85.04 (Perkin Elmer, Waltham, SAD) korišten je za obradu rezultata UV-VIS spektrofotometrije. Određena je koncentracija hematina interpolacijom iz standardne krivulje s koeficijentom determinacije, R^2=0,997, dok su koncentracije ukupnih fenola dobivene iz standardne krivulje za galnu kiselinu (R^2=0,999) odnosno taninsku kiselinu kao standarda (R^2=0,998).

Uspješnost pročišćavanja testirana je umnažanjem humane DNA u qPCR-u i PCR-u. Obrada podataka dobivenih metodom qPCR provedena je pomoću programa SDS v1.2 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) prema uputama proizvođača (93). U svakom pojedinom uzorku utvrđeno je prisustvo inhibicije, a koncentracija DNA dobivena je interpolacijom iz standardne krivulje (R^2 >0,995). U daljnju analizu uzeti su uzorci u kojima je qPCR-om ostvarena koncentracija DNA>0,05 ng/µl. Obrada rezultata umnažanja metodom PCR provedena je programom GeneMapper™ID v3.2 (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Kao pozitivan rezultat uzima se DNA profil (elektroferogram) s najmanje šest umnoženih lokusa STR kojima je visina pikova izražena u relativnim jedinicama fluorescencije (eng. *Relative Fluorescence Unit),* RFU>75.

Za usporedbu dvaju parametara proveden je neparametarski t-test (Mann-Whitney U-test). Neparametarska analiza varijance – ANOVA (Kruskal-Wallis test) – koristila se za usporedbu triju parametara, a kod statističke značajnosti pristupalo se Dunnovu testu. Statistička analiza rezultata provedena je programom GraphPad InStat, v3.10 (GraphPad Software Inc., La Jolla, SAD). Vrijednosti P<0,05 smatrale su se statistički značajnim.

U prvom dijelu istraživanja (optimizacija uvjeta pročišćavanja s AU) testiran je utjecaj temperature i vremena adsorpcije na koncentraciju humane DNA, ali i na koncentraciju hematina i humusnih tvari kao inhibitora. Volumen uzoraka normaliziran je, a srednje vrijednosti koncentracija dobivene iz dva nezavisna reproducibilna

mjerenja pri određenim uvjetima pročišćavanja, izraženi su kao udio koncentracije humane DNA i hematina u odnosu na pozitivnu kontrolu (krv). Udio humusnih tvari izražen je u odnosu na negativnu kontrolu (zemlja).

U drugom dijelu istraživanja testiran je utjecaj metode pročišćavanja (aktivni ugljen i Amicon) na koncentraciju humane DNA, ali i na koncentraciju hematina, humusnih tvari i tanina kao inhibitora. Volumen uzoraka normaliziran je, a rezultati dobiveni iz tri nezavisna mjerenja (osim za uzorke bez podloga) izraženi su kao srednje vrijednosti ± standardne devijacije. Koncentracija inhibitora određena je samo za pozitivno kvantificirane i umnožene uzorke.

U daljnjoj analizi testirali smo utjecaj pročišćavanja na kvalitetu DNA. Izračunate su prosječne visine pikova (PH) i omjeri prosječnih visina pikova (PHR), uz uvjet da su umnožena oba alela te da pokazuju visine pikova iznad praga detekcije (>75 RFU). Heterozigotni lokusi u kojima su oba alela u svakom heterozigotnom lokusu umnožena uzimali su se u obzir kod izračuna. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardne devijacije.

REZULTATI

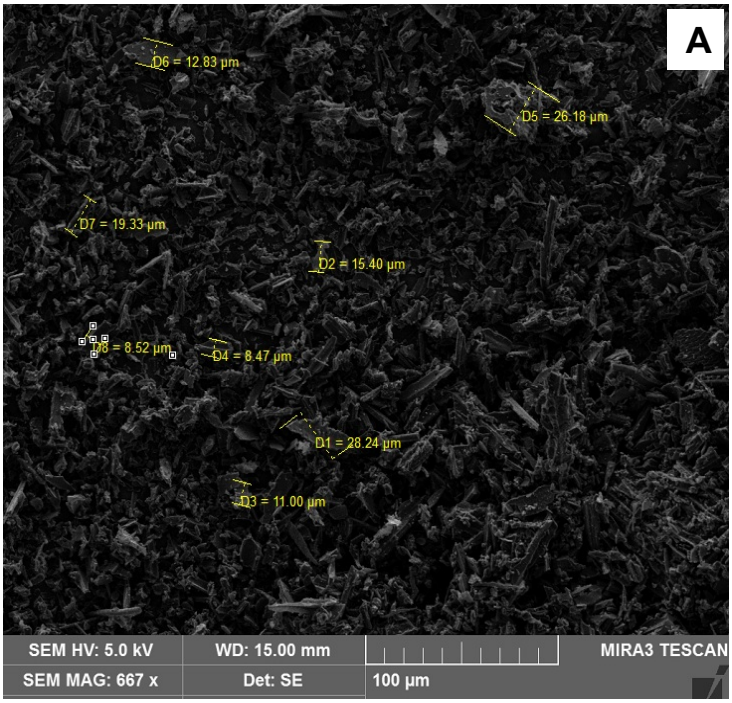
4.1 Optimizacija uvjeta pročišćavanja bioloških uzoraka pomoću aktivnog ugljena

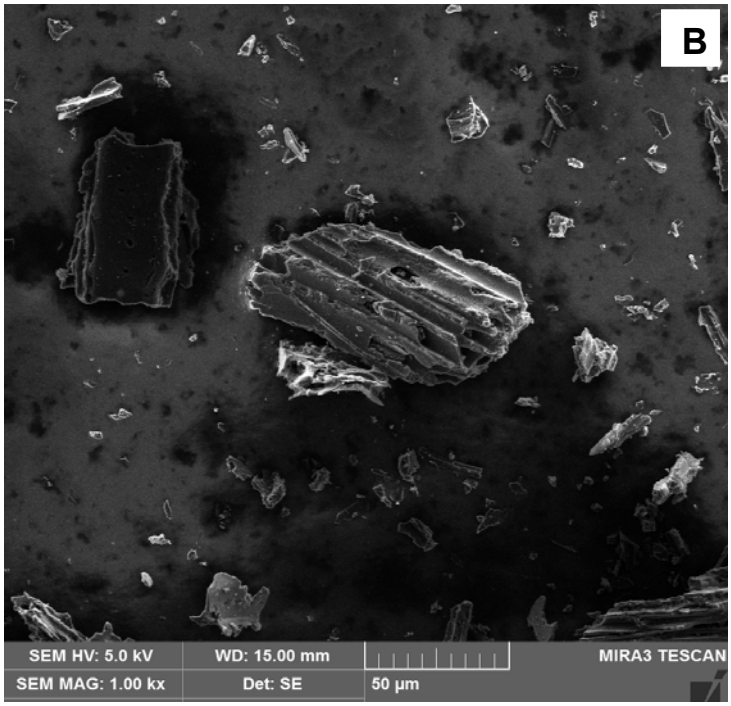
4.1.1 Priroda i adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena

Prije same primjene aktivnog ugljena u pročišćavanju bioloških uzoraka, zapitali smo se nekoliko pitanja vezanih uz prirodu aktivnog ugljena kojeg ćemo koristiti u daljnjim eksperimentima. Zanimalo nas je koja je veličina čestica aktivnog ugljena znajući da aktivni ugljen manje veličine čestica (aktivni ugljen u prahu) pokazuje bolji kapacitet obezbojenja otopine. Osim veličine čestica, vrlo je važna i veličina pora jer je poznato da makropore lakše vežu veće molekule kao što su humusne tvari, taninske tvari i hematin. Posljednje, ali ne i manje važno pitanje jest ima li na površini aktivnog ugljena vezanih molekula/tvari, odnosno je li aktivni ugljen kontaminiran.

Da bismo pronašli odgovore na ova pitanja, površinu aktivnog ugljena snimili smo skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Na Slici 11A vidimo da aktivni ugljen pokazuje varijaciju u veličini čestica kao i veličini pora. S obzirom na veličinu čestica možemo govoriti o aktivnom ugljenu u prahu ($d<44\mu m$), a s obzirom na veličinu pora vidimo da ga karakteriziraju makropore ($d>50nm$) (Slika 11B). Također možemo vidjeti da na površini aktivnog ugljena nema vezanih nikakvih kontaminanata.

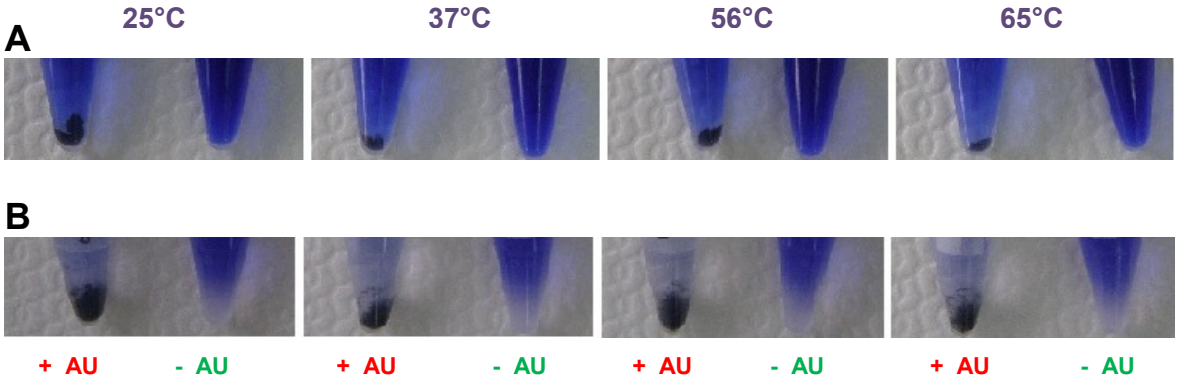
Osim prirode aktivnog ugljena koju karakteriziraju veličina čestica i pora, bilo je potrebno testirati i adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena u ovisnosti o vrijednosti pH i temperaturi. Adsorpcijski kapacitet aktivnog ugljena u prahu testiran je u otopini tinte i vodi, kao i u otopini tinte u vodi i Chelexu. Aktivni se ugljen može dodati u uzorke prije i nakon provedene izolacije Chelexom, pa nas je zanimalo pokazuje li aktivni ugljen bolji adsorpcijski kapacitet u vodi ili u Chelexu kao reagensu za izolaciju genomske DNA, a rezultati su prikazani na Slici 12.





Slika 11. Površina aktivnog ugljena snimljena skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) pri povećanju od 667x (A) i 1000x (B)

U uzorcima tinte u vodi vidimo da je tinta djelomično uklonjena neovisno o temperaturi inkubacije (Slika 12A), dok se otopina vode i Chelexa obezbojava u ovisnosti o temperaturi inkubacije (Slika 12B). Povišene temperature inkubacije (37°C, 56°C i 65°C) pokazale su se efikasnijima od temperature inkubacije pri 25°C iako nema značajne razlike u obojenju pri višim temperaturama (Slika 12B). S obzirom na to da se vrijednost pH Chelexa ne smije mijenjati jer bi to utjecalo na izolaciju genomske DNA, nije ispitana adsorpcija AU u uvjetima različitih vrijednosti pH.



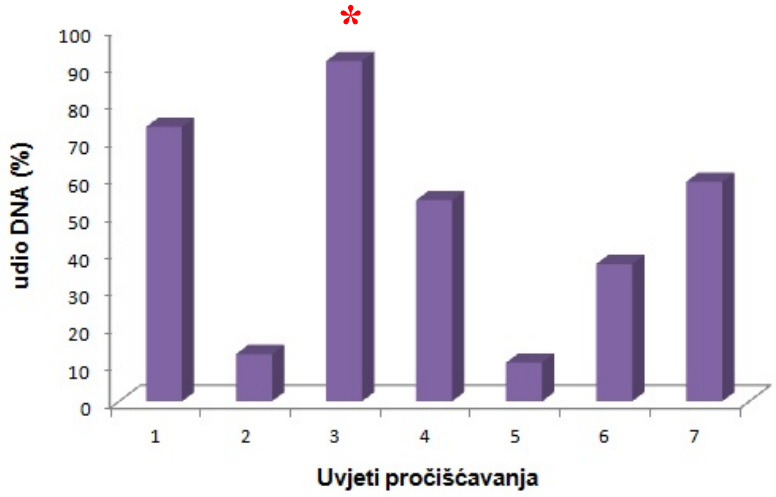
Legenda: "+ AU" – s dodatkom aktivnog ugljena, **"- AU"** – bez dodatka aktivnog ugljena

Slika 12. Test adsorpcijskog kapaciteta aktivnog ugljena u ovisnosti o temepraturi. **A** Uklanjanje tinte u vodi. **B** Uklanjanje tinte u vodi i Chelexu.

4.1.2 Adsorpcija u ovisnosti o temperaturi i vremenu

Nakon što je utvrđeno da aktivni ugljen pokazuje dobar adsorpcijski kapacitet u alkalnoj otopini Chelexa u ovisnosti o temperaturi, bilo je potrebno odrediti temperaturu, kao i vrijeme pročišćavanja bioloških uzoraka. Cilj jest smanjiti koncentraciju inhibitora i time ostvariti što veću koncentraciju DNA, tj. izbjeći lažno negativni rezultat. Uzorci su pročišćeni aktivnim ugljenom nakon provedene izolacije Chelexom kao što je prikazano na Slici 9 (stranica 30). Iz rezultata vidimo da temperatura i vrijeme utječu na pročišćavanje aktivnim ugljenom. Potpuna inhibicija bez naznake umnažanja DNA primijećena je kod 90% (18/20) nepročišćenih uzoraka (podaci nisu prikazani). Na Slici 13. prikazan je postotak ostvarene koncentracije DNA u odnosu na pozitivnu kontrolu

(krv bez zemlje) pri različitim uvjetima inkubacije aktivnim ugljenom. Genomska DNA pročišćena pri ovim uvjetima učinkovito je i reproducibilno umnožena za sve testirane lokuse STR. Najveće iskorištenje ostvareno je pročišćavanjem pri uvjetima 37°/60min (91,29%).

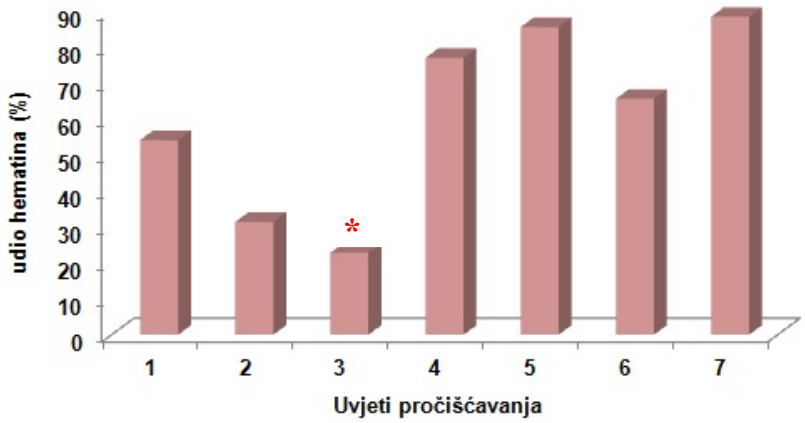


Legenda: 1 – **25°C/20 min**; **2** – **25°C/30 min**; **3** – **37°C/60** min; **4** – **56°C/10 min**; **5** – **65°C/5 min**; **6** – **65°C/10 min**; **7** – **65°C/30 min**. Rezultati su izraženi kao postotak ostvarene koncentracije DNA u odnosu na pozitivnu kontrolu. Zvjezdica označava najveće iskorištenje postupka pročišćavanja. Navedeni uvjeti korišteni su u daljnjem istraživanju. Pozitivna kontrola normalizirana je na 100%.

Slika 13. Koncentracija DNA u uzorcima krvi izloženih zemlji nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom pri različitim uvjetima temperature i vremena

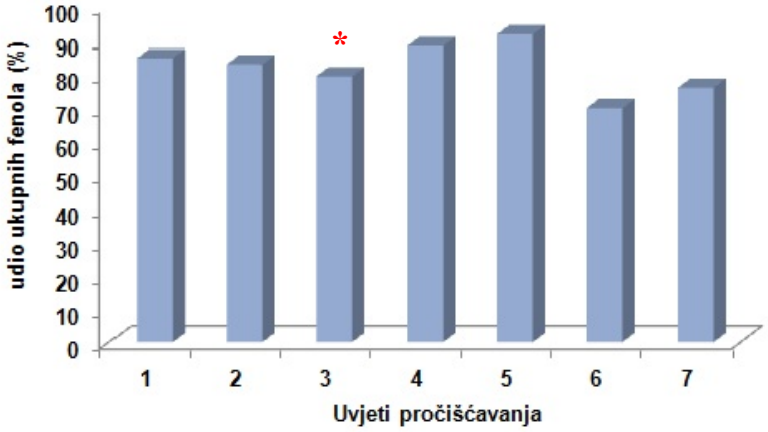
Potom se postavilo pitanje mogu li se spektrofotometrijski uočiti male promjene u koncentraciji hematina i humusnih tvari, kao obojenih tvari. Rezultati pokazuju da je promjene u koncentraciji moguće mjeriti, što se vidi na apsorpcijskom spektru prikazanom na Slici 16. Također vidimo da je pročišćavanje aktivnim ugljenom dovelo do smanjenja koncentracije hematina (Slika 14) i humusnih tvari (Slika 15) ovisno o uvjetima pročišćavanja. Koncentracija uklonjenog hematina značajno varira, iako se uočava bolji učinak pročišćavanja pri višim temperaturama (65,72% – 88,57%). Humusne tvari učinkovito su uklonjene u visokom postotku (69,93% – 91,74%) pri svim uvjetima inkubacije. Iako su navedeni inhibitori još uvijek prisutni u vrlo niskim koncentracijama, to ne utječe na uspješno umnažanje lokusa STR. Bez obzira na blago smanjenje

koncentracije hematina pri uvjetima 37°/60 min, navedeni uvjeti uzeti su kao optimalni zbog najmanjih gubitaka genomske DNA pročišćavanjem.



Legenda: 1 – 25°C/20 min; **2 – 25°C/30 min**; **3 – 37°C/60** min; **4 – 56°C/10 min**; **5 – 65°C/5 min**; **6 – 65°C/10 min**; **7 – 65°C/30**. Rezultati su izraženi kao postotak koncentracije hematina uklonjenog pri navedenim uvjetima pročišćavanja u odnosu na pozitivnu kontrolu. Pozitivna kontrola normalizirana je na 100%.

Slika 14. Udio hematina uklonjenog aktivnim ugljenom pri različitim uvjetima temperature i vremena u uzorcima krvi izloženih zemlji



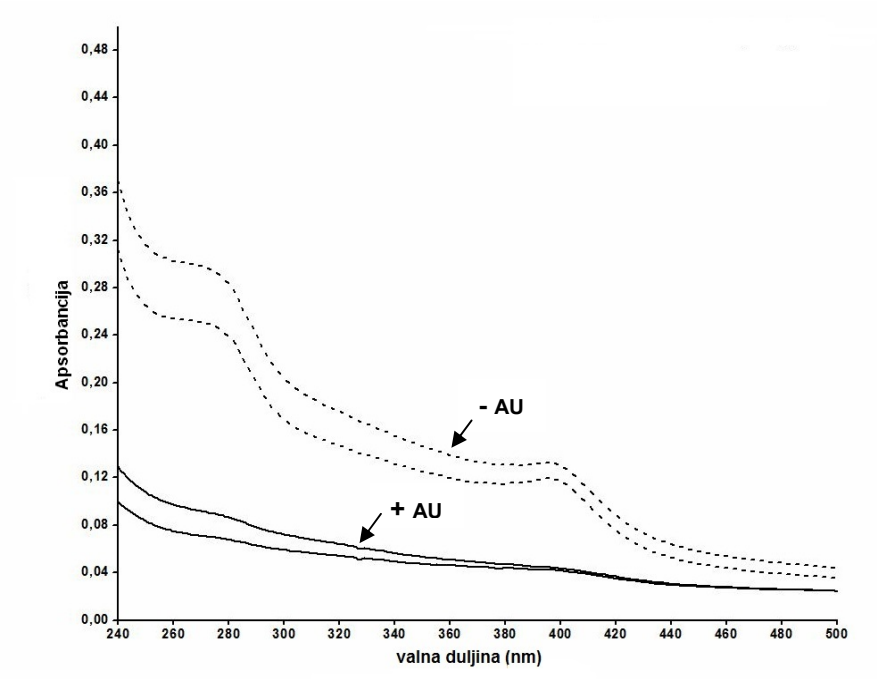
Legenda: 1 – 25°C/20 min; **2 – 25°C/30 min**; **3 – 37°C/60** min; **4 – 56°C/10 min**; **5 – 65°C/5 min**; **6 – 65°C/10 min**; **7 – 65°C/30**. Rezultati su izraženi kao postotak koncentracije humusnih tvari uklonjene pri navedenim uvjetima pročišćavanja u odnosu na negativnu kontrolu. Negativna kontrola normalizirana je na 100%.

Slika 15. Udio humusnih tvari (ukupnih fenola) uklonjenih aktivnim ugljenom pri različitim uvjetima temperature i vremena u uzorcima krvi izloženih zemlji

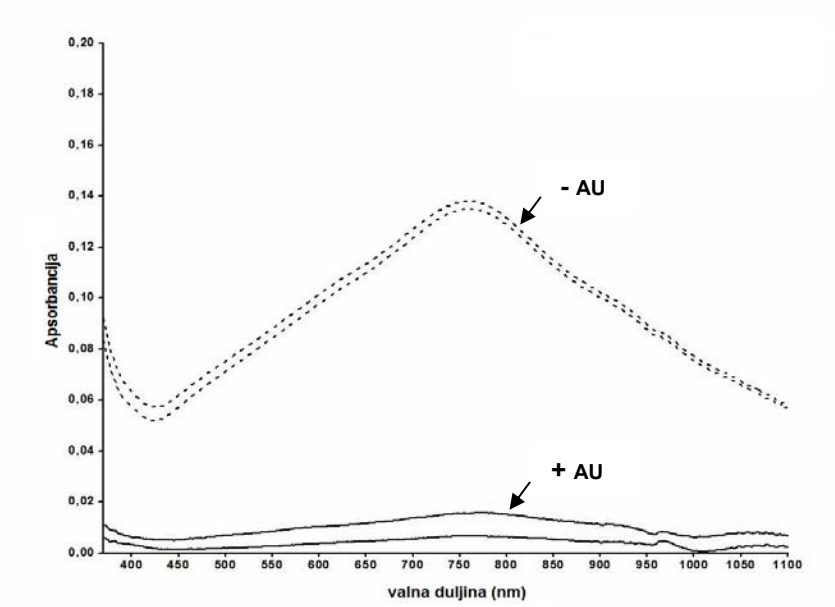
Apsorpcijski spektri prikazuju pik hematina pri valnoj duljini λ=400nm, dok je pik pri λ=260-280nm karakterističan za DNA i proteine (Slika 16A). Reakcijom slobodnih fenolnih grupa u humusnim tvarima s Folin-Ciocalteau reagensom (FCR) rezultirao je pikom pri valnoj duljini λ=765nm (Slika 16B). Pročišćavanje aktivnim ugljenom pri optimalnim uvjetima dovelo je do obezbojenja uzoraka, čime su nestale specifične apsorbancije i nije došlo do pojave plavog obojenja reakcijom humusnih tvari s FCR, dok su nepročišćeni uzorci ostali obojeni. Testirana je adsorpcija humusnih tvari iz zemlje, kao i adsorpcija tanina iz drva te indigo boje iz tamnoplavog trapera. Snimljeni su apsorpcijski spektri koji su prikazani na Slikama 17 do 19.

Vidimo da pročišćavanje omogućuje smanjuje obojenja u uzorcima koji sadrže humusne tvari i tanine, a ta promjena u obojenju odnosno koncentraciji može se detektirati i za drvo kao podlogu. Koncentracija indiga nije se mogla kvantitativno odrediti, pa su se uzorci na traperu kao podlozi snimali u cijelom mjernom području (λ=190-1100nm) i potom su se njihovi spektri međusobno uspoređivali, čime je uočeno blago smanjenje apsorbancije odnosno obojenja nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom (Slika 19).

A

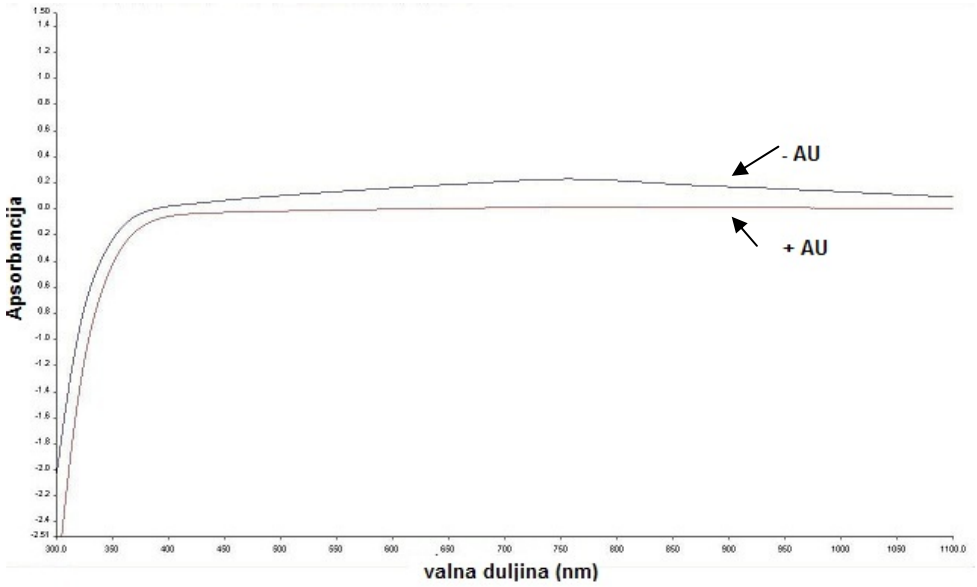


B



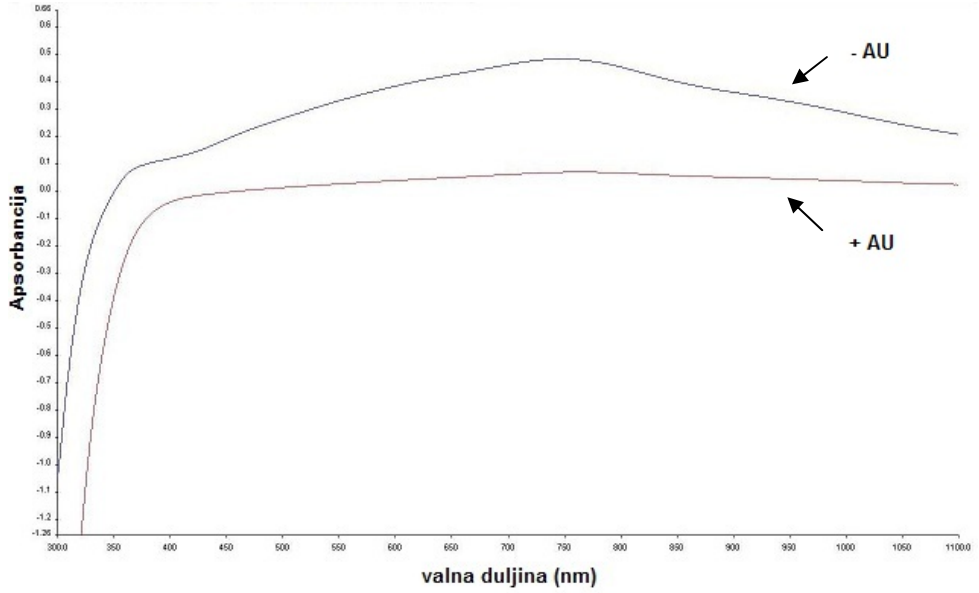
Legenda: **"+ AU"** – s dodatkom AU; **"- AU"** – bez dodatka AU pri 37°/60 min, "FCR" – Folin-Ciocalteau reagens.

Slika 16. Apsorpcijski spektri izoliranih uzoraka krvi na zemlji. A. Spektar snimljen prije dodatka FCR (prikazano λ=240–500 nm). **B.** Spektar snimljen nakon dodatka FCR (prikazano λ=400–1100 nm)



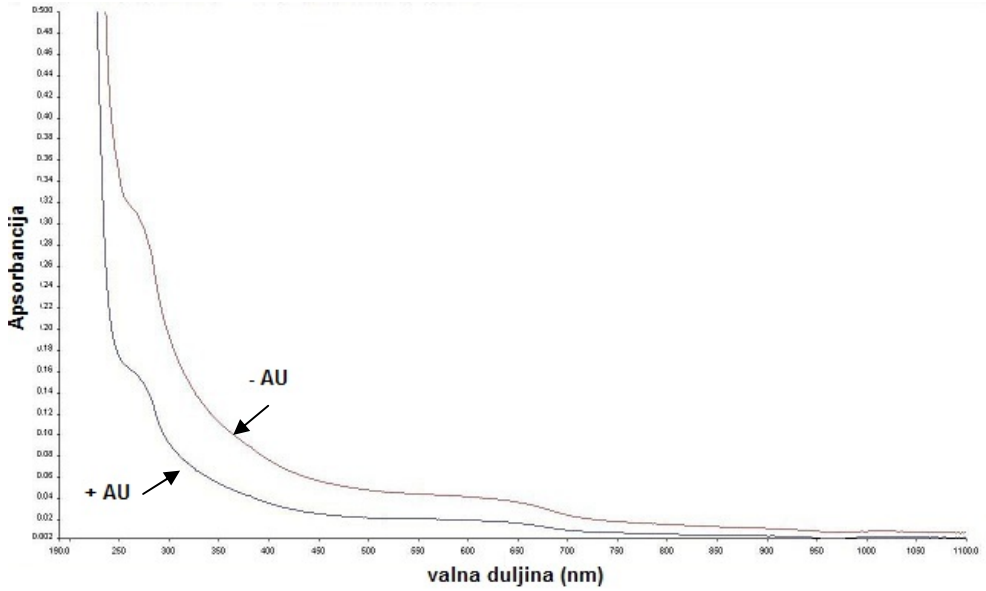
Legenda: **"+ AU"** – s dodatkom AU; **"- AU"** – bez dodatka AU pri 37°/60 min (prikazano λ=300- 1100nm) nakon reakcije s Folin-Ciocalteau reagensom (FCR)

Slika 17. Apsorpcijski spektri izoliranih uzoraka epitela inkubiranih sa zemljom



Legenda:"+ AU" – s dodatkom AU; **"- AU"** – bez dodatka AU pri 37°/60 (prikazano λ=300–1100nm) nakon reakcije s Folin-Ciocalteau reagensom (FCR).

Slika 18. Apsorpcijski spektri izoliranih uzoraka epitela na drvu



Legenda: "+ AU" – s dodatkom AU; **"- AU"** – bez dodatka AU pri 37°/60 min (prikazano λ=150–1100nm)

Slika 19. Apsorpcijski spektri izoliranih uzoraka epitela na traperu kao podlozi

4.2 Usporedba izolacije i pročišćavanje inhibiranih bioloških uzoraka

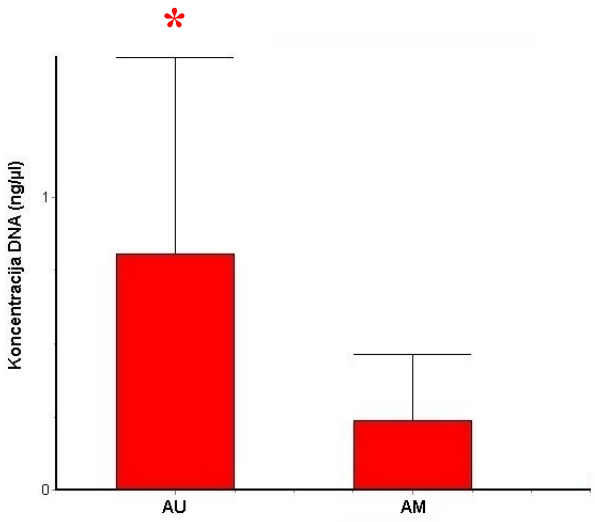
Nakon što su utvrđeni optimalni uvjeti za pročišćavanje pomoću aktivnog ugljena, pripremljeni su biološki uzorci kao što je prikazano na Slici 10 (stranica 31). Cilj je postići potpunu inhibiciju i potom odrediti učinkovitost pročišćavanja nakon izolacije genomske DNA, a prije umnožavanja metodom PCR. Uspoređene su neafinitetne metode izolacije (Chelex i organska metoda), metode pročišćavanja adsorpcijom (aktivni ugljen pri uvjetima 37°C/60min) i ultrafiltracijom (Amicon kolonom kao komercijalno dostupnom metodom). U konačnici, uspoređena je i kvaliteta umnožene DNA metodom PCR.

Također su uspoređeni apsorpcijski spektri za izolirane uzorke na traperu, kao i koncentracije inhibitora, i to:

- hematina u izoliranim uzorcima krvi na različitim podlogama (zemlja, drvo i traper), kao i bez podloge
- humusnih tvari u izoliranim uzorcima krvi i epitela izloženi zemlji
- tanina u izoliranim uzorcima krvi i epitela na drvu kao podlozi, a rezultati su navedeni u sljedećim poglavljima.

4.2.1 Krv na zemlji kao podlozi

Chelex se pokazao uspješnom metodom izolacije genomske DNA za ovu vrstu uzoraka u odnosu na organsku metodu koja bila potpuno neučinkovita stoga rezultati nisu ni prikazani. Na Slici 20. vidimo da pročišćavanje značajno utječe na koncentraciju DNA (n=15, P=0,0153). Važno je napomenuti da je statistički značajno povećanje koncentracije DNA uočeno nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom dok isti efekt nije uočen nakon pročišćavanja Amiconom.

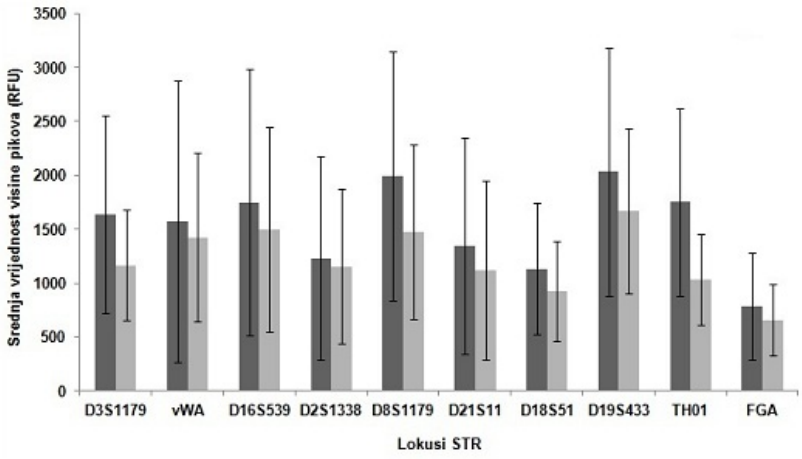


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon. Samo je jedan nepročišćeni uzorak bio pozitivno kvantificiran, stoga se nije uzeo u obzir za određivanje statističke značajnosti. Zvjezdica označava statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja, * = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

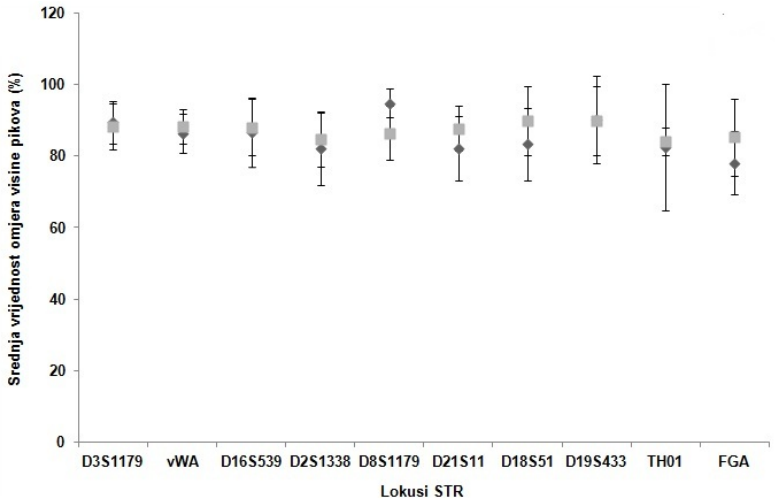
Slika 20. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima krvi izloženih zemlji

Nakon što je utvrđeno da pročišćavanje aktivnim ugljenom značajno utječe na koncentraciju DNA, zapitali smo se je li umnožena DNA ujedno i dobre kvalitete. Iz rezultata vidimo da nema statistički značajne razlike u visini pikova (PH) (P=0,063) ni u omjeru visine pikova (PHR) (P=0,2799), stoga možemo reći da je ostvarena dobra kvaliteta umnožene DNA bez obzira na metodu pročišćavanja (Slike 21A i 21B).

A



B



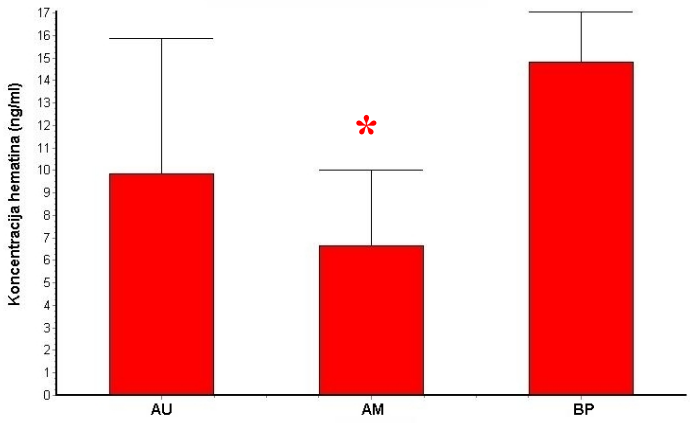
Legenda: ◆ **Aktivni ugljen,** ▭ **Amicon.** Samo je jedan nepročišćeni uzorak bio potpuno umnožen, stoga se nije uzeo u obzir za određivanje statističke značajnosti.

Slika 21. Visine pikova (RFU) (A) i omjeri visina pikova (%) (B) uzoraka krvi izloženih zemlji

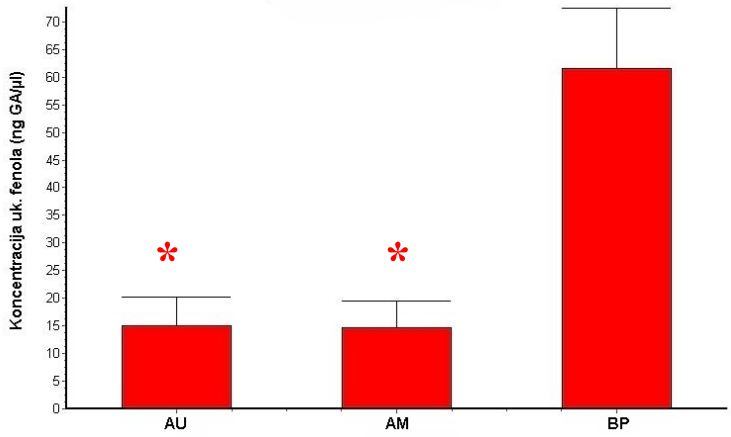
Iz dosadašnjih rezultata proizlazi da se pročišćavanjem povećava koncentracija DNA, odnosno iskorištenje postupka, te nas je zanimalo smanjuje li se pročišćavanjem istodobno koncentracija hematina i humusnih tvari.

Na Slici 22A vidimo da je pročišćavanje značajno utjecalo na koncentraciju hematina (n=15, P=0,0324). Statistički značajno smanjenje koncentracije hematina uočeno je nakon pročišćavanja Amiconom. Također je uočeno da pročišćavanje značajno utječe i na koncentraciju humusnih tvari koja se smanjila (n=15, P=0,0029) iako nema razlike u metodi pročišćavanja (Slika 22B).

A



B

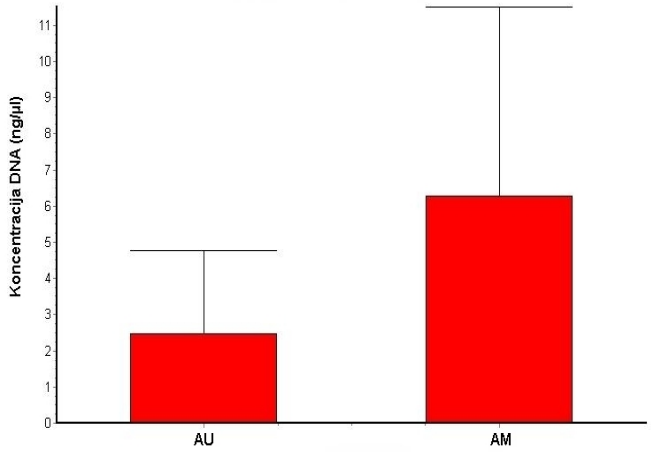


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja. Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja, * = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 22. Koncentracija hematina (ng/µl) (A) i humusnih tvari (ng GA/µl) (B) u uzorcima krvi izloženih zemlji

4.2.2 Epitel izložen zemlji

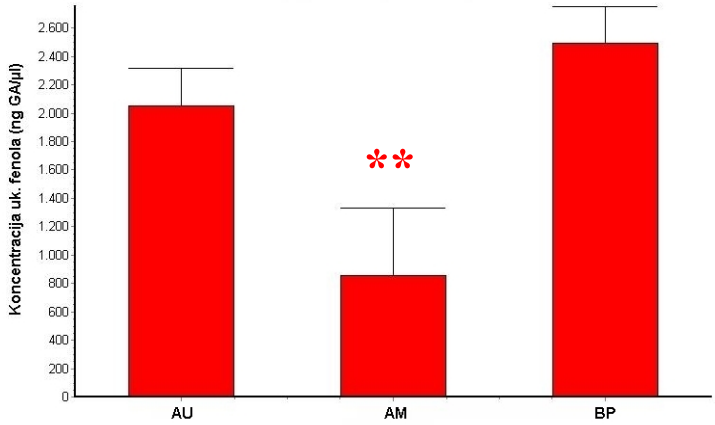
Za razliku od nepročišćenih uzoraka krvi izloženih zemlji koje karakterizira potpuna inhibicija bez obzira na metodu izolacije, u ovoj vrsti uzoraka nije se uspjela postići potpuna inhibicija humusnim tvarima nakon izolacije Chelexom. Osim navedenog, nije uočena ni značajna razlika u koncentraciji DNA u pročišćenim uzorcima, stoga se nije mogao odrediti utjecaj pročišćavanja na koncentraciju DNA (rezultati nisu prikazani). Organskom izolacijom genomske DNA postignuta je potpuna inhibicija nepročišćenih uzoraka. Pročišćavanjem se povećala koncentracija DNA. Iako Amicon pokazuje veću ostvarenu koncentraciju DNA, nema statistički značajne razlike u metodi pročišćavanja (n=15, P=0,2492) (Slika 23).



Legenda: "AU" – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon.

Slika 23. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima epitela izloženih zemlji

Pročišćavanje je značajno utjecalo na koncentraciju humusnih tvari (n=15, P<0,0001), a Amicon se pokazao kao učinkovitija metoda za uklanjanje humusnih tvari u ovoj vrsti uzoraka (Slika 25).

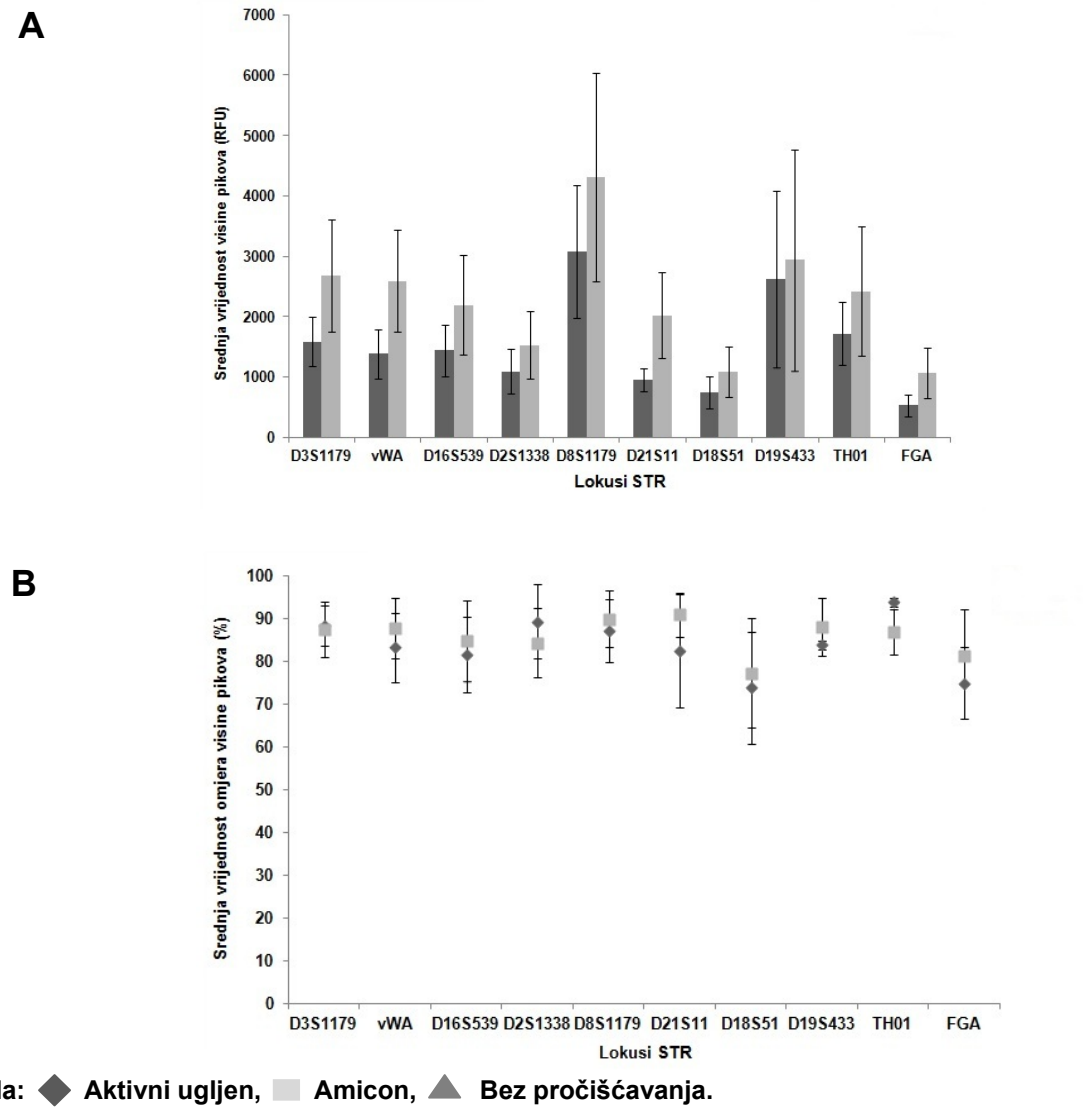


Legenda: "AU" – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon, **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdica označava statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja.
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** =<0,001.

Slika 25. Koncentracija humusnih tvari (ng GA/µl) u uzorcima epitela izloženih zemlji

Nije bilo statistički značajne razlike u visini pikova (PH) (P=0,1051), kao ni u omjeru visine pikova (PHR) (P=0,4359) (Slike 24A i 24B). Iako je uočena nešto manja

visina pikova za veće lokuse (D18S51 i FGA), možemo reći da je ostvarena dobra kvaliteta umnožene DNA bez obzira na metodu pročišćavanja.

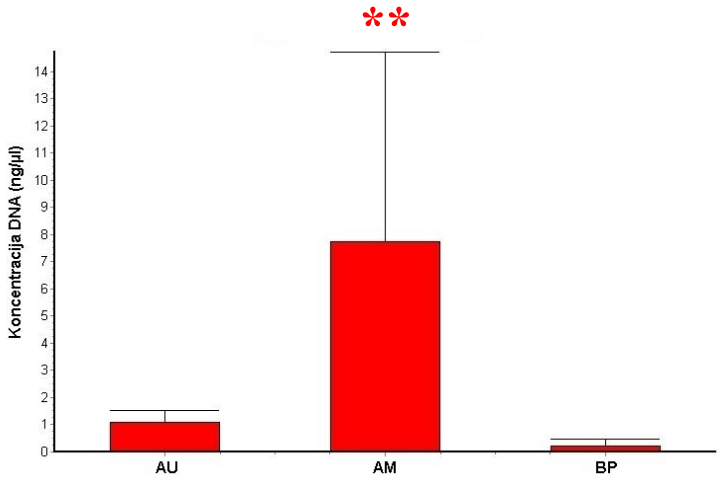


Slika 24. Visine pikova (RFU) (A) i omjeri visina pikova (%) (B) za uzorke epitela izloženih zemlji

4.2.3 Krv na drvu kao podlozi

Uzorci izolirani organskom izolacijom bez obzira na metodu pročišćavanja pokazivali su potpunu inhibiciju i nemogućnost umnažanja metodom qPCR (rezultati nisu prikazani). Iz rezultata kvantifikacije vidimo da postoji statistički značajan utjecaj

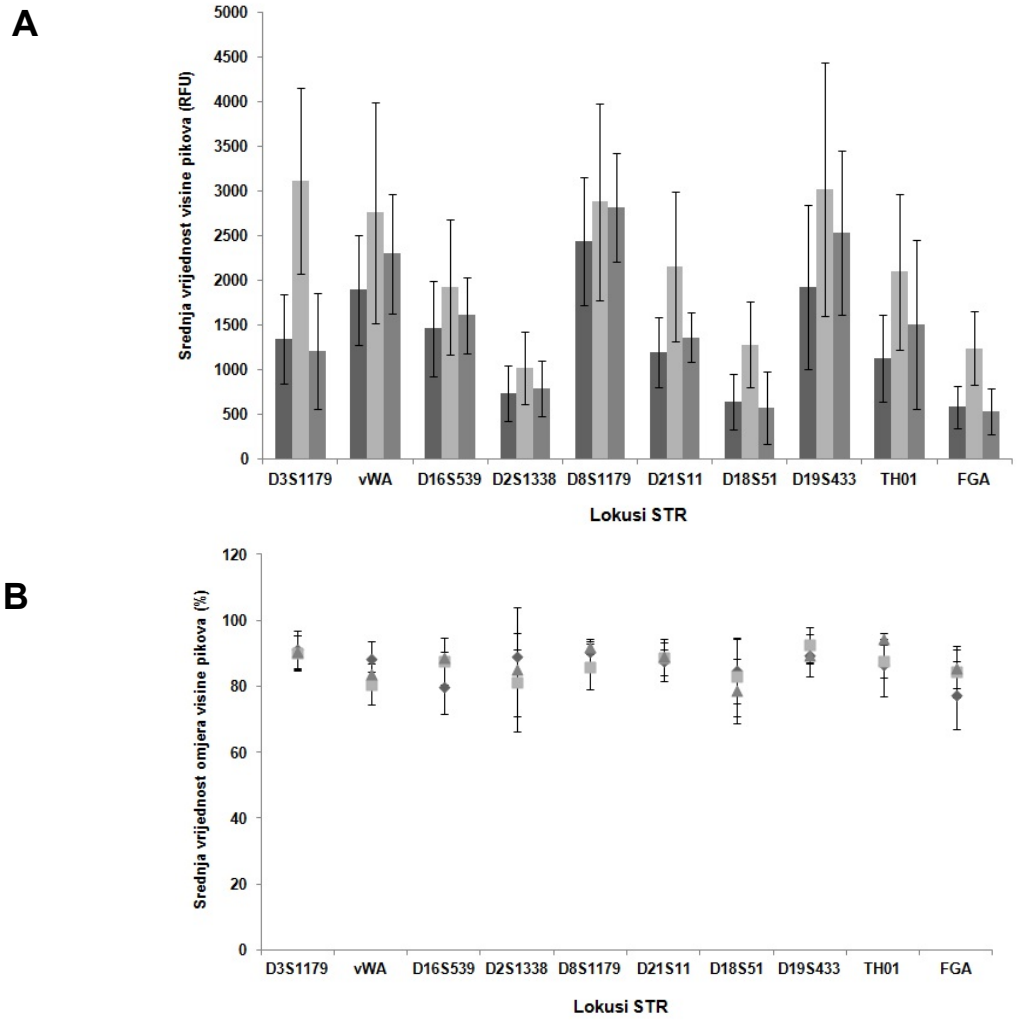
pročišćavanja na koncentraciju DNA nakon izolacije Chelexom (n=15, P=0,0024), a Amicon je pokazao bolju učinkovitost (Slika 26).



Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja.
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 26. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima krvi na drvu kao podlozi

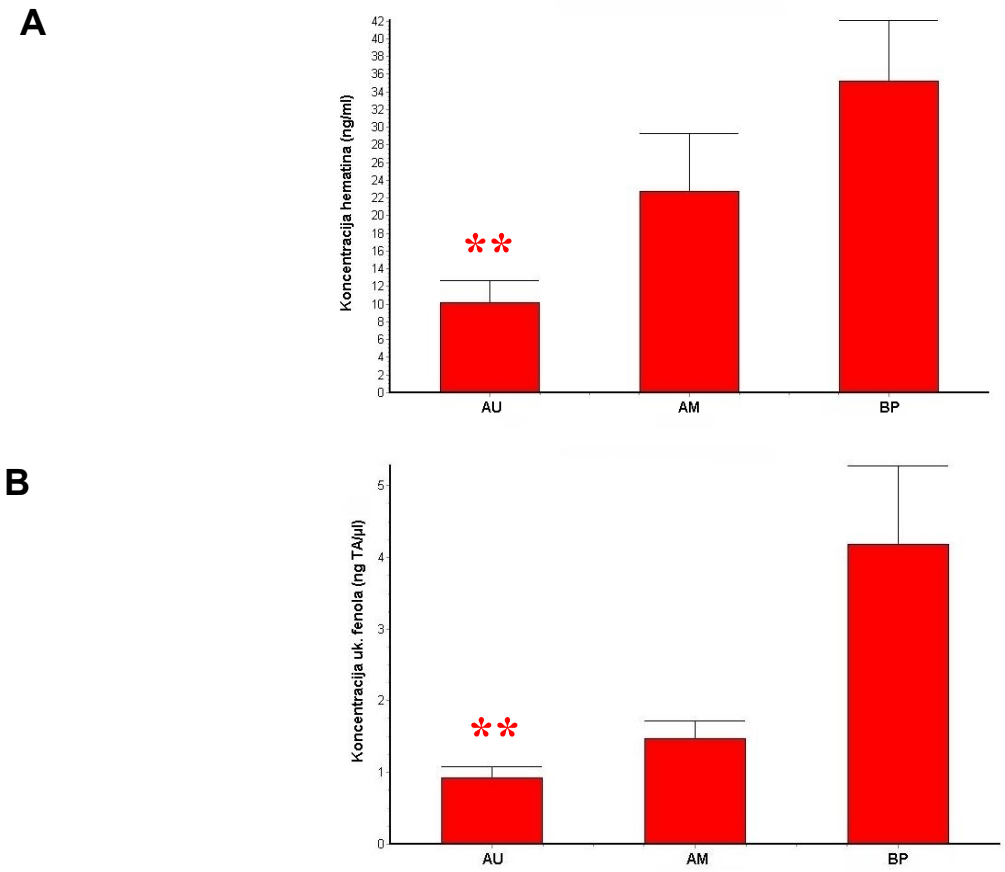
Nadalje, vrijednosti PH i PHR, kao kriteriji kvalitete umnožene DNA, uspoređene su za obje metode pročišćavanja (Slike 27A i 27B). Rezultati pokazuju da se omjer visina pikova ne razlikuje statistički značajno (P=0,7394), dok su prosječne visine pikova statistički značajno veće nakon pročišćavanja Amiconom (P=0,0288). Smanjena prosječna visina pikova za veće lokuse (D2S1338, D18S51 i FGA) ukazuje na prisustvo inhibitora u određenoj koncentraciji.



Legenda: ◆ **Aktivni ugljen,** ▭ **Amicon,** ▲ **Bez pročišćavanja.**

Slika 27. Visine pikova (RFU) i omjeri visina pikova (%) za uzorke krvi na drvu kao podlozi

Izmjerene su koncentracije hematina i humusnih tvari te su rezultati prikazani na Slikama 28A i 28B. Pročišćavanje uzoraka ima vrlo značajan statistički utjecaj na koncentraciju hematina (n=15, P=0,0034) i tanina (n=15, P<0,0001). Uočeno je značajno smanjenje koncentracije hematina i tanina pročišćavanjem aktivnim ugljenom.

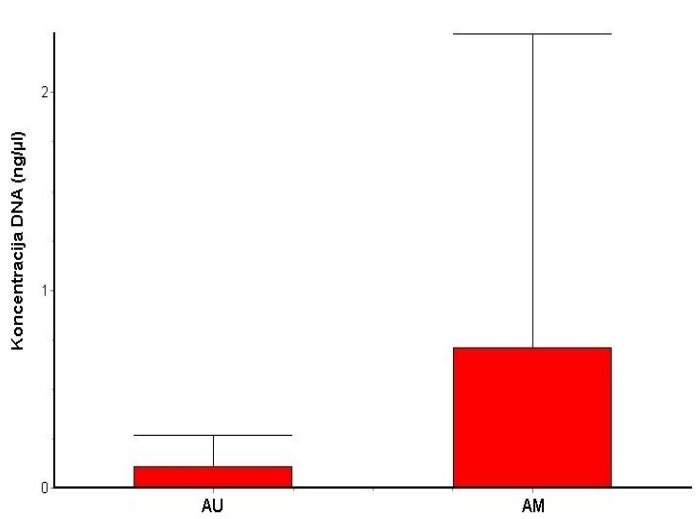


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja
* = 0,05-0,01, ** = 0,01-0,001; *** = <0,001.

Slika 28. Koncentracija hematina (ng/µl) (A) i tanina (ng TA/µl) (B) u uzorcima krvi na drvu kao podlozi

4.2.4 Epitel na drvu kao podlozi

Organska izolacija pokazala se kao neučinkovita metoda s obzirom na to da su svi uzorci bili inhibirani, a koncentracija DNA nije se mogla odrediti (rezultati nisu prikazani). Postignuta je potpuna inhibicija nepročišćenih uzoraka nakon izolacije Chelexom, dok pročišćavanje omogućuje detekciju DNA i njezino uspješno umnažanje metodom PCR (Slika 29).

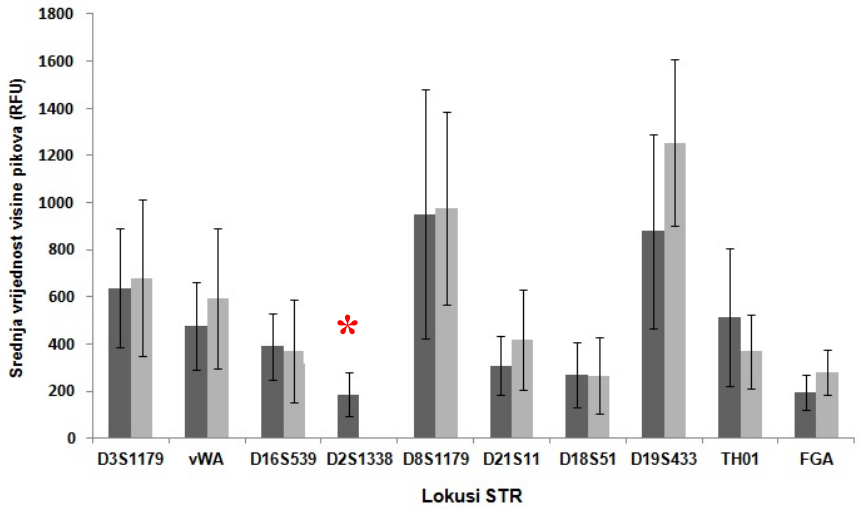


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon.
Prikazani su samo uzorci koji su pozitivno kvantificirani i umnoženi.

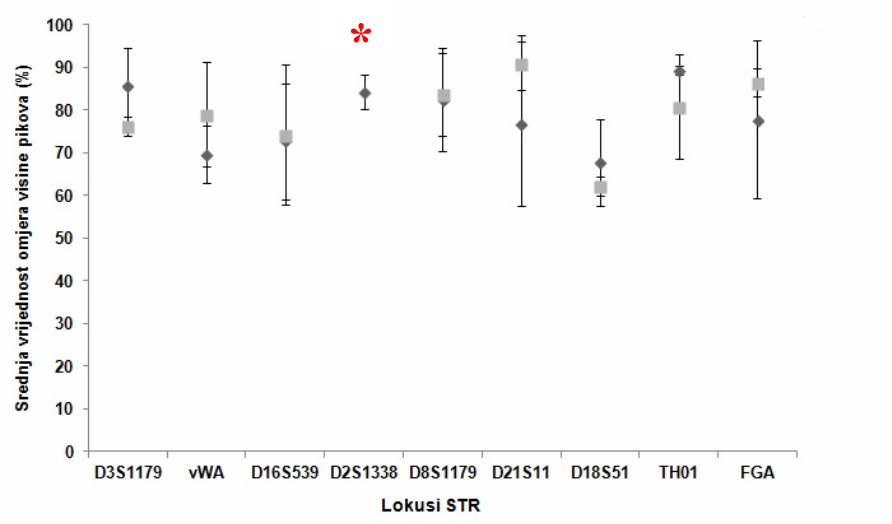
Slika 29. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima epitela na drvu kao podlozi

Iz rezultata vidimo da je pročišćavanjem Amiconom ostvarena veća, ali ne i statistički značajna razlika u koncentraciji DNA (n=15, P=0,4802). Također nije uočena statistički značajna razlika u visini pikova (P=0,7959), kao ni u omjeru visina pikova svakog pojedinog lokusa (P=0,6454), iako je važno napomenuti da lokus D2S1338 nije bio umnožen nakon pročišćavanja Amiconom (Slika 30 A i 30B).

A



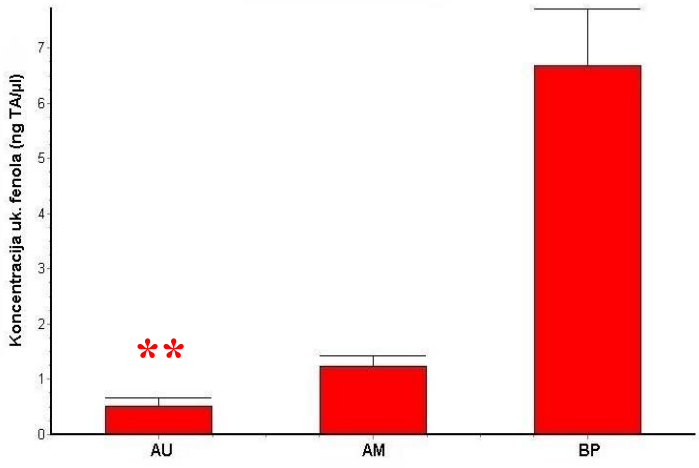
B



Legenda: **Aktivni ugljen,** **Amicon**
Samo dva uzorka pročišćena Amiconom bila su umnožena za lokus D2S1338 (označeno zvjezdicom).

Slika 30. Visine pikova (RFU) (A) i omjeri visina pikova (%) (B) za uzorke epitela na drvu kao podlozi

Pročišćavanje statistički značajno utječe na smanjenje koncentracije tanina (n=15, p<0,0001). Aktivni ugljen bio je efikasniji u usporedbi s Amiconom, kao što je prikazano na Slici 31.

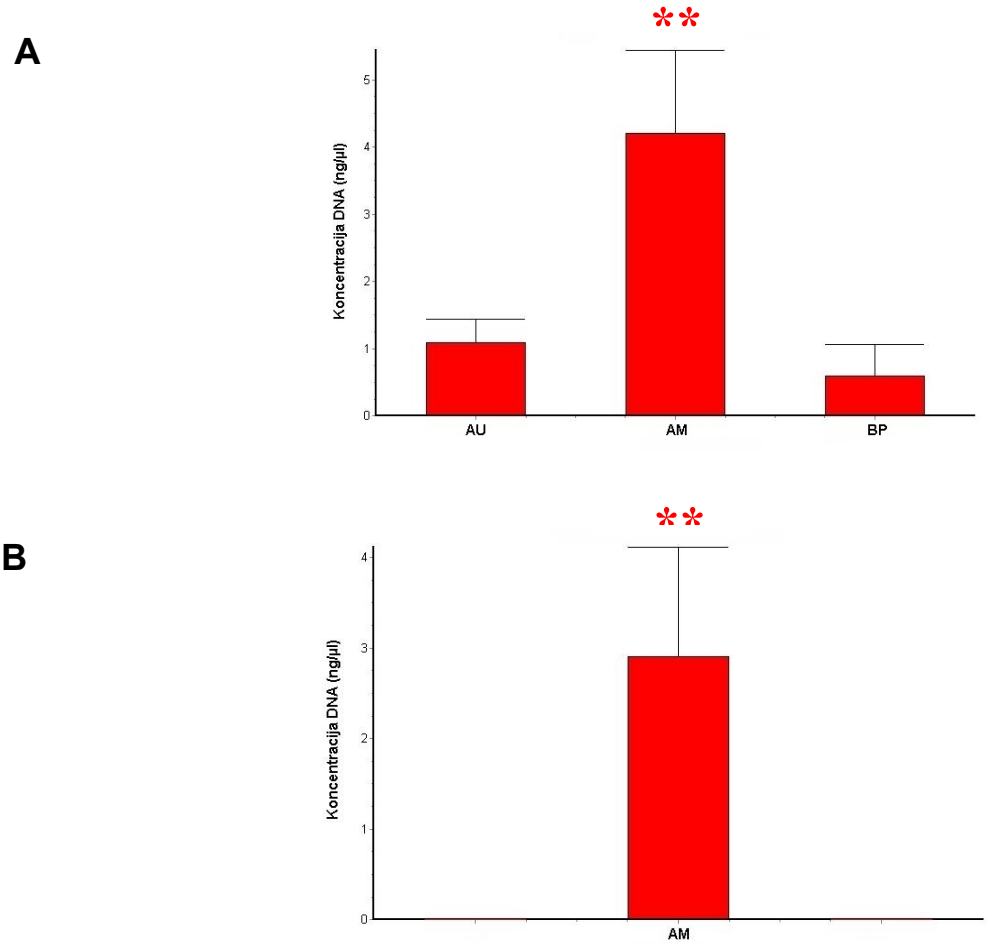


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja.
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 31. Koncentracija tanina (ng TA/µl) u uzorcima epitela na drvu kao podlozi

4.2.5 Krv na traperu kao podlozi

Chelex se pokazao učinkovitijom metodom u usporedbi s organskom izolacijom genomske DNA iz ove vrste uzoraka (slika 32A i 32B) te je uočen statistički značajan utjecaj pročišćavanja na koncentraciju DNA (n=15, P=0,0006). Amicon je osigurao veću koncentraciju DNA u usporedbi s aktivnim ugljenom bez obzira na metodu izolacije. Nije bilo značajne razlike u koncentraciji DNA nakon pročišćavanja Amiconom bez obzira na metodu izolacije (n=10, P=0,0006).

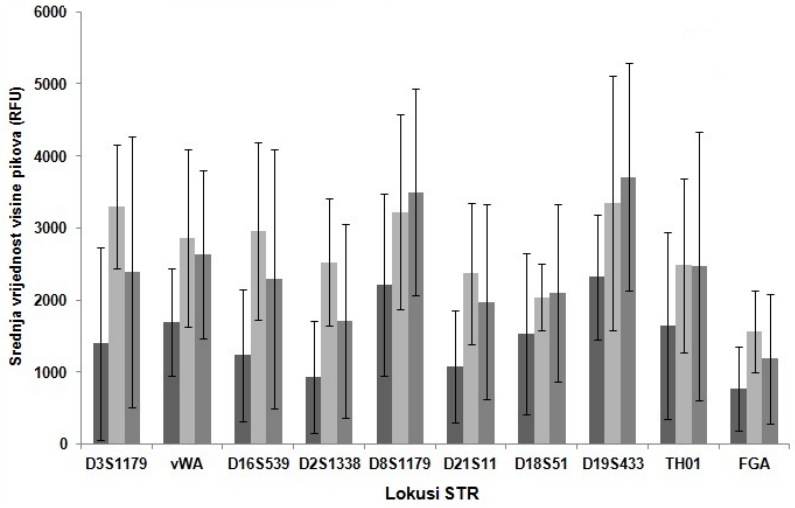


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

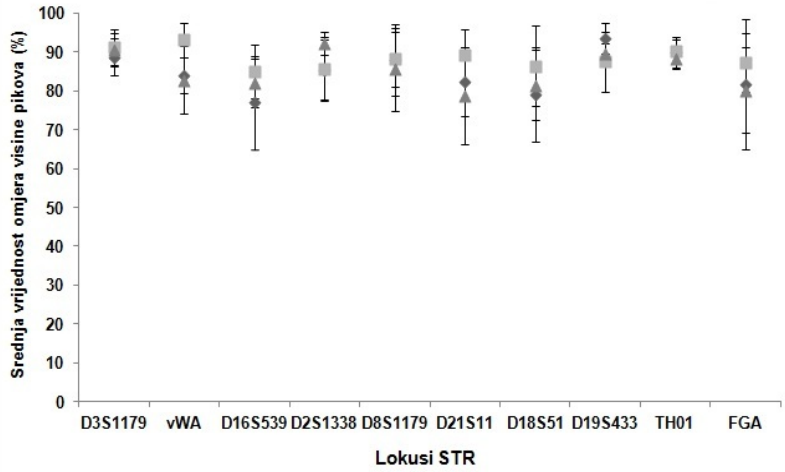
Slika 32. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima krvi na traperu kao podlozi izoliranih Chelexom (A) i organskom metodom (B)

Analiza kvalitete DNA izolirane Chelexom potvrdila je značajno nižu prosječnu visinu pikova nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom (Slika 33A). Iako su vrijednosti prosječne visine pikova unutar preporučenih, osim u većim lokusima (D2S1338 i FGA), nema značajne razlike ni u omjeru visine pikova (P=0,3322). Stoga možemo reći da je ostvarena dobra kvaliteta DNA bez obzira na metodu pročišćavanja (Slike 33B).

A



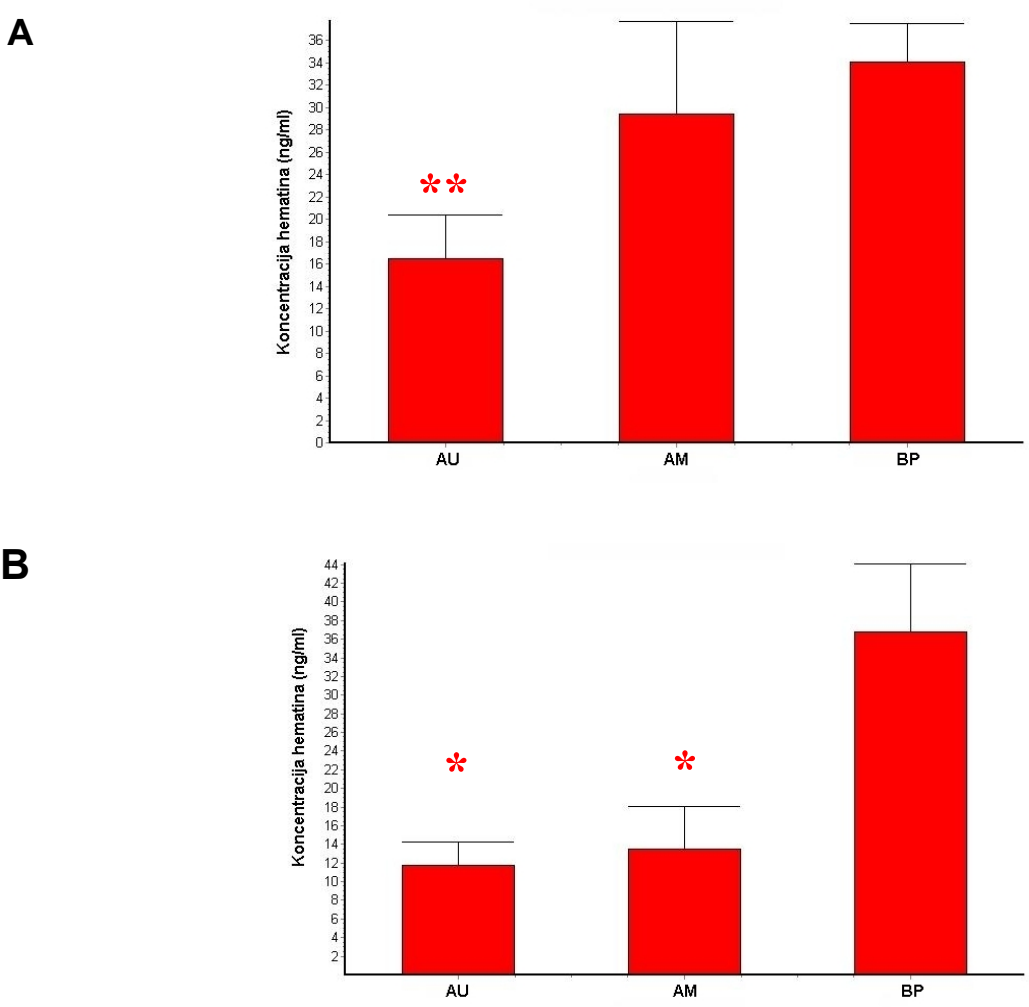
B



Legenda: ◆ Aktivni ugljen, ▭ Amicon, ▲ Bez pročišćavanja.

Slika 33. Visine pikova (RFU) i omjeri visina pikova (%) za uzorke krvi na traperu kao podlozi

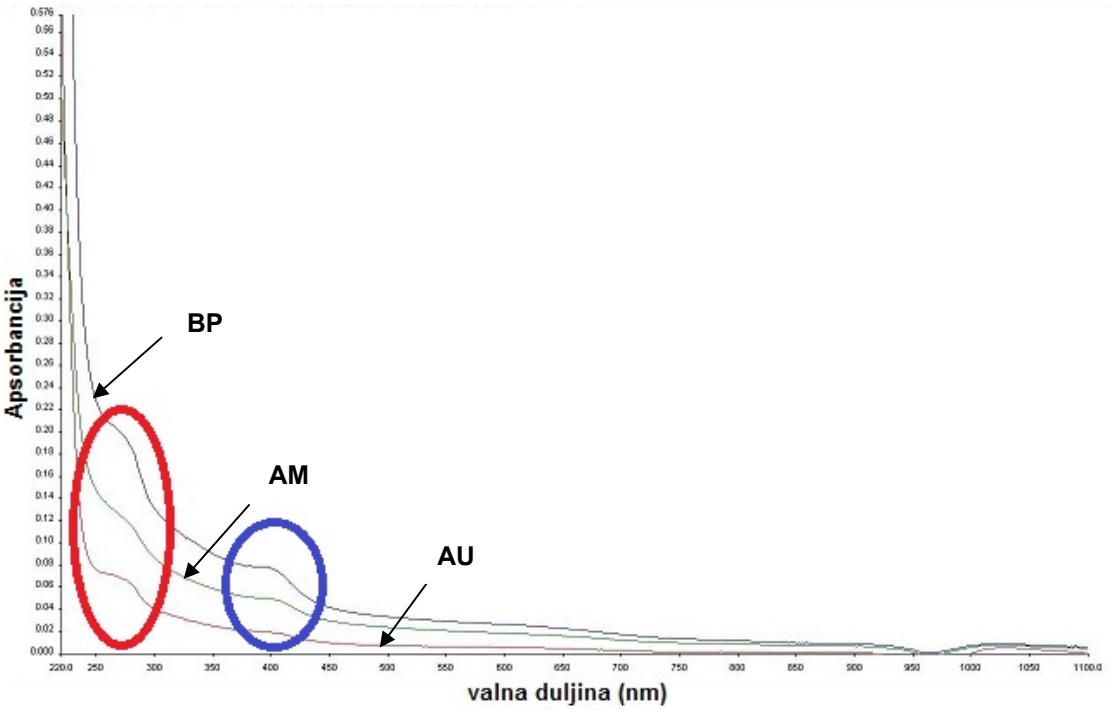
Iz rezultata vidimo da je pročišćavanje statistički značajno utjecalo na koncentraciju hematina (n=15, P=0,008). Važno je napomenuti da je aktivni ugljen jednako uspješno uklonio hematin bez obzira na metodu izolacije, dok je pročišćavanje Amiconom utjecalo na statistički značajno smanjenje koncentracije hematina samo nakon organske izolacije (Slika 34A i 34B).



Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 34. Koncentracija hematina (ng/µl) u uzorcima krvi na traperu kao podlozi izoliranih Chelexom (A) i organskom metodom (B)

Koncentracija indiga nije mogla biti kvantitativno određena, stoga je za izolirane uzorke krvi na traperu mjerena apsorbancija u cijelom mjernom području. Razlika u apsorbanciji prikazana je na Slici 35. Nakon pročišćavanje uočeno je smanjenje apsorbancije bez obzira na metodu pročišćavanja.



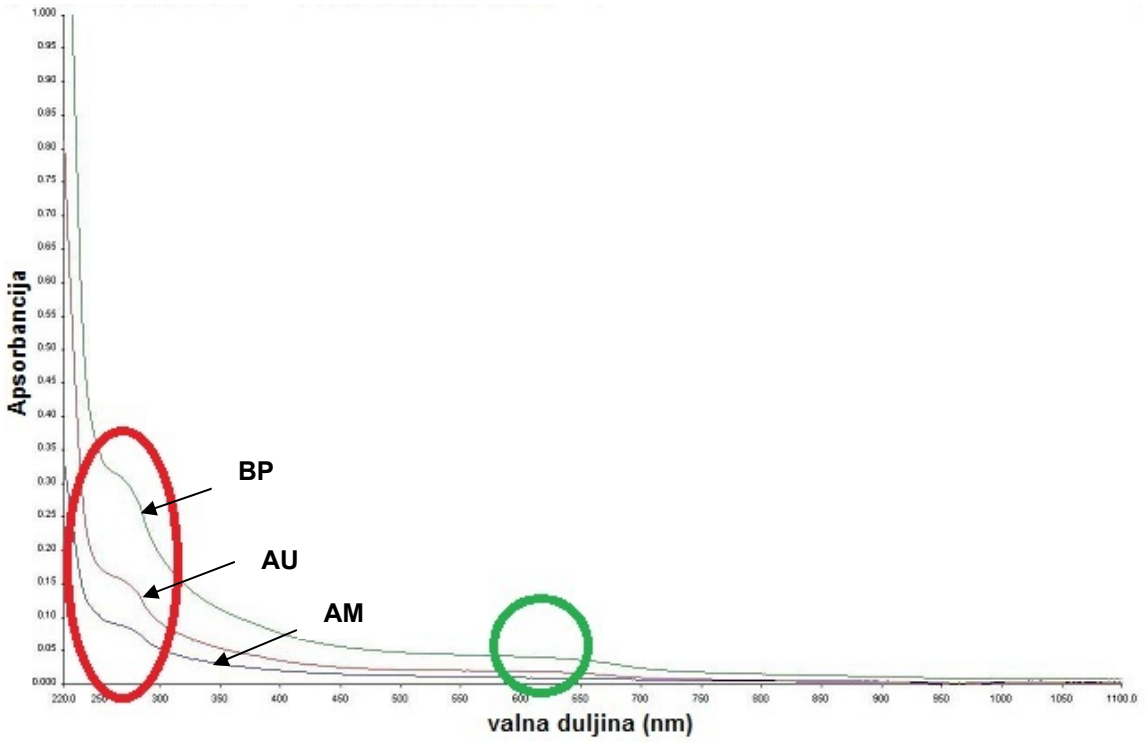
Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Crveno je označen karakteristični apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina i molekula s aromatskim prstenom (proteina) (λ=260–280nm). Plavo je označen apsorpcijski maksimum porfirinskih spojeva (hematina) (λ=400nm), apsorpcijski maksimum indiga (λ=602nm) nije detektiran (prikazano λ=230–1100nm).

Slika 35. Apsorpcijski spektri uzoraka krvi na traperu kao podlozi izoliranih Chelexom

4.2.6 Epitel na traperu kao podlozi

Koncentracija DNA u testiranim uzorcima nije bila dovoljna da se mogu statistički usporediti niti metode izolacije niti pročišćavanja. Također nije bilo moguće kvantitativno odrediti koncentraciju indiga, stoga se pratila razlika u apsorbanciji odnosno obojenju

uzoraka, što je prikazano na Slici 36. Kao i kod uzoraka krvi na traperu, vidimo da se pročišćavanjem smanjuje apsorbancija u cijelom području mjerenja.

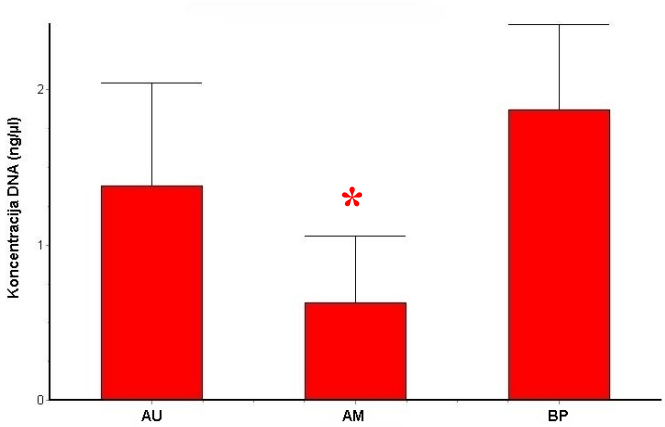


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Crveno je označen karakteristični apsorpcijski maksimum nukleinskih kiselina i molekula s aromatskim prstenom (proteina) (λ=260–280nm). Zeleno je označen jedva vidljiv apsorpcijski maksimum indiga (λ=602nm) (prikazano λ=220–1100nm).

Slika 36. Apsorpcijski spektri uzoraka epitela na traperu kao podlozi izoliranih Chelexom

4.2.7 Uzorci krvi

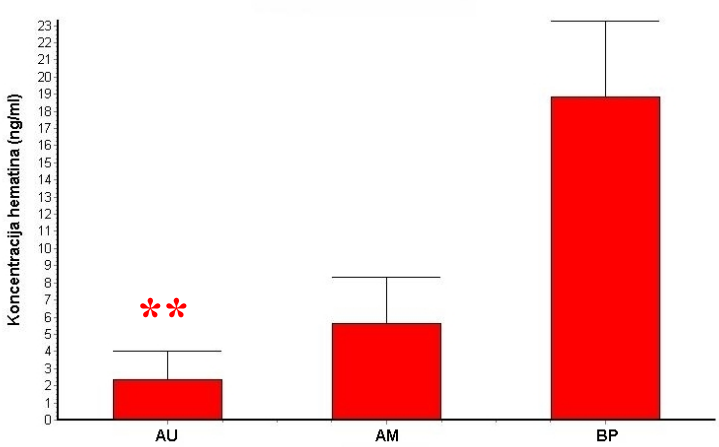
Iz rezultata vidimo da je pročišćavanje nakon izolacije Chelexom statistički značajno utjecalo na koncentraciju DNA (n=5, P=0,0339). Za razliku od aktivnog ugljena, pročišćavanje Amiconom dovodi do značajnog gubitka DNA (Slika 37). Organska se izolacija pokazala neučinkovitom bez obzira na metodu pročišćavanja (rezultati nisu prikazani).



Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja.
*=0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 37. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima krvi

Zabilježen je statistički značajan utjecaj pročišćavanja na koncentraciju hematina (n=5, P=0,0035). Vidimo da se koncentracija hematina značajno smanjuje nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom (Slika 38).



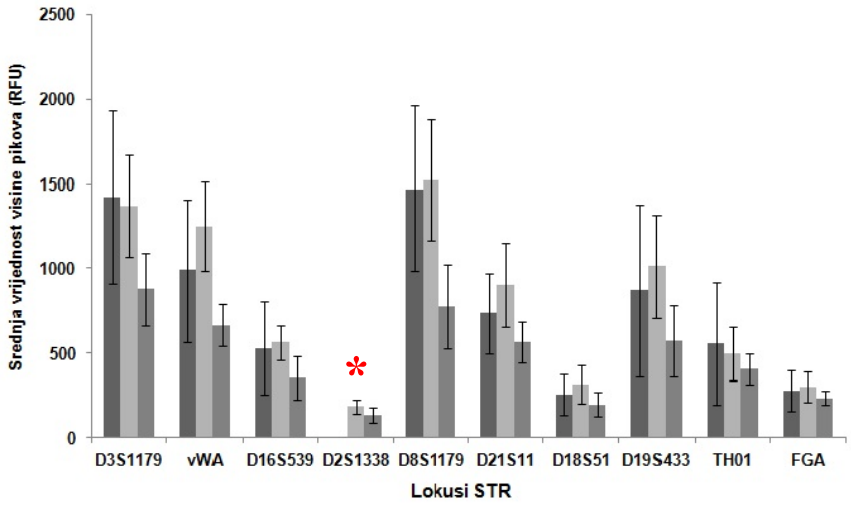
Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdice označavaju statističku značajnost u usporedbi s uzorcima bez pročišćavanja.
* = 0,05–0,01, ** = 0,01–0,001; *** = <0,001.

Slika 38. Koncentracija hematina (ng/µl) u uzorcima krvi

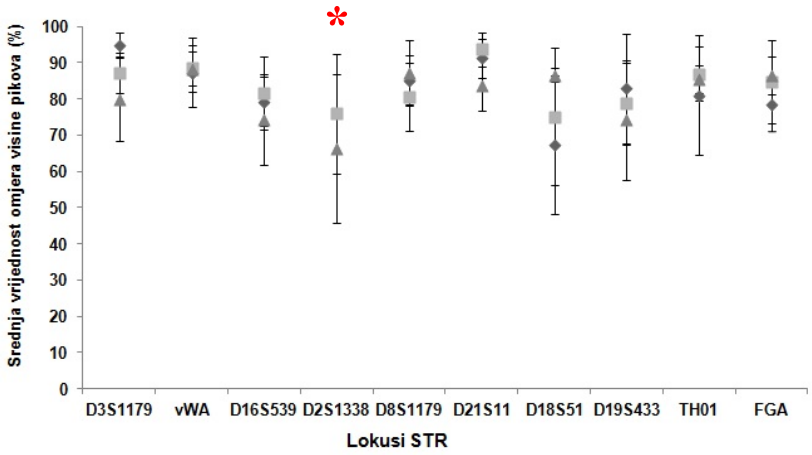
Daljnjom analizom umnožene DNA, uočeno je smanjenje visine pikova za veće lokuse (D2S1338, D18S51 i FGA), a jedan lokus (D2S1338) nije bio umnožen nakon

pročišćavanja aktivnim ugljenom (Slika 39A). To ukazuje na prisustvo određene koncentracije hematina u uzorcima, što je u skladu sa spektrofotometrijskim mjerenjima (Slika 38). Bez obzira na navedeno, nema statistički značajne razlike u visini pikova (P=0,5130), kao ni u omjeru visina pikova (P=0,9124) (Slike 39A i 39B).

A



B



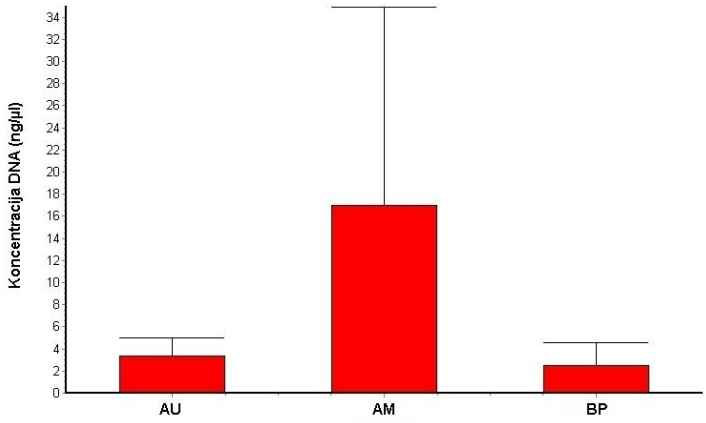
Legenda: ◆ **Aktivni ugljen,** ▭ **Amicon,** ▲ **Bez pročišćavanja.**
Samo dva uzorka pročišćena aktivnim ugljenom bila umnožena za lokus D2S1338 (označeno zvjezdicom).

Slika 39. Visine pikova (RFU) i omjeri visina pikova (%) za uzorke krvi

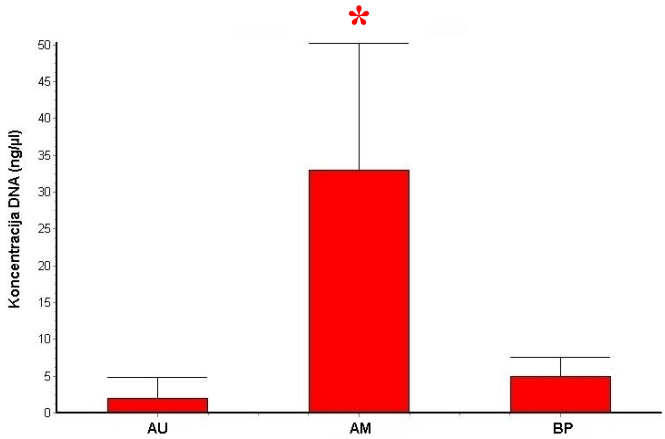
4.2.8 Uzorci epitela

Iz rezultata vidimo da su obje metode izolacije bile uspješne (Slike 40A i 40B). Ultrafiltracija Amiconom imala je pozitivan učinak na povećanje koncentracije DNA bez obzira na metodu izolacije, a statistički značajan učinak uočen za organsku izolaciju (n=15, P=0,0136). Nije bilo značajne razlike u koncentraciji DNA nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom bez obzira na metodu izolacije (P=0,2904). Isti efekt uočen je i pročišćavanjem Amiconom (P=0,3095), kao i u uzorcima bez pročišćavanja (P=0,1508).

A



B

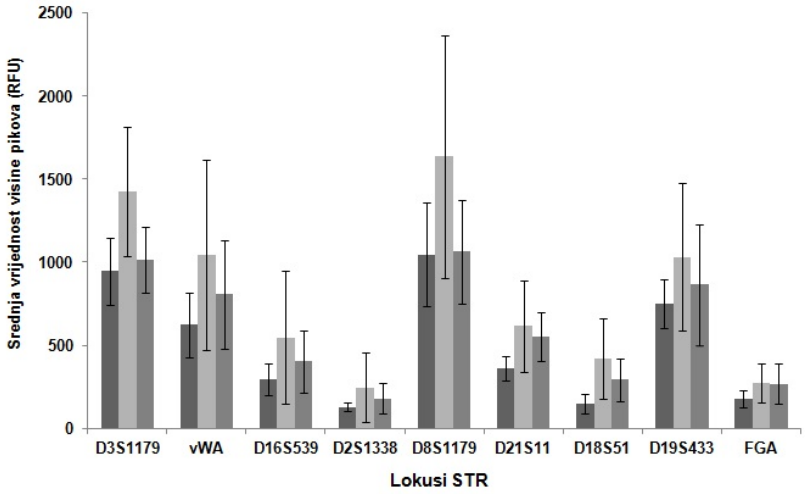


Legenda: **"AU"** – aktivni ugljen, **"AM"** – Amicon , **"BP"** – bez pročišćavanja.
Zvjezdica označava statističku značajnost u usporedbi s uzorcima pročišćenim aktivnim ugljenom, * = 0,05–0,01.

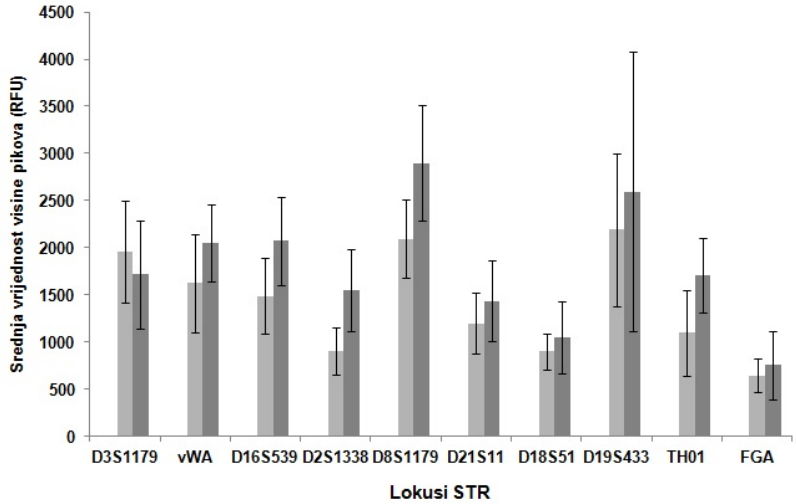
Slika 40. Koncentracija DNA (ng/µl) u uzorcima epitela izoliranih Chelexom (A) i organskom metodom (B)

Usporedbom kvalitete DNA izolirane Chelexom uočeno je da nema značajne razlike u visini pikova (P=0,3880) (Slike 41A), kao ni u njihovu omjeru (P=0,6007) (Slike 42A). Visine pikova niže su od optimalne visine osobito na lokusima D2S1338, D18S51 i FGA, a lokus TH01 nije uopće umnožen, što je značajno utjecalo na kvalitetu DNA.

A



B



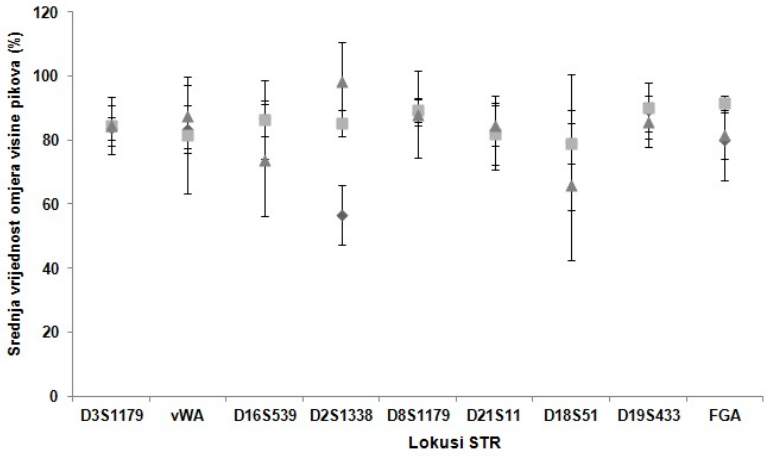
Legenda: ◆ **Aktivni ugljen,** **Amicon,** ▲ **Bez pročišćavanja.**
Samo dva uzorka pročišćena aktivnim ugljenom bila su potpuno umnožena, stoga se nisu uzeli u obzir za određivanje statističke značajnosti.

Slika 41. Visine pikova (RFU) za uzorke epitela

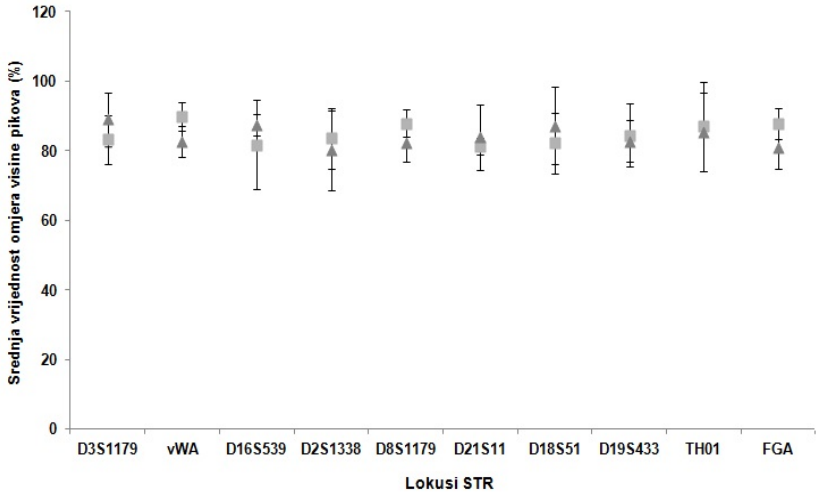
Optimalna visina pikova ostvarena je organskom izolacijom, pri čemu treba naglasiti da nije uočena statistički značajna razlika u visini pikova (P=0,2799), kao ni u omjeru visine pikova (P=0,6305), između Amicona i nepročišćenih uzoraka te je, za

razliku od pročišćavanja aktivnim ugljenom, ostvarena dobra kvaliteta DNA (Slike 41B i 42B).

A



B

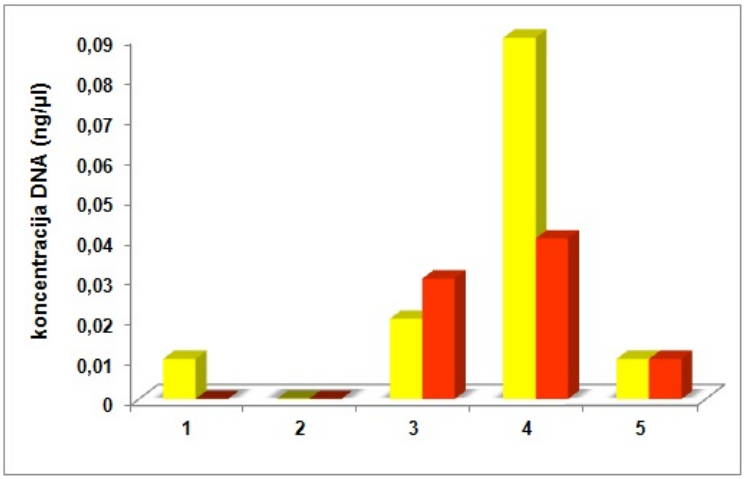


Legenda: ◆ **Aktivni ugljen,** ▭ **Amicon,** ▲ **Bez pročišćavanja.**
Samo dva uzorka pročišćena aktivnim ugljenom bila su potpuno umnožena stoga se nisu uzeli u obzir za određivanje statističke značajnosti.

Slika 42. Omjeri visina pikova (%) za uzorke epitela

4.3 Usporedba izolacije i pročišćavanja inhibiranih forenzičnih bioloških uzoraka

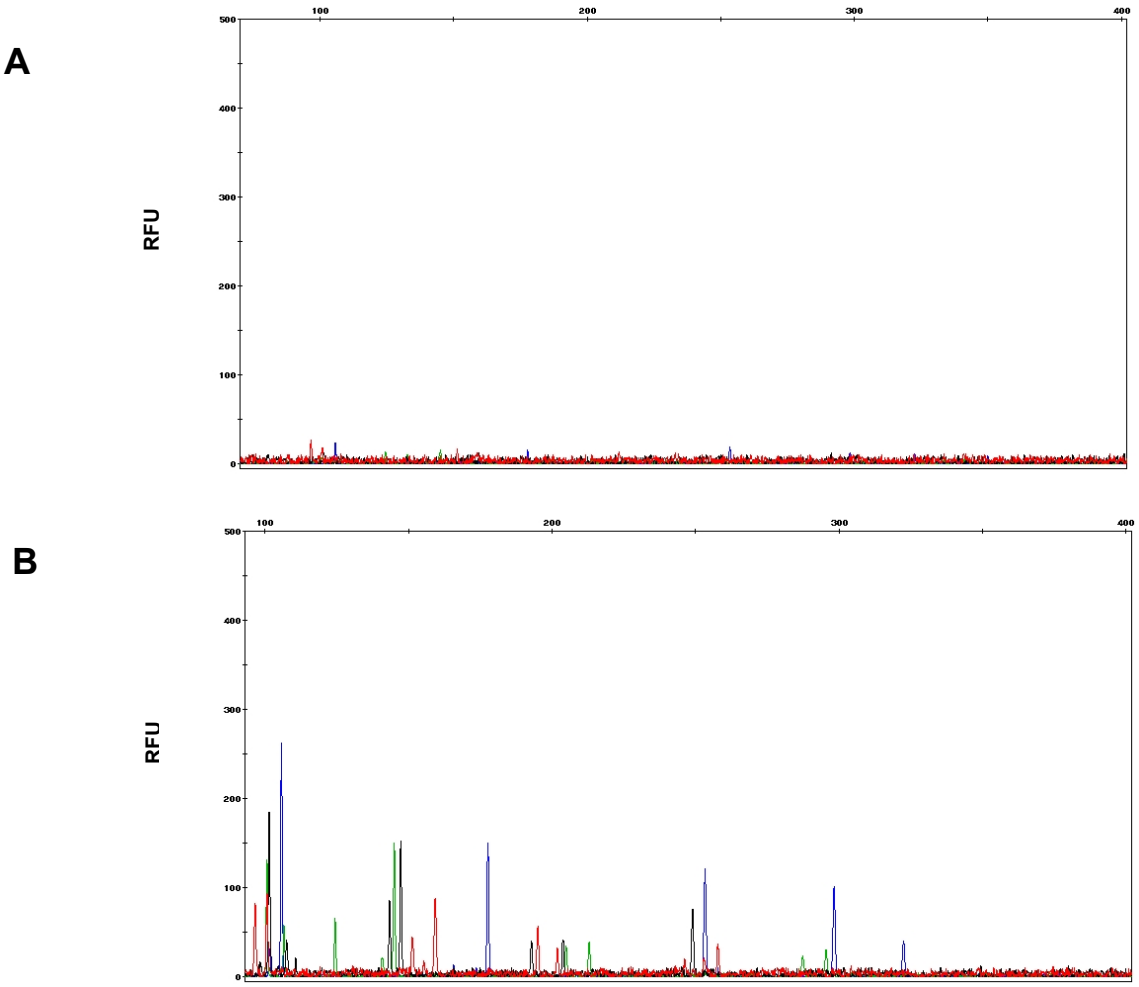
Nakon provedene kvantifikacije metodom qPCR, uočeno je da se izolacija i pročišćavanje komercijalno dostupnim setom (DNA IQ set za Maxwell sustav) statistički značajno ne razlikuju od kombinacije Chelexa/Aktivnog ugljena (P=0,5862) (Slika 43).



Legenda: **DNA IQ/Maxwell,** **Chelex/Aktivni ugljen**
1 – krv na crvenom ručniku**; 2** – krv na plavom ručniku**; 3** – krv na palici**; 4** – krv na palici**; 5** – bris s palice

Slika 43. Odnos koncentracija DNA u forenzičnim uzorcima

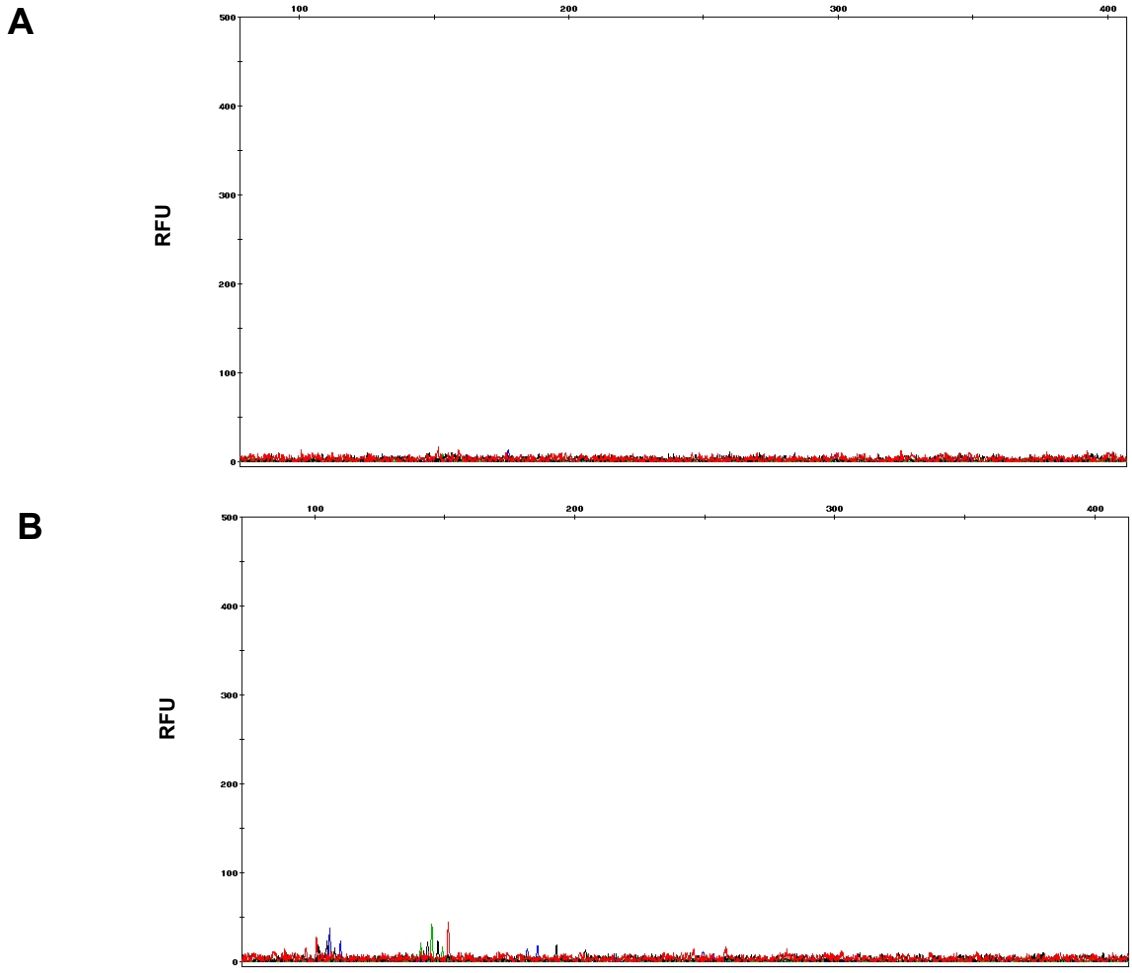
Usporedba elektroferograma, odnosno DNA profila, prikazana je na Slikama 44 – 48. Iz dobivenih rezultata vidimo da aktivni ugljen nije bio učinkovit kod uklanjanja crvene i plave tekstilne boje, što je rezultiralo nemogućnošću dobivanja DNA profila (Slike 44A i 44B).



Legenda: Umnoženi mikrosatelitni lokusi obilježeni su fluorescentnim bojama navedenima u zagradama. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338 (**6-FAM**); Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 (**VIC**); D22S1045, D19S433, TH01, FGA (**NED**); D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 (**PET**).

Slika 44. Elektroferogrami tragova krvi s crvenog ručnika izoliranih i pročišćenih Chelexom/Aktivnim ugljenom (A) i DNA IQ/Maxwellom (B)

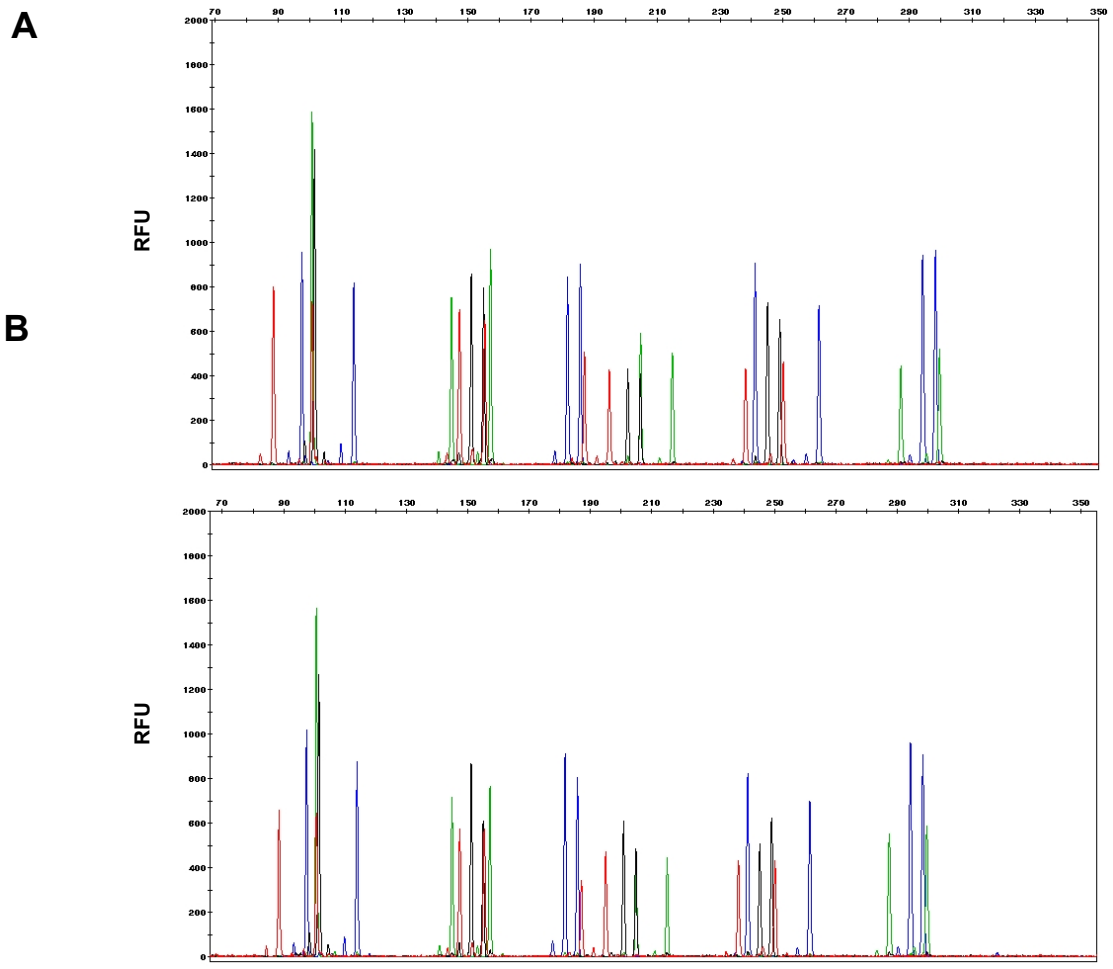
Također je važno napomenuti da je komercijalni set bio učinkovit u uklanjanju crvenog obojenja, ali je ispiranje kolone dovelo do značajnog gubitka DNA, što je u konačnici rezultiralo djelomičnim DNA profilom (Slika 44B). Iz traga krvi na plavom ručniku nije bilo moguće dobiti DNA profil niti jednom metodom (Slika 45A i 45B).



Legenda: Umnoženi mikrosatelitni lokusi obilježeni su fluorescentnim bojama navedenima u zagradama. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338 (**6-FAM**); Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 (**VIC**); D22S1045, D19S433, TH01, FGA (**NED**); D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 (**PET**).

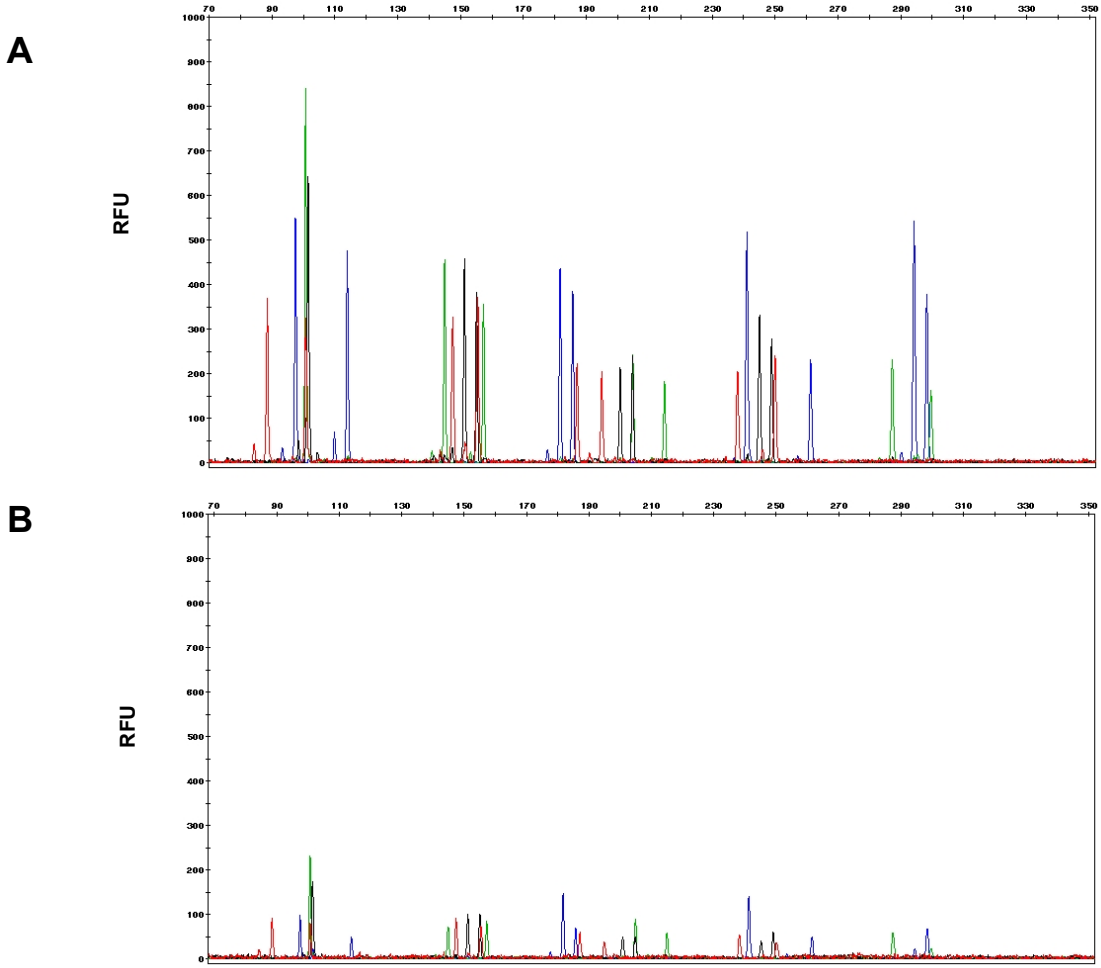
Slika 45. Elektroferogrami tragova krvi s plavog ručnika izoliranih i pročišćenih Chelexom/Aktivnim ugljenom (A) i DNA IQ/Maxwellom (B)

Usporedbom dobivenih DNA profila tragova krvi izuzetih s dva mjesta na drvenoj palici vidimo da su obje metode bile jednako učinkovite za prvi trag krvi (Slika 46), dok je kombinacija metoda Chelex/Aktivni ugljen pokazala bolji rezultat za drugi trag s palice (Slika 47).



Legenda: Umnoženi mikrosatelitni lokusi obilježeni su fluorescentnim bojama navedenima u zagradama. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338 (**6-FAM**); Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 (**VIC**); D22S1045, D19S433, TH01, FGA (**NED**); D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 (**PET**).

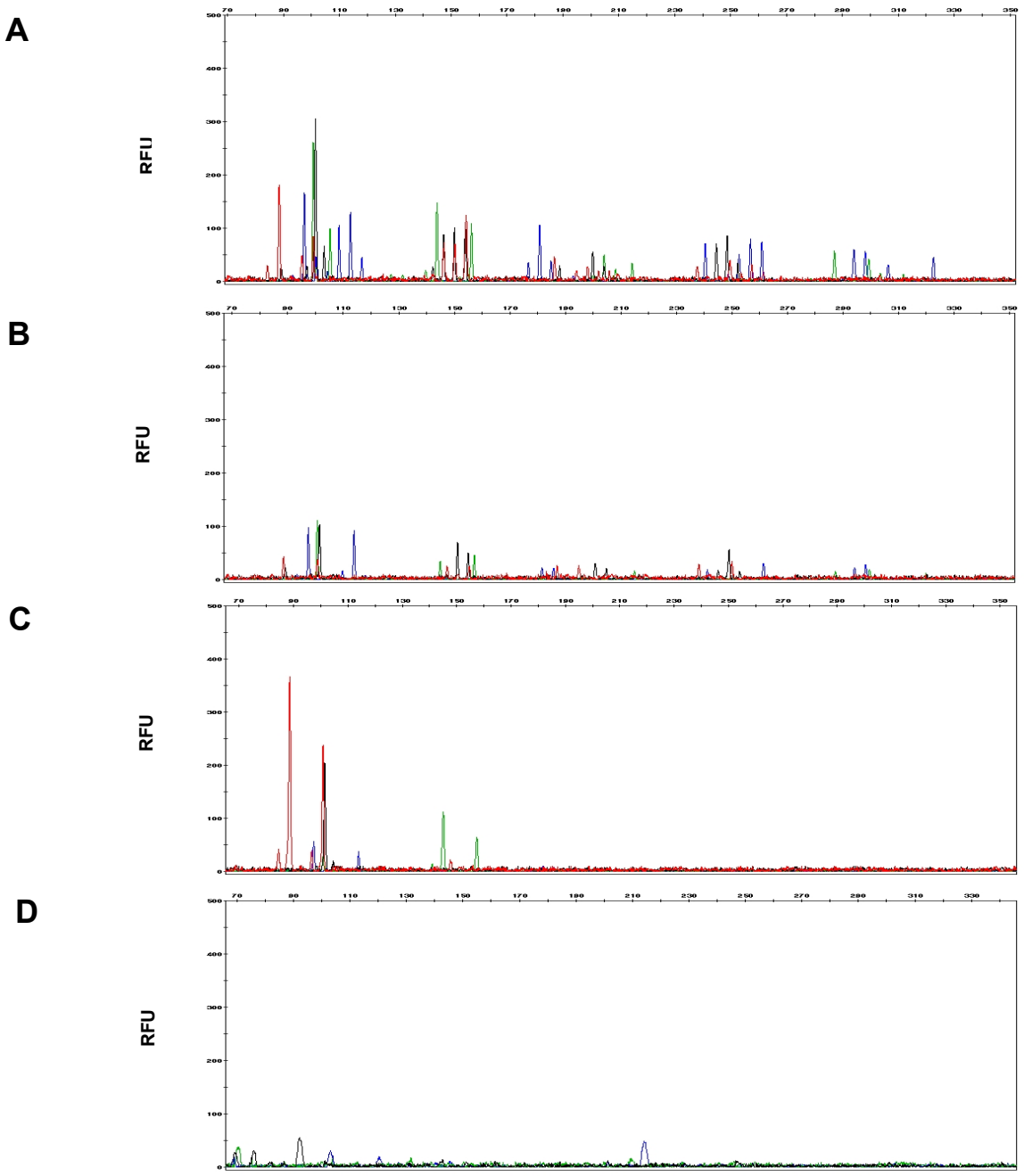
Slika 46. Elektroferogrami traga krvi s drvene palice izoliranog i pročišćenog Chelexom/Aktivnim ugljenom (A) i DNA IQ/Maxwellom (B)



Legenda: Umnoženi mikrosatelitni lokusi obilježeni su fluorescentnim bojama navedenima u zagradama. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338 (**6-FAM**); Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 (**VIC**); D22S1045, D19S433, TH01, FGA (**NED**); D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 (**PET**).

Slika 47. Elektroferogrami traga krvi s drvene palice izoliranog i pročišćenog Chelexom/Aktivni ugljenom (A) i DNA IQ/Maxwellom (B)

Vidimo da se Chelex/Aktivni ugljen pokazala učinkovitijom kombinacijom metoda u usporedbi s komercijalno dostupnim setom i automatskim sustavom pročišćavanja (Slika 48A i 48B), ali i Chelexom/Amiconom (Slika 48C) kao i organskom metodom u kombinaciji s Amicom (Slika 48D) za uzorke briseva s palice.



Legenda: Umnoženi mikrosatelitni lokusi obilježeni su fluorescentnim bojama navedenima u zagradama. D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338 (**6-FAM**); Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 (**VIC**); D22S1045, D19S433, TH01, FGA (**NED**); D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 (**PET**)

Slika 48. Elektroferogrami briseva s drvene palice izolirane i pročišćene Chelexom/Aktivnim ugljenom (A), DNA IQ/Maxwellom (B), Chelexom/Amiconom (C) i organskom metodom/Amiconom (D)

RASPRAVA

Dosada su objavljene studije u kojima se istražuje inhibitorni efekt poznatih inhibitora najčešće dodavanjem pojedinog inhibitora određene koncentracije u reakcijsku smjesu prilikom umnažanja metodom PCR (80–82, 88). Time se daje uvid u mehanizam inhibicije, kao i određivanje inhibitornih koncentracija čistih inhibitora, ali to ne predstavlja realni utjecaj inibitora na umnažanje DNA metodom PCR s obzirom na to da tragovi s mjesta počinjenja kaznenog djela sadrže smjesu različitih često nepoznatih inhibitora. Iz tog razloga u forenzičnim biološkim uzorima teško je predvidjeti koji su inhibitori i u kojim koncentracijama prisutni. Iako su tradicionalne metode izolacije genomske DNA dobre, često zahtijevaju dodatno pročišćavanje uzoraka prije umnožavanja DNA; stoga je poželjno imati metodu kojom se može ukloniti što više različitih inhibitora bez značajnog gubitka DNA. U literaturi se navode i brojne metode uklanjanja inhibitora iz bioloških uzoraka koje se razlikuju u efikasnosti, ali i u jednostavnosti pristupa (7, 94, 115–118).

U disertaciji je istraživana dosad neopisana primjena dobro poznatog adsorbensa – aktivnog ugljena. Iako ovim istraživanjem nije bilo moguće precizno odrediti koncentracije pojedinih inhibitora, pokazano je da se aktivni ugljen u prahu može koristiti za pročišćavanje inhibiranih bioloških tragova, osobito krvi kao najčešće vrste tragova koji su analizirani u forenzičnim laboratorijima.

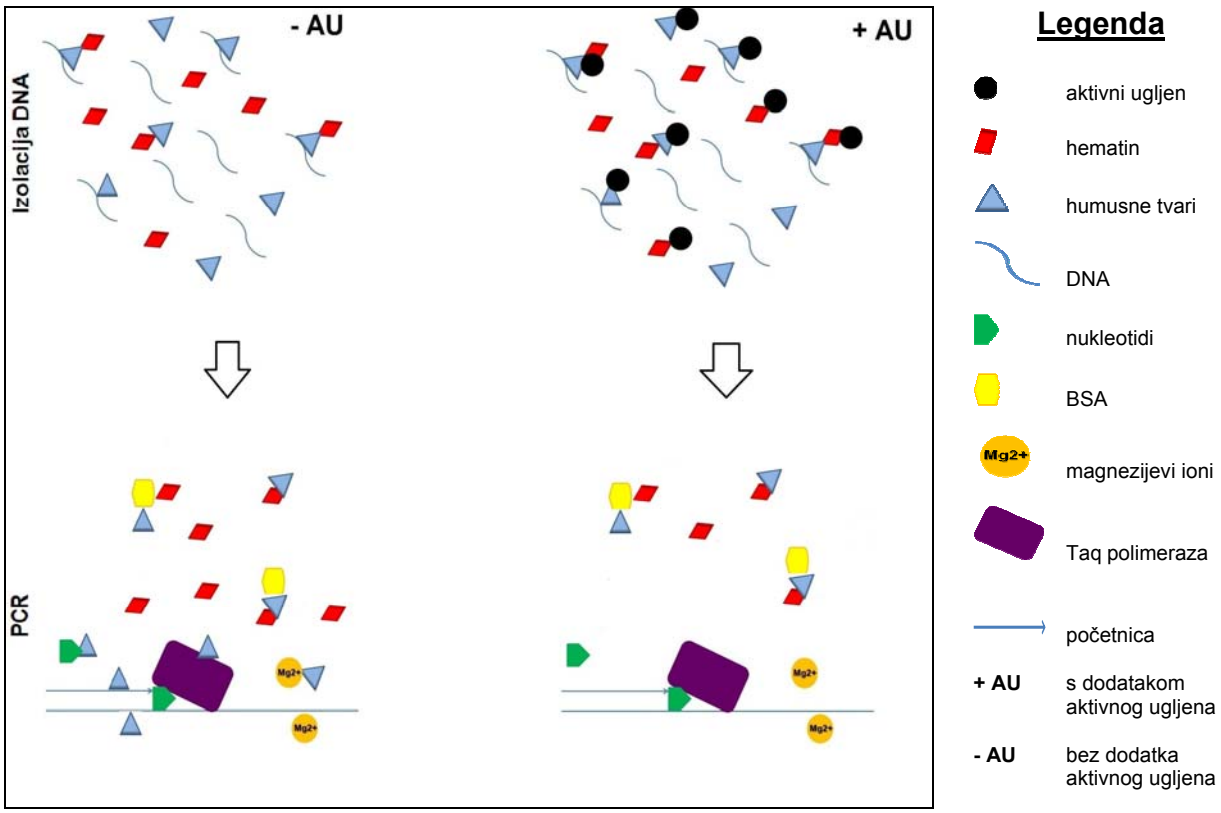
Istraživanje je podijeljeno u tri dijela:

- optimizacija pročišćavanja aktivnim ugljenom
- određivanje učinkovitosti pročišćavanja aktivnim ugljenom u pripremljenim biološkim uzorcima i
- primjena pročišćavanja aktivnim ugljenom na realnim forenzičnim uzorcima.

S obzirom na to da je ovo prvo dosada provedeno istraživanje uklanjanja inihibitora PCR-a temeljeno samo na fizikalnim i kemijskim svojstvima aktivnog ugljena, u prvom dijelu istraživanja bilo je potrebno utvrditi koji su optimalni uvjeti za učinkovitu adsorpciju inhibitora uz što manje gubitke DNA. Osim navedenog, tijekom optimizacije trebalo je utvrditi može li se spektrofotometrijski pratiti obojenost uzoraka, koja često ukazuje na prisustvo inhibitora (61). Istom metodom nastojala se odrediti i usporediti koncentracija inhibitora. Iz rezultata vidimo da se i niske koncentracije inhibitora mogu

odrediti ovom metodom, stoga je obojenje kao jedan od indikatora inhibicije prihvaćeno u daljnjem radu.

U drugom dijelu istraživanja primijenjeni su optimalni uvjeti temperature i vremena (37°C/60min) adsorpcije aktivnim ugljenom u svrhu pročišćavanja bioloških uzoraka i potom uspoređeni s komercijalnom metodom. Pokazali smo da je aktivni ugljen dobra metoda pročišćavanja krvi kontaminirane humusnim tvarima iz zemlje. Ranije je objavljeno da se adsorpcija humusnih tvari smanjuje s povećanjem vrijednosti pH, a prisustvo metalnih iona pojačava njihovu adsorpciju aktivnim ugljenom koji karakteriziraju makropore (123). Model kojim opisujemo adsorpciju humusnih tvari i hematina, kao i utjecaj pročišćavanja aktivnim ugljenom, prikazan je na Slici 49.



Slika 49. Model adsorpcije aktivnim ugljenom i utjecaj pročišćavanja na PCR

Inhibitori mogu na različite načine utjecati na uspješnost PCR-a, tako da se vežu na nukleotide, početnice, "olakšivače" (BSA), DNA, DNA polimerazu i keliraju metalne ione. Aktivni ugljen adsorbira humusne tvari, i hematin, smanjuje njihovu koncentraciju čime izravno utječe na amplifikaciju DNA.

Poznato je da hematin ima sposobnost otpuštanja iona željeza tijekom izolacije DNA, ali i da navedeni metalni ioni pozitivno utječu na adsorpciju humusnih tvari na aktivni ugljen (62, 79, 132). Tijekom alkalne izolacije Chelexom, ioni željeza vjerojatno stupaju u interakcije s humusnim tvarima i time pojačavaju njihovu adsorpciju na aktivni ugljen. To objašnjava značajno uklanjanje humusnih tvari aktivnim ugljenom u prisustvu hematina za razliku od uzoraka bez hematina. Važno je napomenuti da aktivni ugljen ima dobar afinitet za vezanje hematina, čija se koncentracija u otopini značajno smanjuje i bez prisustva humusnih tvari. Vidimo da je ultrafiltracija uspješna metoda za uklanjanje hematina i humusnih tvari, ali se ispiranjem membrane osim inhibitora smanjuje i koncentracija DNA.

U alkalnim uvjetima površina aktivnog ugljena postaje negativno nabijena, stoga se može očekivati da se smanjuje afinitet aktivnog ugljena za vezanje DNA. No s obzirom na to da humusne tvari imaju veliki afinitet za vezanje brojnih organskih molekula, između ostalih i DNA, to izravno utječe na gubitke DNA bez obzira na korištenu metodu pročišćavanja (58, 79, 133). Uvjeti izolacija Chelexom povoljno utječu na adsorpciju aktivnim ugljenom, za razliku od organske izolacije koja je bila neučinkovita za uzorke krvi sa i bez zemlje kao podloge. To je u skladu s literaturom koja navodi da nakon organske izolacije zaostaju inhibitori kao što su hematin, humusne tvari, ali i fenol (44, 46). U literaturi se također navodi da se hematin iz krvi ne može u potpunosti ukloniti Chelexom niti organskom izolacijom, ali obje su metode izolacije u kombinaciji s Centriconom-100® (Amiconom) učinkovite za dobivanje uzoraka dobre kvalitete (44, 49, 50, 59, 91). Bourke i sur. (35) pokazali su da se inhibitori iz zemlje i krvi nakon organske izolacije mogu neutralizirati ispiranjem uzoraka s NaOH, ali uz značajne gubitke DNA. U ovom istraživanju uočen je značajni gubitak DNA iz uzoraka krvi nakon pročišćavanja Amiconom, za razliku od aktivnog ugljena kod kojeg nije došlo do značajnog gubitka DNA. Kvaliteta DNA bila je dobra bez obzira na metodu pročišćavanja iako je visina pikova bila nešto niža za veće lokuse (D2S1338, D18S51 i FGA) zbog zaostalog hematina u otopini, što je u skladu s ranijim istraživanjima (1). Korišten je četiri puta veći volumen krvi u odnosu na ranije provedeno istraživanje u kojem je pokazano da je upravo hematin inhibitor koji onemogućuje umnažanje DNA u ovoj vrsti uzoraka (95), stoga ne iznenađuje činjenica da se u ovom istraživanju

organska izolacija krvi pokazala neučinkovitom, osim u kombinaciji s Amiconom i to za pročišćavanje uzoraka krvi koji su naneseni na traper kao podlogu. Nema značajne razlike u kvaliteti DNA nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom u usporedbi s komercijalno dostupnom kolonom bez obzira na vrstu uzoraka, osim za uzorke epitela. Organskom izolacijom ove vrste uzoraka pročišćenih Amiconom ostvarena je značajno veća koncentracija visokokvalitetne DNA. To se može objasniti činjenicom da fenol kao mala molekula prolazi kroz membranu, a DNA se koncentrira na membrani. Također je uočeno da uzorci epitela kontaminirani zemljom ne pokazuju značajnu razliku u koncentraciji DNA bez obzira na metodu pročišćavanja, ali je Amicon pokazao bolju učinkovitost uklanjanja humusnih tvari u usporedbi s aktivnim ugljenom. S obzirom na to da smo u ovom istraživanju mjerili ukupne fenole, korištenom metodom nije bilo moguće razlučiti u kolikoj mjeri zaostaje fenol odnosno humusne tvari, stoga ne čudi veća vrijednost ukupnih fenola nakon organske izolacije u odnosu na izolaciju Chelexom. Ranije smo utvrdili da aktivni ugljen efikasno uklanja humusne tvari, stoga pretpostavljamo da fenol koji je zaostao nakon izolacije nije bio uspješno uklonjen. Kao što je spomenuto, molekule fenola su male i vjerojatno se nisu adsorbirale na aktivni ugljen koji karakteriziraju makropore. S obzirom na to da je poznato da se male molekule uspješno uklanjaju aktivnim ugljenom s mikroporama, adsorpciju fenola potrebno je dalje istražiti.

Vidimo da se adsorpcijom učinkovito uklanjaju i tanini. Hematin pojačava adsorpciju humusnih tvari, ali ne utječe na adsorpciju tanina. S obzirom na sličnost u kemijskoj strukturi kao i mehanizmu djelovanja, predloženi model prikazan na Slici 49. može se primijeniti i za uklanjanje tanina, osim što u literaturi nije navedena interakcija tanina i hematina. Prethodno su objavljeni radovi koji ukazuju na dobru adsorpciju tanina na aktivni ugljen, ali i na interakciju tanina i DNA, što utječe na gubitke DNA koja je vezana na tanine (104, 134). Također je objavljeno da tanini stupaju u interakcije s BSA kao olakšivačem reakcije PCR (134). U usporedbi s aktivnim ugljenom, ultrafiltracijom je dobivena veća koncentracija DNA, što se također može objasniti prolaskom tanina i hematina kroz membranu uz istovremeno koncentriranje DNA na membrani. Pročišćavanjem oskudnih tragova epitela na drvu vidimo da je ostvarena niža visina

pikova od optimalne i neumnažanje jednog lokusa (D2S1338), što se može objasniti činjenicom da je riječ o uzorcima s vrlo malom koncentracijom DNA.

Indigo se nije mogao u potpunosti prevesti u *leuco*-indigo kao topljivi oblik, stoga se učinak pročišćavanja nije mogao kvantitativno odrediti. Kao što je već u uvodu spomenuto, plava boja koja zaostaje nakon izolacije DNA onemogućuje preciznu kvantifikaciju ove vrste uzoraka, što traper čini najproblematičnijom podlogom u ovom kao i u ranijim istraživanjima (2). Objavljeno je da obezbojenje uzoraka pomoću vodikovog peroksida, nakon organske izolacije, učinkovito uklanja ne samo hematin već i indigo boju (70). Amicon se pokazao uspješnom metodom pročišćavanja bez obzira na metodu izolacije DNA. Ranije smo naveli da aktivni ugljen uspješno adsorbira hematin, iako je Amicon učinkovitiji u uklanjanju indiga, koji kao mala molekula prolazi kroz membranu. U literaturi je navedeno da se tekstilne boje dobro adsorbiraju aktivnim ugljenom s mikroporama, a njihova se adsorpcija smanjuje s povećanjem vrijednosti pH i temperature (131, 135). S obzirom na to da aktivni ugljen koji smo koristili karakteriziraju makropore, najvjerojatnije nije postignuta adsorpcija indiga što je negativno utjecalo na umnožavanje DNA. Stoga bi se trebali provesti eksperimenti korištenjem aktivnog ugljena koji karakteriziraju mikropore, ali i različiti uvjeti adsorpcije (temperature i vrijeme).

U izoliranim uzorcima epitela na traperu kao podlozi nije se mogao donijeti zaključak o utjecaju pročišćavanja na koncentraciju DNA jer koncentracija DNA nije bila detektirana. Uzimajući u obzir da je riječ o oskudnim tragovima, potrebno je provesti dodatno istraživanje – koje uključuje veći broj uzoraka, ali i duže izlaganje epitela podlozi. Neučinkovito uklanjanje tekstilnih boja aktivnim ugljenom pokazano je i na forenzičnim uzorcima. Međutim, nužno je napomenuti da se ni komercijalni set za izolaciju i automatsko pročišćavanje (afinitetna metoda) nije pokazao uspješnim u uklanjanju tekstilnih boja. No, za razliku od tekstilnih boja, vidimo da je pročišćavanje tragova krvi/epitela s drvene podloge Chelexom/aktivnim ugljenom bilo učinkovitije od Amicona, kao i automatskog sustava za pročišćavanje.

Prednosti aktivnog ugljena u pročišćavanju bioloških uzoraka brojne su, a među njima treba istaknuti: jednostavnost, dostupnost, brzina, ekonomičnost i dobra reproducibilnost, osim u slučaju tamnoplavog trapera kao podloge. Jednostavnost

pristupa temelji se na inkubaciji izoliranih bioloških uzoraka s aktivnim ugljenom te izdvajanjem pročišćenog izolata kao supernatanta nakon centrifugiranja. Metoda je učinkovita za uklanjanje različitih inhibitora, osim u slučaju prisustva tekstilnih boja što treba dodatno istražiti.

U budućnosti je potrebno istražiti pročišćavanje oskudnih tragova epitela na različitim podlogama, tako da gubici DNA budu što manji s obzirom na to da tragovi s mjesta događaja uobičajeno sadrže vrlo male količine DNA (<1ng/µl). Optimizacija pufera u kojem će aktivni ugljen pokazivati neznatan afinitet za vezanje DNA, a veliki afinitet za vezanje različitih inhibitora, moglo bi biti jedno od rješenja navedenog problema. Do sada objavljeni radovi pokazuju da aktivni ugljen adsorbira EDTA (136), kao i proteinazu K (137), a navedena svojstva mogla bi se koristiti za formiranje modificiranog aktivnog ugljena s adsorbiranim kelatorom metalnih iona (EDTA) i imobiliziranom proteinazom K za uklanjanje proteina. Takav modificirani aktivni ugljen u optimiziranom puferu mogao bi se koristiti kao reagens za izolaciju DNA, zamjenjujući Chelex. Osim toga, potrebno je istražiti utjecaj pročišćavanja aktivnim ugljenom u uzorcima koji sadržavaju degradiranu DNA. Također je potrebno proučiti i adsorpciju ostalih poznatih inhibitora, kao i istražiti afinitet vezanja različitih inhibitora na aktivni ugljen, te u konačnici uvesti navedenu metodu u svakodnevni rad forenzičnog laboratorija.

ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja možemo zaključiti da se uklanjanje inhibitora umnažanja DNA pomoću aktivnog ugljena pokazalo kao jednostavna, brza, dostupna, ekonomična i reproducibilna metoda. Aktivni ugljen, kao inertni materijal, ne utječe na provedbu umnažanja DNA metodom PCR, kao ni na detekciju umnoženih mikrosatelitnih lokusa metodom kapilarne elektroforeze.

Provedena uspješna adsorpcija hematina iz krvi, kao najčešće vrste traga analiziranih u forenzičnim laboratorijima. Rezultati također ukazuju na to da je aktivni ugljen dobra metoda pročišćavanja krvi kontaminirane humusnim tvarima iz zemlje, i to bez značajnih gubitaka DNA. Adsorpcija humusnih tvari pospješena je prisustvom hematina, dok se tanini uspješno uklanjaju aktivnim ugljenom bez utjecaja hematina. Nema značajne razlike u kvaliteti DNA nakon pročišćavanja aktivnim ugljenom u usporedbi s komercijalnom metodom bez obzira na vrstu uzoraka, osim za uzorke epitela izolirane organskom izolacijom.

Ovaj rad predstavlja prvu primjenu aktivnog ugljena u pročišćavanju bioloških uzoraka koje je temeljeno samo na njegovim fizikalnim i kemijskim svojstvima. Unatoč dobrim rezultatima u uklanjanju ostalih istraživanih inhibitora, nedostatak metode leži u činjenici da aktivni ugljen nije bio efikasan i za uklanjanje indiga, najpoznatije tekstilne boje za bojenje trapera, kao ni fenola koji zaostaje nakon organske izolacije DNA stoga bi istraživanje trebalo usmjeriti na aktivni ugljen s manjom veličinom pora.

LITERATURA

1. Butler JM (2005) Forensic DNA Typing. 2nd edn. Elsevier Academic Press, London.
2. Opel KL, Chung D, McCord BR (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using Real Time PCR. J Forensic Sci 55:25–33.
3. Tilstone WJ (2006) Forensic science: an encyclopedia of history, methods, and techniques. ABC-CLIO Inc., Santa Barbara.
4. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC (1949) Sickle cell anemia, a molecular disease. Science 110:543–548.
5. Jobling MA, Gill P (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. Nat Rev Genet 5:739–751.
6. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314–331.
7. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature 314:67–73.
8. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985) Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature 318: 577–579.
9. Debrauwere H, Gendrel CG, Lechat S, Dutreix M (1997) Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. Biochemie 79:577–586.
10. Stephan W, Walsh B (2007) Repetitive DNA: Evolution. U: Encyclopedia of life sciences,JohnWiley&Sons.http://www.els.net[doi:10.1002/9780470015902.a0001700.pub2.
11. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 51:263–273.
12. Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155:335–350.
13. Page RDM, Holmes EC (1998) Molecular Evolution – A Phylogenetic Approach. Blackwell Science, Oxford.

14. Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res 17:6463–6471.
15. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921.
16. Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol. 11: 2453–2465.
17. Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. Mol Biol Evol 4: 203–221.
18. Schlotterer C, Pemberton J (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. EXS 69: 203–214.
19. Smith GP (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. Science 191: 528–535.
20. Jeffreys AJ, Royle NJ, Wilson V, Wong Z (1988) Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. Nature 322: 278–281.
21. Bruford MW, Wayne RK (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. Curr Opin Genet Dev 3: 939–943.
22. Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. U: Goldstein DB i Schlőtterer C (eds.) Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press. New York.
23. Moxon ER, Wills C (1999) DNA Microsatellites: Agents of Evolution? Scientific American. 1999: 72–77.
24. Edwards A, Civitello A, Hamonnd HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet 49:746–756.
25. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chraborty R (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 12:241–253.
26. Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. Nature 352:427–429.

27. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A (1992) Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. Forensic Sci Int 56:65–76.
28. Butler JM (2012) Advanced topics in forensic DNA Typing: Methodology. Elsevier Academic Press, London.
29. Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM (2001) STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. Nucleic Acids Res 29:320–322.
30. Kathleen A, Mayntz-Press MS, Ballantyne J (2007) Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems. J Forensic Sci 52:1025–1034.
31. Szibor R (2007) X-chromosomal markers: Past, present and future. Forensic Sci Int Genet 1:93–99.
32. Juusola J, Ballantyne J (2005) Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, Forensic Sci Int 152:1–12.
33. Fang R, Manohar CF, Shulse C, Brevnov M, Wong A, Petrauskene OV, Brzoska P, Furtado MR (2006) Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. Int Congr Ser 1288:685–687.
34. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J (2009) Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. Anal Biochem 387:303–314.
35. Bourke MT, Scherczinger CA, Ladd C, Lee HC (1999) NaOH treatment to neutralize inhibitors of *Taq* polymerase. J Forensic Sci 44:1046–1050.
36. Tsai YL, Olson BH (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58:2292–2295.
37. Hedman J (2011) DNA Analysis of PCR-Inhibitory Forensic Samples (doktorska disertacija). Lund, Lund University.
38. http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m04_02_a.htm (pristup 08.04.2012.)
39. Cattaneo C, Gelsthorpe K, Sokol RJ (2000) DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. U: Meyers RA (ed). Encyclopedia of Analytical Chemistry: Application, Theory and Instrumentation, John Wiley and Sons, New York.

40. Kochl S, Niederstatter H, Parson W (2005) Forensic DNA Typing Protocols. U: Carracedo A (ed.) Methods in Molecular Biology, Humana Press, New Jersey.
41. http://www.merckmillipore.com/life-science-research/proteinase-k-lyophilized/EMD_BIO-70663/p_29Wb.s1LZV0AAAEWSmIfVhTm (pristup 08.04.2012.)
42. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
43. Katcher HL, Schwartz I (1994) A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. Biotechniques 16: 84–92.
44. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10:506–513.
45. BioRad Laboratories. Chelex 100 and Chelex 20 Chelating Ions Exchange Resin Instruction Manual (2000).
46. Moreira D (1998) Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nucleic Acids Res 26:3309–3310.
47. Kreader CA (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol 62:1102–1106.
48. Wilde J, Eiden J, Yolken R (1990) Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. J Clin Microbiol 28:1300–1307.
49. Jung JM, Comey CT, Baer DB, Budowle B (1991) Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ-alpha-gene. Int J Legal Med 104:145–148.
50. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA (1998) QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. J Forensic Sci 43:1024–1030.
51. Ong YL, Irvin A (2002) Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. Hematology 7:59–67.
52. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. Genome Res 6:986–994.

53. Jothikumar P, Hill V, Narayanan J (2009) Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. Biotechniques 46:519–524.
54. Green RL, Roinestad IC, Boland C, Hennessy LK (2005) Developmental validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. J Forensic Sci 50:1–16.
55. Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW (1993) Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 $[AATG]_n$ and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. Am J Hum Genet 53:953–958.
56. Gill P, Sparkes R, Kimpton C (1997) Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. Forensic Sci Int 89:185–197.
57. ENFSI Working Group (2010) Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process.
58. Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63:3741–3751.
59. Eilert KD, Foran DR (2009) Polymerase resistance to polymerase chain reaction inhibitors in bone. J Forensic Sci 54:1001–1007.
60. Rädstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C (2004) Pre-PCR processing: strategy to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol 26:133–146.
61. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci 39:362–372.
62. Abu AW, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 39:485–493.
63. Abu AW, Jönsson L, Rådström P (2000) Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J Clin Microbiol 38:345–350.

64. Satsangi J, Jewell DP, Welsh K, Bunce M, Bell JI (1994) Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509–1510.
65. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E (2000) Melanin binds reversibly to termostable DNA polymerase and inhibits its activity. Biochem Biophys Res Commun 271:726–730.
66. Scholz M, Giddings I, Pusch CM (1998) A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. Anal Biochem 259:283–286.
67. Di Martino D, Giuffre G, Staiti N, Simone A, Todaro P, Saravo L (2004) Laser microdissection and DNA typing of cells from single hair follicles. Forensic Sci Int 146:S155–S157.
68. Katcher HL, Schwartz I (1994) A distinctive property of *Tth* DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. Biotechniques 16:84–92.
69. Akane A, Shiono H, Matsubara K, Nakamura H, Hasegawa M, Kagawa M (1993) Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis. J Forensic Sci 38:691–701.
70. Akane A (1996) Hydrogen peroxide decomposes the heme compound in forensic specimens and improves the efficiency of PCR. Biotechniques 21:392–394.
71. Abu Al-Soud, Lantz PG, Bäckman A, Olcén P, Rådström P (1998) A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. J Microbiol Methods 32:217–224.
72. Abu AW, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 39:485–493.
73. Scholz M, Giddings I, Pusch CM (1998) A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. Anal Biochem 259:283–286.
74. Kim S, Labbe RG, Ryu S (2000) Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol 66:1213–1215.
75. Bélec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piédouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK (1998) Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: A limitation for

PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *thermus thermophilus* polymerase. Muscle Nerve 21:1064–1067.

76. Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of Listeria monocytogenes in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett Appl Microbiol 22:153–158.
77. Tebbe CC, Vahjen W (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl Environ Microbiol 59:2657–2665.
78. Watson RJ, Blackwell B (2000) Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Can J Microbiol 46:633–642.
79. Zipper H, Buta C, Lämmle K, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2003) Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. Nucleic Acids Res 31:e39.
80. Sutlović D, Definis Gojanović M, Anđelinović Š, Gugić D, Primorac D (2005) Taq Polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. Croat Med J 46:556–562.
81. Sutlović D, Definis Gojanović M, Anđelinović Š (2007) Rapid extraction of human DNA containing humic acid. Croat Chem Acta 80:117–120.
82. Sutlović D, Gamulin S, Definis Gojanović M, Gugić D, Anđelinović Š (2008) Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics, Electrophoresis 29:1467–1472.
83. Matheson CD, Gurney, C, Esau N, Lehto R (2010) Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. Open Enzym Inhib J 3:38–45.
84. Demeke T, Adams RP (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Biotechniques 12:332–4.
85. Monteriro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud F (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* Model. J Clin Microbiol 35:995–998.

86. Larkin A, Harbison SA (1999) An improved method for STR analysis of bloodstained denim. Int J Legal Med 112:388–390.
87. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB (1991) Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. J Clin Pathol 44:360–365.
88. Kontanis EJ, Reed FA (2006) Evaluation of Real-Time amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. J Forensic Sci 51:795–803.
89. Panas M, Łukaszewicz JP (1999) The stabilising influence of hematin on the properties of the oxygen-sensitive carbon electrode, Sensors and Actuators B: Chemical 55:1–8
90. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6538715#x291 (pristup 08.04.2012.)
91. Applied Biosystems (2010) AmpF*l*STR®SGM Plus® Amplification Kit User's Manual, Foster City
92. Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel S (1994) DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. J Forensic Sci 39:1254–1269.
93. Applied Biosystems (2006) Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit User's Manual. Foster City
94. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail E, Barnes WM (2009) Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. Nucleic Acids Res 37:e40.
95. Stevenson FJ (1994) Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, 2nd edn. John Wiley & Sons, New York.
96. http://www.humicsubstances.org/whatarehs.html (pristup 08.04.2012.)
97. Schnitzer M, Khan SU (1972) Humic Substances in the environment. Dekker, New York.
98. Buffle JAE (1977) Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux. Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquée de A.G.H.T.M. l'Université d'Orsay.

99. Tipping E (2004) Cation binding by humic substances. Cambridge University Press, Cambridge.
100. Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16:144–158.
101. Sharma OK, Krishnan PS (1966) Colorimetric estimation of humic acid with the phenol reagent of Folin and Ciocalteu. Anal Biochem 14:11–16.
102. Waterhouse AL (2002) Determination of Total Phenolics. U: Wrolstad RE (ed.) Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, New York.
103. Box JD (1983) Investigation of the Folin-Ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. Water Res 17:511–525.
104. Mohan SV, Karthikeyan J (1997) Removal of lignin and tannin colour from aqueous solution by adsorption onto activated charcoal. Environmental Pollution 97:183–187.
105. Čavlović J, Anić I (2008) Gospodarjenje z bukovijo na Hrvaškem: U: Bončina A. (ur.) Bukovi gozdovi: ekologija i gospodarjenje. Zbornik sažetaka. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 56–59.
106. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=57260395&loc=es_rss (pristup 08.04.2012.)
107. Gilbert KG, Cook DT (2001) Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential. Plant Growth Regul 34: 57–69.
108. Del Rio SA, Marino MA, Belgrader P (1996) PCR- based human leukocyte antigen (HLA) DQα typing of bloodstained light and dark denim fabric. J Forensic Sci 41:490–492.
109. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53789166&loc=es_rss (pristup 08.04.2012.)
110. Shutler GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh S, Johnston E, Halverston J. (1999) Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. J Forensic Sci 44:623–626.

111. Powell HA, Gooding CM, Garrett SD, Lund BM, McKee RA (1994) Proteinase inhibition of the detection of Listeria monocytogenes in milk using t he polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 18:59–61.
112. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. (1991) Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. J Forensic Sci 36:1649–1661.
113. Abu Al-Soud W, Radstrom, P (2000) Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in presence of blood, feces and meat. J Clin Microbiol 38(12):4463–4470.
114. Simon MC, Gray DI, Cook N (1996) DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon, Appl Environ Microbiol 62:822–824.
115. Young CC, Burghoff RL, Keim LG, Minak-Bernero V, Lute JR, Hinton SM (1993) Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. Appl Environ Microbiol 59:1972–1974.
116. Jackson CR, Harper JP, Willoughby D, Roden EE, Churchill PF (1997) A Simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. Appl Environ Microbiol 63:4993–4995.
117. Braid MD, Daniels LM, Kitts C (2003) Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. J Microbiol Meth 52:389–393.
118. Verma D, Satyanarayana T. (2011) An Improved Protocol for DNA Extraction from Alkaline Soil and Sediment Samples for Constructing Metagenomic Libraries. Appl Biochem Biotechnol 165:454–464.
119. Hedman J, Nordgaard A, Rasmusson B, Ansell R, Rådström P (2009) Improved forensic DNA analysis through the use of alternative DNA polymerases and statistical modeling of DNA profiles. Biotechniques 47:951–958.
120. AmpFlSTR®NGM™ PCR Amplification Kit User's Manual (2011), Applied Biosystems, Foster City.
121. Howell JA (1997) Ultraviolet and Visible Molecular Absorption Spectrometry. U: Settle FA (ed.) Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Prentice-Hall, New Jersey, 483–498.

122. Thomas O, Burgess T (2007) UV-visible spectrophotometry of water and wastewater. 1st edn. Elsevier, Nederlands.
123. Bansal RC, Gayal M (2005) Activated carbon adsorption. Taylor & Francis, New York.
124. Kumara AG, Swarnalathab S, Kamatchia P, Sekaranb G (2009) Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. Biochem Eng J 43:185–190.
125. Vernon L, Snoeyink R, Summers S (1999) Adsorption of organic compounds. U: Water Quality & Treatment, A handbook of Community Water Supplies, 5th edn. McGraw-Hill, Washington.
126. Satoh N, Takahira H, Terato K (1979) Blood purification with coated activated carbon spheres (US Patent).
127. Coelho C, Oliveira AS, Pereira MFR, Nunes OC (2006) The influence of activated carbon surface properties on the adsorption of the herbicide molinate and the bio-regeneration of the adsorbent. J Hazard Mater 138:343–349.
128. Wang SY, Tsai MH, Lo S, Tsai MJ (2008) Effects of manufacturing conditions on the adsorption capacity of the heavy metal ions by Makino bamboo charcoal. Bioresour Technol 16:1–7.
129. Kim JY, Cho C, Cho BN (2010) Plasmid DNA of high quality purified by activated charcoal. J Biosci Bioeng 110:608–613.
130. Iqbal MJ, Ashiq MN (2007) Adsorption of dyes from aqueous solutions on activated charcoal. J Hazard Mater B139:57–66.
131. Tissue and Hair Extraction Kit for use with DNA IQ™, Promega, Madison, SAD.
132. Godini H, Khorramabady GS, Mirhosseini SH (2011) The application of iron-coated activated carbon in humic acid removal from water. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology 6: V1-32-6.
133. Saeki K, Ihyo Y, Sakai M, Kunito T. Strong adsorption of DNA molecules on humic acids (2011) Environ Chem Lett 9:505–509.
134. Labieniec M, Gabryelak T (2006) Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. J Photochem Photobiol B: Biology 82:72–78.

135. Zaharia C, Suteu D (2012) Textile Organic Dyes – Characteristics, Polluting Effects and Separation/Elimination Procedures from Industrial Effluents – A Critical Overview. U: Puzyn T (ed.) Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention – Environmental and Analytical Update. InTech, 55–86.
136. Zhu HS, Yang XJ, Mao YP, Chen Y, Long YL, Yuan WK (2011) Adsorption of EDTA on activated carbon from aqueous solutions. J Hazard Mater 185:951–957.
137. Kumar AG, Swarnalathab S, Kamatchia P, Sekaranb G (2009) Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. Biochem Eng J 43:185–190.

ŽIVOTOPIS

Lucija Barbarić (rođ. Beneti)

Datum rođenja: 30. prosinac 1981. godine

Mjesto rođenja: Zadar, Hrvatska

Obrazovanje

2008. –	izrada doktorske disertacije u Odsjeku bioloških vještačenja Centra za forenzična ispitivanja i istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić", mentor: prof. dr. sc. Zorana Grubić
2006. – 2008.	znanstveni novak – asistent u Laboratoriju za genetiku i biologiju mikroogranizama na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
2006.	diploma Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, studij Biotehnologije, smjer biokemijsko-mikrobiološki
2004. – 2005.	izrada diplomskog rada na Institutu za veterinarsku biokemiju i molekularnu biologij, Sveučilišta u Zürichu, Švicarska, mentori prof. dr. sc. Igor Štagljar / prof. dr. sc. Zoran Zgaga
2000. – 2006.	Prehrambeno-biotehnološki fakultet, studij Biotehnologije, smjer biokemijsko-mikrobiološki
1996. – 2000.	Gimnazija Jurja Barakovića, Zadar
1988. – 1996.	Osnovna škola "Petar Lorini", Sali, Dugi otok

Stipendije i nagrade

2004. – 2006.	stipendija Biotehničke zaklade
2001. – 2005.	stipendija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa
2003.	rektorova nagrada
2002.	dekanova nagrada za najbolje studente

Sudjelovanje u nastavi

2006. – 2007.	asistentica na praktikumu iz kolegija Molegularna genetika na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Objavljeni radovi

2007 Suter B, Fetchko M, Imhof R, Graham CI, Stoffel-Studer I, Zbinden C, Raghavan M, Lopez L, Beneti L, Hort J, Fillingham J, Greenblatt JF, Giaever G, Nislow C, Stagljar I, Examining protein-protein interactions using endogenously tagged yeast arrays: The Cross-and-Capture system, Genome Res 17: 1774–1782.

Sudjelovanje u radionicama

2012. "Bone Workshop 2012", Prag, Češka

2012. "Forensic Genomics", Den Haag, Nizozemska

2007. "Functional Genomics and Proteomics in Molecular Medicine", MedILS, Split, Hrvatska

Kongresna priopćenja

2012 Ninčević Grassino A, Beneti L, Fakin Ž, Grabarić Z, Grabarić BS. Određivanje glukoze u hrvatskim vinima amperometrijskim biosenzorom i spektrofotometrijski, XIV. Ružičkini dani, Vukovar, Hrvatska.

2012 Ninčević Grassino A, Beneti L, Fakin Ž, Grabarić Z, Grabarić BS. Amperometric biosensor with glucose oxidase entrapped in inorganic hydrogel for determination of glucose in croatian wines. Biosensors, Cancun, Mexico.

2011 Beneti L, Ninčević Grassino A, Grabarić Z, Grabarić BS. Application of Biosensor for Determination of Glucose in Croatian Wines. World Congress of Vine and Wine, Porto, Portugal.

2007 Zgaga Z, Štafa A, Lisnić B, Beneti L, Svetec I. Ends-out recombination as a source of genetic duplications in yeast. Central European Symposium on Industial Microbiology and Microbial Ecology, Zadar, Hrvatska.

2006 Suter B, Fetchko M, Imhof R, Stoffel-Studer I, Zbinden C, Beneti L, Hort J, Stagljar I. Examining Protein Interactions Using the Large-Scale Pull-down Approach and Endogenously Tagged Yeast Strains: The 'Cross and Capture' System. Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting Princeton University Princeton, New Jersey, SAD.