

Postupci pripreme zuba za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNK)

Željka Presečki¹
Hrvoje Brkić¹
Dragan Primorac²
Irena Drmić²

¹Zavod za dentalnu antropologiju, Katedra za forenzičku stomatologiju Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
²Laboratorij za kliničku i sudsku medicinu Klinička bolnica Split

Sažetak

U ovoj je radnji i teoretski i praktički prikazana vrijednost koju zub ima u identifikaciji ljudi nepozna identiteta.

Teoretski je pokazana razlika između genomske i mitohondrijske DNK. Ta se razlika odnosi na njihovu trajnost, svojstva koja nose u sebi, i njihovu vrijednost u identifikaciji. Uz tu razliku iznesena je mikroanatomija zuba, moguće lokacije pronalaska stanica u zubu i načini prikupljanja materijala za izolaciju DNK iz zuba.

U praktičnom dijelu iznesene su metode koje su upotrebljene u izolaciji DNK iz zuba u pojedinim slučajevima. Za dobivanje materijala iz zuba primijenjena je metoda vodoravnog presjeka u području zubnoga vrata. Iz materijala izolirana je genomska DNK s pomoću dviju organskih fenol-kloroform metode. Rezultati su prikazani na 1 postotnom agaroznom gelu i snimljeni Polaroid kamerom.

Ključne riječi: DNK, zub, identifikacija, forenzička stomatologija, AMEL gen, izolacija DNK, fenol-kloroform organska metoda, horizontalni presjek.

Acta Stomatol Croat
2000; 15-20

PRETHODNO PRIOPĆENJE
Primljeno: 9. veljače 2000.

Adresa za dopisivanje:

Hrvoje Brkić
Zavod za dentalnu antropologiju
Katedra za forenzičku stomatologiju
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

Kasnih osamdesetih - razvitkom tehnologije koja je brža, osjetljivija i specifičnija - raščlambe deoksiribonukleinske kiseline (DNK), unijele su revoluciju u područja forenzičke medicine i stomatologije, antropologije i arheologije, te učinile identifikaciju lakšom i sigurnijom. Do tada se je u forenzičkoj stomatologiji upotrebljavala isključivo dentalna identifikacija, za koju je bitno postojanje prijesmrtnih dentalnih podataka (1,2).

DNK je molekula koja izgrađuje gene, a nasljedna informacija koju gen nosi u sebi očituje

se u nasljednim obilježjima. Diploidna struktura genomske deoksiribonukleinske kiseline (gDNK) nalazi se u jezgri svih somatskih stanica. Većina ljudskih stanica sadrži mitohondrije u citoplazmi, a svaki mitohondrij sadrži više mitohondrijalnih mtDNK molekula.

Postojanje velikoga broja mitohondrija povećava vjerojatnost da će mtDNK ostati duže razdoblje sačuvana. Ona je jedini način identifikacije ako postoji više naraštaja između ljudi čije se DNK uspoređuju (3,4).

Uz DNK tipiziranje, otkriće AMEL gena još je više olakšalo da se otkrije spol nepoznate osobe

(5,6). Osim toga i nova metoda pod imenom lančana reakcija polimeraze (PCR), omogućila je iskorištavanje i vrlo malih količina DNK (7,8,9,10).

Mikroanatomija zuba vrlo je važna u što boljem uzimanju uzorka za DNK ekstrakciju, kao i metode kojima se dolazi do uzorka.

Pulpna komorica, dentinski prah, dentinsko-cementni prah, cement ili pripadajuća kost, parodontna vlakna mogu biti uzorci za izolaciju. Ipak se pulpo-dentinski prah pokazao najboljim uzorkom genomske DNK i mitohondrijske DNK zato jer bolje čuva strukturu izolirane DNK i jer je rijetko kontaminiran neljudskom DNK (11,12,13,14).

Postupci koji se upotrebljavaju za izolaciju DNK iz zuba jesu: drobljenje zuba, uobičajeni endodontski pristup, okomiti presjek, te vodoravni presjek u području zubnoga vrata.

Najbolji se je pokazao upravo vodoravni presjek u području zubnoga vrata jer omogućuje pristup rotacijskim instrumentima do dentina unutar korijenskih kanala, odvojen pristup cementu zuba, a ujedno čuva i ne mijenja strukturu zubne krune bitne za morfološku identifikaciju (14,15,16). Svrha ovoga rada bila je opisati te eksperimentalno izolirati genomsku DNK izvađenu iz stanica zubne pulpe i dentinsko-cementnog praha na nekoliko slučajeva.

Ispitanici i metode

Uzorci za izolaciju genomske DNK bili su tri intaktna zuba: gornji prvi lijevi pretkutnjak, -24; gornji drugi lijevi kutnjak, -27; gornji prvi lijevi pretkutnjak, -24. Zubi su iz ortodontskih razloga izvađeni u Zavodu za oralnu kirurgiju klinike za stomatologiju KBC-a u Zagrebu. Tretirani su s 10-postotnim natrij-kloridom (NaCl). Pregledom je ustanovljeno da nema karijesa ili ispuna.

Uzorak broj 1, gornji pretkutnjak, težio je 1360 mg (Slika 1); broj 2, gornji kutnjak s nezavršenim rastom korijena (2050 mg) (Slika 2); broj 3, gornji pretkutnjak (1510 mg) (Slika 3). Uzorci su prerezani dijamantnom pločicom na mikromotoru u području caklinsko-dentinskog spojišta vodoravno, te je iz prostora pulpne komorice i korijena izvađena pulpa i stavljena u Eppendorf tube (uzorci označeni kao



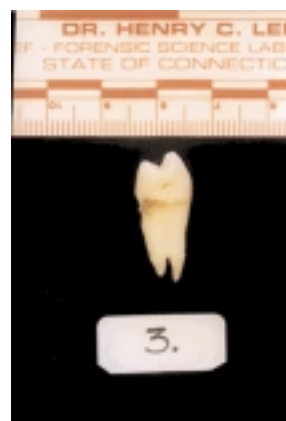
Slika 1. Gornji prvi lijevi pretkutnjak

Figure 1. Upper first left premolar



Slika 2. Gornji drugi lijevi kutnjak

Figure 2. Upper second left molar



Slika 3. Gornji prvi lijevi pretkutnjak

Figure 3. Upper first left premolar

1p, 2p, 3p). Korijeni su smrvljeni u usitnjivaču tkiva (grinderu) do finoga praha i stavljeni u epruvete (uzorci označeni kao 1d, 2d, 3d). Zubne krune su sačuvane.

Za izolaciju DNK iz uzoraka pulpe i smrvljenoga dentinsko-cementnog praha upotrebljene su dvije metode organske ekstrakcije (fenol-kloroform): jedna za uzorke pulpe (17), a druga za uzorke dentinsko-cementnog praha (18).

Prikaz slučaja

A. Izolacija DNK iz uzorka pulpe zuba navedenog kao uzorak broj 1

Pošto se pulpa stavi u Eppendorf tubu, počinje se procesom izolacije. Najprije se uzorku doda 1 ml čiste destilirane vode, protrese i centrifugira 5 minuta na maksimalnom broju okretaja te se zatim odstrani tekućinu i postupak se ponavlja još dva puta, ukupno tri. U tubicu se doda 450 µl ekstrakcijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA; 100 mM NaCl, 2%SDS) i dobro promiješa. Doda se 30 µl Proteinaze K (Gibco Brl, Life Technologies, Gaithersburg, USA) do konačne koncentracije 0,67 mg/ml. Lagano se promućka i ostavi 18 sati na 56°C. Nakon 18 sati doda se još 30 µl Proteinaze K, te inkubira još 3 sata na 56°C. Nakon inkubacije centrifugira se na 13 000 x g 15 minuta. Oprezno se odstrani supernatant i prebaci u novu tubu. U približno 450 µl supernatanta doda se 450 µl fenola/Tris zasićenog (SIGMA Chemical, St. Louis, USA) i dobro promiješa okrećući tubu gore-dolje. Ostavi se na sobnoj temperaturi 5 minuta, a zatim centrifugira na 3000 x g 10 minuta.

Oprezno se uzima supernatant i prebaci ga se u novu tubu, pa se doda 225 µl fenola i 225 µl smjese kloroform (J.T. Baker INC., Philisburg, USA)/izoamilni alkohol (Kemika Zagreb, Hrvatska) u omjeru (24:1). Promiješa se i centrifugira na 3000 x g 10 minuta. Uzima se supernatant i prebaci u novu tubu te doda 450 µl čistoga kloroforma, promućka, pa ponovno centrifugira na 3000 x g 10 minuta. Uzme se supernatant, prebaci u novu tubu, pa započinje precipitaciju dodavanjem 2,5 volumna dijela 100%-tnog etanola (Pharmco Products INC., Brookfield, USA), ili približno 1,2 ml, i 9 µl NaCl. Dobro se promućka i ostavi 2 sata, na -20°C. Centrifugira se na 3000 x g/20 min. Oprezno se odstrani alkohol, doda se 1 ml 60%-tnog etanola, pa se centrifugira na 3000 x g; 10 minuta. Odstrani se alkohol, a tubu s talogom ostavi se sušiti preko noći. Nakon sušenja talog se otopi u 100 µl čiste, redestilirane vode. Dobivena DNK provjerena je stavljanjem na 1%-tni agarozni gel u 1 x TBE puferu (89 mM Tris base; 89 mM borna kiselina; 2 mM EDTA, pH 8,0).

B. Izolacija DNK iz dentinsko-cementnog praha zuba navedenog kao uzorak broj 2

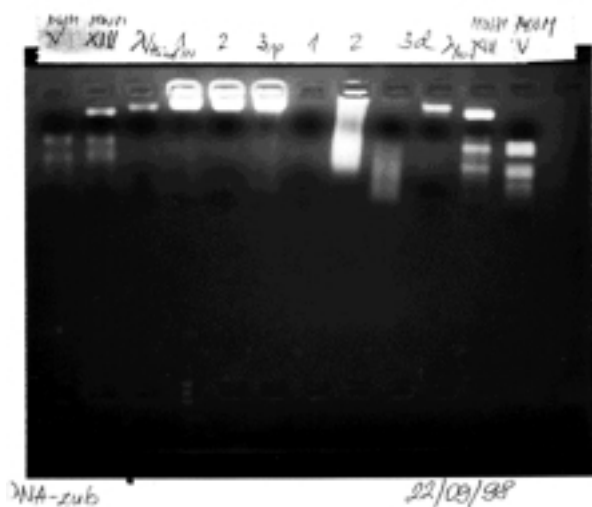
Nakon što je finim mljevenjem u usitnjivaču tkiva dobiven dentinsko-cementni prah, te uskladišten u epruvete, počinje se procesom izolacije DNK. U tube se doda 3 ml ekstrakcijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM Na₂EDTA; 100 mM NaCl, 2%SDS) i 100 ml 20 mg/ml proteinaze K (Gibco Brl, Life Technologies, Gaithersburg, USA), dobro promiješa, te inkubira preko noći na 56°C. Nakon inkubacije doda se 3 ml fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25:24:1), dobro promiješa, te centrifugira na 5000 x g 2 minute. Odstrani se supernatant i prebaci u nove tube, a postupak se ponavlja dok interfaza nije čista. U supernatant, očišćen od interfaze, dodati 3 ml n-butanola (SIGMA Chemical, St. Louis, USA), dobro promiješati, pa centrifugirati na 5000 x g 2 minute. Nakon centrifugiranja odstrani se n-butanol (u ovom slučaju to je gornji sloj), što je moguće preciznije. Donji tekući sloj premjesti se u centicon-100 tube (Amnicon, USA). Tako pripremljene tube centrifugira se na 1000 x g/30 minuta, a ako je potrebno i dulje. Odbaci se filtrirana tekućina, pa se doda 2 ml TE pufera (sastav) i centrifugira na 1000 x g 30 minuta. Odbaci se tekućina, a postupak ponovi. Nakon filtracije obrnuto se okrene centricon filter. Uzorku se dodaje TE pufer (približno 100 µl) dok se ne koncentrira izdvojena DNK. Dobivena DNK provjerena je stavljanjem na 1%-tni agarozni gel u 1 x TBE puferu (89 mM Tris base; 89 mM borna kiselina; 2 mM EDTA, pH 8,0).

Rezultati

Nakon pripreme gela počinje se na njega nasadivati dobivenu DNK. U prvu pregradicu uvijek stavljam marker ili biljeg veličine. Za raščlambu genomske DNK upotrijebili smo λ/Hind III (Gibco Brl, Life Technologies, Gaithersburg, USA) biljeg veličine, jer smo očekivali produkt izolacije približne duljine 23 000 bp (parova baza). Svakom uzorku dodan je nabojni pufer (loading buffer), koji je dvokomponentna organska boja (brom-fenol plavo i ksilen-cijanolo). Nakon odlaganja uzoraka u pregradice, ostatak 1 x TBE pufera se ulije u kadicu, te se narine napon (10 V/cm gela). Nakon provedene elektroforeze gel se

stavi na UV-transiluminator (TFX320.MC, VILBER LOURMAT), a rezultati se snime Polaroid kamerom (FOTODYNE, USA) (film 667).

- MWM v-Molecular weight marker, molekularni biljeg, broj v;
- MWM XIII - Molecular weight marker, molekularni biljeg, broj XIII;
- λ /Hind III - biljeg veličine;
- 1p - uzorak pulpe zuba broj 1;
- 2p - uzorak pulpe zuba broj 2;
- 3p - uzorak pulpe zuba broj 3;
- 1d - uzorak dentinsko-cementnog praha zuba broj 1;
- 2d - uzorak dentinsko-cementnog praha zuba broj 2;
- 3d - uzorak dentinsko-cementnog praha zuba broj 3; (Slika 4).



Slika 4. Elektroforeogram za izolirane DNK iz pulpe i dentinsko-cementnog praha

Figure 4 Electroforeogram of DNA isolated from the pulp and dentin-cement powder

Rasprava

DNK analize unijele su veliku revoluciju u područje forenzičke identifikacije (5). Oko dvadeset posto cijelokupne ljudske DNK sastoji se od sekvencije nukleinskih kiselina iznimno sklonih ponavljanju, tzv. satelitske DNK. U procesu evolucije satelitske su se DNK brzo izmijenile, a

također su izmijenile mjesta u kromosomima. Ljudski genom sadrži bar nekoliko predominantnih satelitskih DNK sekvenci. Njihovu mješavinu nalazimo u svakoj centromeri. Broj satelitskih kopija vrlo se razlikuje tako da je usporedbom moguće razlučivati između dviju osoba. Ta je spoznaja potakla razvitak tehnologije i strategije takva stupnja da je razlučivati moguće i između blizanaca ili u usporedbi s njihovim roditeljima (9).

Otkrićem AMEL gena ustanovljeno je da je lako moguće odrediti spol osobe. Spol koštanih ili zubnih ostataka moguće je brzo i sigurno odrediti upravo na segmentu ljudskog X ili Y kromosoma dešifriranog AMEL gena. Postoje razlike u sintetiziranju amelogeninskog proteina bilo iz X ili Y kromosoma. Činjenica da X i Y specifični AMEL geni sadrže u duljini 106 i 112 bazalnih parova, ili bp, omogućuje nam razmjerno izravnu metodu u razlučivanju između ženskog i muškog AMEL gena. Na tipu bar-kod displeja na uzorku muške DNK pojavljuje se u obliku diskretnih linija 106 i 112 bp, a uzorak ženske DNK u vidu samo jedne linije 106 bp za AMEL gen (5,19,20).

MtDNK predstavlja 0,5 posto cijelokupne DNK i redovito je moguće odvojiti od genomske DNK. MtDNK ima 16 569 nukleotidnih bp u duljini i postoji u velikom broju kopija u svim stanicama te je veća vjerojatnost da preživi duže razdoblje nego kromosomska, odnosno genomska DNK (21).

MtDNK je vrlo korisna u forenzičkoj identifikaciji jer se nasljeđuje samo po majčinoj lozi i najbolji je put u testiranju porodične povezanosti među nekoliko naraštaja predaka i njihovih potomaka. Uobičajeno ljudska DNK kodira sto tisuća gena, dok mtDNK kodira samo trinaest različitih gena (22,23).

Takva mogućnost sačuvanosti mtDNK i njihovih raščlamba proširila je raspon analiza s uzoraka starih nekoliko tisuća godina do više od trinaest milijuna godina. MtDNK je upotrebljena u raščlambi sedam tisuća godina staroga moždanog tkiva, petstotina godina starih koštanih ostataka, a i kostiju iz groba obitelji Romanov ubijenih 1918. godine. U identifikaciji Romanovih DNK upotrebene za usporedbu poticale su od rođaka vezanih s carem i caricom samo preko majčine loze, a tijela djece identificirana su nakon što se je identificirala

caričina mtDNK. Za identifikaciju je potrebna mala količina uzorka od dvadeset do sedamdeset pikograma (5,24,25,26).

Doduše, i utvrđivanje identiteta osobe s pomoću raščlambe DNK ima svojih mana. Prva je količina vremena potrebna za nju, zatim dostupnost uzoraka za usporedbu itd. Međutim, kada druge metode zakažu, raščlamba DNK uvijek je tu kao nadasve sigurna metoda identifikacije, kao što se je pokazalo i u identifikacijskom procesu žrtava Domovinskoga rata u Hrvatskoj 1991.-1995. (27,28,29,30,31).

Razumno je očekivati nove napretke u DNK tehnologiji koji bi reducirali i vrijeme i troškove potrebne u brzjoj potrazi za identitetom nepoznatih pokojnika.

Literatura

- LAWTON M E, STRINGER P, CHURTON M. DNA Profiles from Dental Pulp. Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis. FBI Academy, Quantico, VA, US Government Printing Office, 1989:217-8.
- OHTANI S, KATO S, SUGENO H, SUGIMOTO H, MURAMO T, YAMAZAKI, M, YAMAMOTO K. A Study on the Use of Amino-Acid Racemization Method to Estimate the Ages of Unidentified Cadavers from Their Teeth. The Bull Kanagawa Dent Col 1988; 16: 11-21.
- RATH D S, MERRIL C R. Mitochondrial DNA and Its Forensic Potential. Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis, FBI Academy, Quantico, VA, 1989:113-20.
- BUDOWLE B, ADAMS D E, COMEY C C, MERRIL C R. Mitochondrial DNA: A Possible Genetic Material Suitable for Forensic Analysis. Publication Number 89-02, Laboratory Division of the Federal Bureau of Investigation; 76-97.
- SLAVKIN H C. Sex, Enamel and Forensic Dentistry: A Search for Identity. J Am Dent Assoc 1997; 128: 1021-25
- PAABO S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci USA 86 1989;1939-43.
- MATTHEWS D E, HAYES J M. Analyt. Chem. 1978; 50:1465-73.
- FREEMAN K H, HAYES JM, Albrecht P. Nature 1989; 353: 254-256.
- AYALA FJ, KIGER JA, BARRELL BG. Modern genetics. Benjamin/Cummings, California: 1985.
- FINCHAM JRS. Genetics. Bristol: John Wright, 1983.
- BHASKAR SN. Ed. Orban's Oral Histology and Embriology, St. Louis: Moosby Year Book 1991:139-41.
- INGLE JI, TAINTOR JF. Endodontics, Philadelphia: Lea & Febiger 1985; 104:310-12.
- KRAUS BS, JORDAN RE, ABRAMS I. Dental anatomy and Occlusion, Baltimore: William Wilkens 1982;162-63.
- WHEELER RC. Dental Anathomy, Physiology and Occlusion, Philadelphia: W. B. Saunders Co 1974:300-3.
- WILLIAMS SR, DOGGETT NA, MOYZIS RK. Inhibitor Removal Using Sepharose CL-6B. Ancient DNA Newsletter 1992;1:14.
- DUFFY JB, WATERFIELD JD, SKINNER MF. Isolation of Tooth Pulp Cells for Sex Chromatin Studies in Experimental Dehydrated and Cremated Remaines. Forensic Sci Int 1991;49:127-41.
- FISHER DL, HOLLAND MM, MITCHELL L, SLEDZIK PS, WILCOX AW, WADDHAMS M, WEEDN VW. Extraction, Evaluation, and Amplification of DNA from Decalcified and Un-decalcified United States Civil War Bone. J Forensic Sci 1993;38: 60-8.
- HOLLAND MM, FISCHER DL, MITCHELL LG, RODRIQUEZ WC, CANIK JJ, MERRIL CR, WEEDN VW. Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War. J Forensic Sci 1993;38: 542-53.
- SULLIVAN KM, MANNUCCI A, KIMPTON CP, GILL P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. Bio Techniques. 1995;71:413-17.
- MANNUCCI A, SULLIVAN KM, IVANOV PL, GILL P. Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of X-Y homologous gene amelogenin. Int J Leg Med. 1990;109:38-43.
- BOGENHAGEN D, CLAYTON DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genome in mouse L and human HeLa cells. J Biol Chem 1974;249:7991-95.
- ORREGO C, KING M-C. Determination of familial relationships. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Shinsky J.J., White T.J. (eds) PCR Protocols. London: Academic Press 1990:416-26.
- SULLIVAN KM, HOPGOOD R, LANG B, GILL P. Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. Electrophoresis 1991;12:17-21.
- HAGELBERG E, SYKES B. Ancient bone DNA amplified. Nature 1990:342-485.
- HAGELBERG E, CLEGG A. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. Proc Roy Soc Lon B 1991;244:45-50.
- HAGELBERG E, GRAY IC, JEFFREYS AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim. Nature 1991;352:427-9.
- KEISER-NILSEN S. Person identification by means of teeth, Bristol: John Wright and Sons Ltd. 1980.
- BOLES T C, SNOW C C, STOVER E. Forensic DNA Testing on Skeletal Remains from Mass Graves: A Pilot in Guatemala. J Forensic Sci 1995;40:349-55.

29. BRKIĆ H, ŠKAVIĆ J, STRINOVIĆ D. Postmortalna identifikacija tijela postignuta statusom zubala. *Acta Stomatol Croat* 1994; 28: 231-6.
30. BRKIĆ H, STRINOVIĆ D, ČADEŽ J, GUSIĆ S, ŠLAUS M. Dentalna identifikacija žrtava domovinskog rata u Hrvatskoj. *Acta Stomatol Croat* 1996; 30:173-9.
31. ŠKAVIĆ J, ZEČEVIĆ D, STRINOVIĆ D. Identification of the dead in war: the case of 20 Croatian soldiers found near Pakrac. *Croat Med J* 1992;33:216-9.